

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTE DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE,  
SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ ET  
ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCES

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE  
STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENT SCIENCES

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE NKOLBISSON

*BIOTECHNOLOGY CENTRE OF NKOLBISSON*

**Caractérisation génomique et fonctionnelle du rôle des  
glutathion s-transférases epsilon dans la résistance aux  
insecticides chez *Anopheles funestus* s.s. , vecteur  
majeur du paludisme**

**THESE**

« Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D en  
Biochimie »

Option : Biotechnologie et Développement

Par :

**KOUAMO MANGOVA MERSIMINE FLORENCE**

*Matricule : 08R0397*

Master en biochimie



**Devant le Jury composé de:**

**Président :**

**Rapporteurs :**

**MBACHAM Wilfred, Professeur, Université de Yaoundé I**

**BOYOM F. Fabrice, Professeur, Université de Yaoundé I**

**BOUDJEKO Thaddée, Professeur, Université de Yaoundé I**

**WONDJI Charles S., Professeur, *Liverpool School of Tropical  
Medicine, UK***

**Membres :**

**NJIOKOU Flaubert, Professeur, Université de Yaoundé I**

**BIGOGA D. Jude, Professeur, Université de Yaoundé I**

**SIMO Gustave, Maître de Conférences, Université de Dschang**

**Année 2022**

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*  
FACULTE DES SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE,  
SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ ET  
ENVIRONNEMENT  
\*\*\*\*\*  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDI  
\*\*\*\*\*  
FACULTY OF SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES  
IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENT SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**ATTESTATION DE CORRECTION**

Nous, soussignés Pr. NJIOKOU Flaubert et Pr. MBACHAM Wilfred respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie option Biotechnologie et Développement, soutenue par Madame KOUAMO MANGOUA Mersimime Flore (Matricule 08R0397) le 28 Novembre 2022 à 15 heures dans la Salle multimédia de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : " Caractérisation génomique et fonctionnelle du rôle des glutathion s-transférases epsilon dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus s.s.*, vecteur majeur du paludisme", attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

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

Fait à Yaoundé, le 06.02.2023

Examineur

Pr. F. Njokou

Président du jury

Prof. Mbacham Wilfred  
MS, DS, ScD (Harvard), FAS, FCS, FEA  
Public Health Biotechnologist

## LISTES DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

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

**ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2022**

### ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,  
*Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS** :  
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

#### 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4.	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
7.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste

10	ATOUGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
15	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
16	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Doyen FS / UDs
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
26	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
28	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
37	WILFRED ANGIE Abia	Chargé de Cours	En poste

38	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Chargée de Cours	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
----	--------------------------	------------	----------

2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ MINESUP</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
24.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
25.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
26.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

27.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
28.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
29.	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
30.	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Chargée de Cours	En poste
31.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste

32.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
33.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
34.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
37.	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
38.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
39.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
40.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42.	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
43.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
44.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45.	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

48.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
49.	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
50.	MAPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
51.	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

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

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

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
----	------------------	-----------------------	----------

8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
11.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18.	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
20.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22.	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
26.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
27.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
28.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
29.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
30.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
31.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
32.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste

33.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
-----	-------------------	-----------	----------

#### **4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)**

1.	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
3.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
4.	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
5.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
6.	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>

7.	NENWA Justin	Professeur	En poste
8.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Univ.Ngaoundere</i>
9.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

10.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11.	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15.	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18.	NEBAH Née NDO SIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/ MINPROFF</i>
19.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20.	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

24.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
25.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26.	KOUOTOU DAOU DA	Chargé de Cours	En poste
27.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28.	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

#### **5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)**

1.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
2.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
3.	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10.	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste

13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

35	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

## 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

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

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

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Sous- Directeur/ MINFOPRA</i>
6.	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste

8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
15.	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET. Ebolowa</i>
16.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

17.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
19.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
20.	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
----	-----------------------	------------	---------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17.	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Uté Bertoua</i>
18.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste

20	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste

24	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE/FS/UJI</i>
3.	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
----	-----------------------------------	------------	----------

21	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste
22	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	BOYOMO Marthe	Maître de Conférences	<i>DA / ENSPY</i>
19.	ENYEGUE A NYAM épse	Maître de Conférences	En poste
20.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
21.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
22.	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
23.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU DerbetiniAppolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>

30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33.	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
34.	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35.	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste

36.	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
37.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
38.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
40.	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste

41.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
42.	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
43.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
44.	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

### 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2.	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3.	NDAM NGOUPAYOU Jules- Remy	Professeur	En poste
4.	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département /Uté Maroua</i>
14.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19.	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel/UYII</i>
20.	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>

24.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
27.	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO LIONELLE ESTELLE	Chargé de Cours	En poste
31.	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
32.	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
33.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>CD/ Ute Maroua</i>
35.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
36.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste

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

<b>NOMBRE D'ENSEIGNANTS</b>					
<b>DÉPARTEMENT</b>	<b>Professeurs</b>	<b>Maîtres de Conférences</b>	<b>Chargés de Cours</b>	<b>Assistants</b>	<b>Total</b>
BCH	8 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	<b>39 (16)</b>
BPA	14 (01)	12 (08)	21 (06)	04 (02)	<b>51 (17)</b>
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	<b>33 (11)</b>
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	<b>31 (06)</b>
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	<b>38(09)</b>
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	<b>22 (01)</b>
MAT	01 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	<b>30 (02)</b>
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	<b>22 (08)</b>
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	<b>43 (06)</b>
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	<b>42(08)</b>
<b>Total</b>	<b>71 (07)</b>	<b>115 (34)</b>	<b>133 (36)</b>	<b>32 (07)</b>	<b>351 (84)</b>

Soit un total de **351 (84)** dont :

- Professeurs **71 (07)**
- Maîtres de Conférences **115 (34)**
- Chargés de Cours **133 (36)**
- Assistants **32 (07)**

( ) = Nombre de Femmes **84**

## **DEDICACE**

**A Dieu tout puissant**

## REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont débuté à l'Unité de Recherche de la *Liverpool School of Tropical Medicine* basée à l'OCEAC (Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale) à Yaoundé au Cameroun et ont été achevés au *Centre for Research in Infectious Diseases* (CRID) dans la même ville où la même unité a été localisée. L'expression hétérologue des protéines recombinantes et la détermination de l'activité enzymatique ont été effectués à la *Liverpool School of Tropical Medicine* basée en Angleterre. Cette étude a bénéficié du soutien financier du projet *Wellcome Trust Senior Fellowship in Biomedical Sciences* (101893/13/Z) accordé au Pr Charles Sinclair WONDJI.

C'est avec une joie immense que j'adresse vivement mes remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la bonne réalisation. Je pense particulièrement :

- Au **Pr Charles S. WONDJI** sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Dès notre première rencontre, il a pris de son précieux temps pour trouver ce sujet de Thèse et ensuite, il a accepté de m'accompagner durant toute cette période malgré mes remous. Ma connaissance de la biologie moléculaire n'était que théorique, mais il m'a permis au travers de cette thèse de me familiariser avec les techniques biochimiques telles que le clonage, la PCR, l'expression et la caractérisation structurale des gènes. Il m'a introduit dans le monde de l'entomologie. Je ne saurais trouver les mots juste pour le remercier pour la patience, la promptitude et le soutien qu'il m'a apporté durant toutes ces années tout en espérant qu'il est satisfait du produit que je suis ;
- Au **Pr FEKAM B. Fabrice** qui a pris sur lui la lourde tâche de superviser ce travail. Je me souviens qu'à chaque rencontre, il me demandait de lui envoyer mon état d'avancement. Il a toujours pris du temps pour recadrer mes travaux selon les canons de l'Université. Je tiens à le remercier pour la disponibilité, la patience, les conseils et pour tout le soutien qu'il a su m'apporter durant cette collaboration. Il m'a initié dans le monde de la recherche scientifique en acceptant de m'encadrer depuis le master ;
- Au **Pr BOUDJEKO Thaddée** pour qui aucun mot n'est assez fort pour exprimer ma gratitude à son endroit. Je le remercie primordialement d'avoir accepté de diriger ma thèse, d'avoir permis que je change d'axe de recherche après ma sélection en thèse lorsque l'occasion s'est présentée et pour la confiance qu'il m'a accordée. Comme un père, il m'a initié dans la recherche et après obtention du master il m'a motivé à m'inscrire en thèse. Il a été pour moi un facilitateur et un très grand soutien. J'ai vraiment eu la chance de l'avoir comme encadreur. J'espère que je fais sa fierté ;

- Aux Drs **Jacob Riveron MIRANDA, Sulaiman Ibrahim Sadi** et **Michael KUSIMO** pour le suivi et l'expertise apportés tout au long de ce travail.
- A tous les enseignants et au chef du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour tous les enseignements reçus.
- Au staff du Centre de Recherche sur les Maladies Infectieuses (CRID) pour leur soutien multiforme.
- Aux Drs **Basile KAMGANG, Cyrille NDO, ELANGA Emmanuel, Billy TENE, Marcel SANDEU, Trésor MELACHIO, Huguette SIMO, Delia DJUICY, TCHOUAKUI Magellan, DJIOVA Valdi, Léon MUGENZI, Amen NAKEBANG, Benjamin MENZE** et **Daniel NGUETE** pour les conseils et les encouragements apportés ;
- A Mme **Murielle WONDJI**, qui m'a suivie sur la paillasse durant ces années. C'est elle qui m'a initié aux techniques de biologie moléculaire. Merci pour le soutien.
- Aux techniciens de laboratoire **Williams TCHAPGA, Mi-carême TCHOUPPO, TERENCE EBAI** pour leurs accompagnements sur la paillasse, à l'insectarium et sur le terrain.
- A mes camarades de laboratoire **Ruth SANDEU, Désiré DJONABAYE, Lynda DJOUNKWA, Aurélie YOUNGANG, Achille BINYANG, Armel TEDJOU, Amelie WAMBA, Theodel WILSON-BAHUN, Yvan FOTSO, Claudine Maffo, Francine Sado, Calmes Bouaka, DJUIFO Carole** et **SIPPING Marius** pour leur collaboration ;
- A tous mes camarades de la promotion baptisée « **les Spartiates de la biochimie** » pour leurs encouragements ;
- A ma Grand-mère **KEMENIE Anastasie**, celle qui est appelée « la vraie mère ». Elle a tout abandonné pour prendre soin de mes enfants. Merci de tout cœur ma grand-mère chérie.
- A mes enfants **Eunice** et **Uriel FLORABRA** ainsi que **TANDIL Samira**, merci pour votre arrivé dans ma vie durant cette thèse. Votre regard a été une source de motivation pour moi.
- A ma mère **KEPNANG Florence** épouse **MANGOUA** qui après la mort de papa à continuer de prendre soin de nous contre vent et marée. Voici maman l'un des fruits de tous tes efforts.
- A mon tendre époux et Ami **ENGOULOU NDJOYA Abraham** qui n'a jamais cessé de m'encourager à finir cette thèse. Son amour et son attention m'ont toujours donné la force de persévérer surtout face aux challenges rencontrés durant ce travail. Reçois ainsi chéri tout mon amour, car ces mots ne sauraient exprimer toute ma reconnaissance à ton endroit ;
- A mes frères **Essi'i Brigitte, NGANOU Gaëlle, EDIMA Thérèse, TIMEGNIE Claude** et **TCHITCHUI Arnaud** et leurs conjoints pour le soutien, les conseils et l'affection ;

Je tiens enfin à témoigner ma gratitude envers ma famille entière, ma belle-famille, mes amis et tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'avancée de ce travail.

## SOMMAIRE

<b>LISTES DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES ....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE.....</b>	<b>xiv</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xv</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xxiv</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>xxv</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>xxvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxviii</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. Généralités sur le paludisme .....</b>	<b>5</b>
I.1.1. Définition et épidémiologie du paludisme .....	5
I.1.2. Le paludisme au Cameroun .....	7
<b>I.2. Agent pathogène du paludisme.....</b>	<b>8</b>
I.2.1. Systématique .....	8
I.2.2. Agents responsables du paludisme chez l’homme.....	9
I.2.3. Cycle de développement du Plasmodium .....	11
<b>I.3. Les vecteurs du paludisme .....</b>	<b>13</b>
I.3.1. Diversité et répartition géographique des anophèles .....	13
I.3.2. Position systématique du genre <i>Anopheles</i> .....	14
I.3.3. Cycle de développement des anophèles.....	15
I.3.4. Relations phylogénétiques entre les anophèles vecteurs du plasmodium.....	17
I.3.5. Les membres du complexe <i>Anopheles funestus</i> .....	18
<b>I.4. Moyens de lutte contre le paludisme .....</b>	<b>19</b>
I.4.1. Lutte antiparasitaire.....	20
I.4.2. Lutte anti-vectorielle .....	22
<b>I.5. Les insecticides utilisés dans le cadre de la lutte anti-vectorielle.....</b>	<b>26</b>

I.5.1. Les pyréthriinoïdes .....	26
I.5.2. Les organochlorés .....	27
I.5.3. Les organophosphorés .....	28
I.5.4. Les carbamates .....	28
I.5.5. Autres classes d'insecticides .....	28
<b>I.6. Le phénomène de résistances aux insecticides chez les moustiques .....</b>	<b>29</b>
I.6.1. Définition et état de la résistance aux insecticides.....	29
I.6.2. Les mécanismes de résistances aux insecticides.....	30
<b>I.7. La résistance métabolique et l'implication des gènes de détoxification .....</b>	<b>37</b>
I.7.1. Les glutathion s-transférases .....	37
I.7.2. Les cytochromes P450 .....	37
I.7.3. Les estérases.....	38
<b>I.8. Aperçu général des glutathion s-transférases.....</b>	<b>39</b>
I.8.1. Classes et structures des GSTs.....	40
I.8.2. Classification des GSTs chez les insectes.....	41
<b>I.9. Rôle du cluster epsilon des GSTs dans la résistance aux insecticides .....</b>	<b>42</b>
<b>I.10. Méthodes utilisées dans les études d'évaluation du rôle des gènes de détoxifications dans la résistance aux insecticides.....</b>	<b>43</b>
I.10.1 Méthodes utilisées pour l'étude de l'expression des gènes.....	43
I.10.2. Méthodes utilisées pour l'analyse structurelle.....	46
I.10.3. Outils utilisés pour la validation fonctionnelle du rôle des gènes de détoxification dans la résistance aux insecticides .....	48
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>53</b>
<b>II.1. Schéma de l'étude.....</b>	<b>54</b>
<b>II.2. Description des sites de l'étude.....</b>	<b>54</b>
II.2.1. Description du site d'étude de Mibellon.....	55
II.2.2. Description du site d'étude de Kpome .....	55
II.2.3. Description du site d'étude de Tororo .....	56

II.2.4. Description du site d'étude de Chikwawa .....	56
<b>II.3. Échantillonnage et identification morphologique .....</b>	<b>57</b>
<b>II. 4. Tests de sensibilité aux insecticides : tests en tube de l'OMS.....</b>	<b>58</b>
<b>II.5. Extraction des biomolécules (ARN et ADN) et synthèse de l'ADNc.....</b>	<b>59</b>
II.5.1. Extraction de l'ADN génomique du moustique .....	59
II.5.2. Extraction de l'ARN des moustiques .....	60
II.5.2.1. Principe d'extraction de l'ARN .....	60
II.5.2.2. Protocol d'extraction de L'ARN .....	60
II.5.3. Synthèse de l'ADNc .....	61
<b>II.6. Identification moléculaire des membres du groupe <i>Funestus</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>II.7. Evaluation du profil d'expression des GSTes chez <i>Anopheles funestus</i> dans quelques pays d'Afrique et détection des potentiels marqueurs de résistance.....</b>	<b>62</b>
II.7.1. Evaluation du profil transcriptomique et d'expression des GSTes en Afrique .....	62
II.7.2. Analyse de la diversité génétique des GSTes chez les moustiques sensibles ou résistants dans quelques populations d' <i>An. funestus</i> au Cameroun .....	64
II.7.3. Recherche des potentiels marqueurs de résistance des GSTes.....	65
<b>II.8. Caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez <i>Anopheles funestus</i> .....</b>	<b>69</b>
II.8.1. Caractérisation structurelle des GSTes et prédiction de l'affinité avec les insecticides .....	69
II.8.2. Validation fonctionnelle du rôle des GSTs epsilon dans la résistance aux insecticides .....	73
<b>II.9. Evaluer l'impact des variations alléliques de GSTe2 sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique au Cameroun .....</b>	<b>86</b>
II.9.1. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires par la technique des tests en cône .....	86
II.9.2. Génotypage du locus GSTe2 pour détecter la mutation L119F .....	88
<b>II.10. Exploitation et analyses des données .....</b>	<b>88</b>

II.10.1. Test de résistance aux insecticides et de bio-efficacité des moustiquaires.....	89
II.10.2. Analyse des séquences et cartographie des polymorphismes.....	89
II.10.3. Caractérisation structurelle des GSTes <i>in silico</i> .....	89
II.10.4. Analyse des données de l'étude de l'impact des variations alléliques des GSTe2 sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique .....	90
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>III. 1. Profil d'expression des GSTes chez <i>Anopheles funestus</i> dans quelques pays d'Afrique et potentiels marqueurs de résistance .....</b>	<b>92</b>
III.1.1. Résultats partiels 1 .....	92
III.1.2. Discussion partielle 1 .....	121
III.1.3. Conclusion partielle 1.....	124
<b>III.2. Caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez <i>Anopheles funestus</i>.....</b>	<b>125</b>
III.2.1. Résultats partiels 2 .....	125
III.2.2. Discussion partielle 2 .....	147
III.2.3. Conclusion partielle 2.....	151
<b>III. Impact de la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 d'<i>An. funestus</i> sur l'efficacité des principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique.....</b>	<b>151</b>
III.3.1. Résultats partiels 3 .....	151
III.3.2. Discussion partielle 3 .....	160
III.3.2. Conclusion partielle 3.....	162
<b>III.4. Discussion générale .....</b>	<b>162</b>
<b>CONCLUSION GENERALE, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>208</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition de l'incidence du paludisme dans le monde. ....	5
Figure 2 : Évolution de l'incidence du paludisme dans le monde entre 2010 et 2017. ....	6
Figure 3 : Incidence hospitalière du paludisme pour 1000 habitants dans les dix régions du Cameroun en 2019. ....	8
Figure 4 : Systématique du genre <i>Plasmodium</i> .....	9
Figure 5 : Cycle biologique de développement de plasmodium. ....	13
Figure 6 : Carte mondiale des espèces vectrices dominantes du paludisme. ....	14
Figure 7 : Position systématique des anophèles. ....	15
Figure 8 : Cycle de développement des anophèles. ....	16
Figure 9 : Classification partielle des anophèles. ....	18
Figure 10 : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides. ....	31
Figure 11 : Les différentes étapes possibles du métabolisme des xénobiotiques. ....	36
Figure 12 : Réaction d'hydrolyse d'un substrat par les carboxylestérases. ....	39
Figure 13 : Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion catalysé par une GST. ....	40
Figure 14 : Cluster epsilon des glutathion s-transférases d' <i>Anopheles funestus</i> . ....	41
Figure 15 : Modèle de la réaction de déhydrochlorination du DDT par une GST. ....	43
Figure 16 : Agents se liant à l'ADN double brin. ....	44
Figure 17 : Etapes du séquençage de l'ARN. ....	46
Figure 18 : Mécanisme de l'ARN interférence. ....	50
Figure 19 : Retouche génétique par le système CRISPR-CAS9. ....	51
Figure 20 : Vue d'ensemble du clonage d'un gène. ....	52
Figure 21 : Schéma de la méthodologie expérimentale. ....	54
Figure 22 : Différentes zones de collecte des moustiques pour l'étude. ....	55
Figure 23 : Dispositif de collecte des moustiques adultes. ....	57
Figure 24 : Procédure du test de sensibilité aux insecticides. ....	58
Figure 25 : Recherche des variations alléliques des GSTes. ....	68
Figure 26 : Vecteur d'expression des drosophiles pUAST. ....	77
Figure 27 : Activation de la transcription des GSTes chez les drosophiles suite au croisement de la lignée UAS-GTes avec la lignée Gal4-Actin. ....	78
Figure 28 : Protocole d'exposition des drosophiles transgéniques à la perméthrine, à la deltaméthrine et au DDT. ....	79
Figure 29 : Vecteur d'expression des protéines pET 28a. ....	80

Figure 30 : Expression hétérologue et purification des GSTes sous le contrôle du promoteur T7.....	82
Figure 31 : Réaction de conjugaison du chlorodinitrobenzène (CDNB) par les GSTs.....	83
Figure 32 : Réaction de conjugaison du 4-hydroxynenal (4-NHE) par les GSTs.....	84
Figure 33 : HPLC utilisé pour détection des métabolites présents dans le milieu réactionnel après le contact entre l'insecticide et les protéines synthétisées en présence du glutathion réduit. ....	86
Figure 34 : Procédure des tests en cône pour évaluer l'efficacité des moustiquaires. ....	87
Figure 35 : Profil de susceptibilité d' <i>An. funestus</i> .....	92
Figure 36 : Diagramme de Venn qui ressort le nombre de gènes significativement (P<0,05) surexprimés dans chaque population .....	93
Figure 37 : Profil d'expression des GSTes.....	102
Figure 38 : Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de <i>GSTe1</i> chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon.....	104
Figure 39 : Diversité génétique de <i>GSTe3</i> liés au profil de résistance chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon. ....	106
Figure 40 : Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de <i>GSTe4</i> chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon.....	108
Figure 41: Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de <i>GSTe5</i> chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon.....	110
Figure 42 : Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de <i>GSTe6</i> chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon.....	112
Figure 43 : Diversité génétique de <i>GSTe7</i> liés au profil de résistance chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon. ....	114
Figure 44 : Diversité génétique de <i>GSTe8</i> liés au profil de résistance chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon. ....	116
Figure 45 :Analyse du polymorphisme de <i>GSTe3</i> chez <i>Anopheles funestus</i> . ....	117
Figure 46 : Analyse du polymorphisme de <i>GSTe4</i> chez <i>Anopheles funestus</i> . ....	119
Figure 47 :Analyse du polymorphisme de <i>GSTe6</i> chez <i>Anopheles funestus</i> . ....	120
Figure 48 : Graphe Errat résultant de l'évaluation de la structure 3D des GSTes. ....	126
Figure 49 : Affinité entre les GSTes et le DDT .....	128
Figure 50 : Affinité entre les GSTes et la perméthrine .....	130
Figure 51 : Affinité entre les GSTes et la deltaméthrine.....	132

Figure 52 : Confirmation de l'effet <i>knockdown</i> des doubles brins d'ARN des GSTes par PCR à temps réel chez les moustiques injectés et les moustiques non injectés du même âge.....	134
Figure 53 : Profil de susceptibilité des moustiques aux insecticides après réduction de l'expression des GSTes par la technique de l'ARN interférence. ....	136
Figure 54 : Confirmation de la surexpression des GSTes chez les drosophiles transgéniques par la PCR semi-quantitative.....	138
Figure 55 : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles au DDT. ....	139
Figure 56 : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles à la perméthrine. ....	140
Figure 57 : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles à la deltaméthrine.....	142
Figure 58 : Activité de conjugaison du 4-hydroxynonanal par les GSTes synthétisées. ....	144
Figure 59 : Activité métabolique du DDT par les GSTes. ....	145
Figure 60 : Taux d'élimination du DDT par les GSTes synthétisées après une 1h d'exposition.....	146
Figure 61 : Taux d'élimination de la deltaméthrine par les GSTes synthétisées après une 1h d'exposition. ....	147
Figure 62 : Présentation de la mutation L119F-GSTe2. ....	152
Figure 63 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance au DDT chez <i>An. funestus</i> .....	154
Figure 64 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance à la perméthrine chez <i>An. funestus</i> .....	155
Figure 65 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance à la deltaméthrine chez <i>An. funestus</i> . ....	156
Figure 66 : Test d'efficacité aux MILDA utilisées au Cameroun.....	157
Figure 67 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0. ....	158
Figure 68 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 3.0. ....	159
Figure 69 : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire OlySet plus. ....	160

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Stratégie mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030.....	7
Tableau II : Liste des amorces utilisées pour l'étude de la diversité génétique des GSTes.....	67
Tableau III : Composition du milieu réactionnel du test de conjugaison du CNDB .....	83
Tableau IV : Composition du milieu réactionnel du test de conjugaison du 4-NHE.....	84
Tableau V: Composition du milieu réactionnel de la détermination de l'activité métabolique des protéines recombinantes.....	85
Tableau VI : Description de la composition des MILDA testées .....	87
Tableau VII : Liste des séquences d'amorces utilisées pour le génotypage.....	88
Tableau VIII : Gènes de détoxification surexprimés au Cameroun chez <i>An. funestus</i> entre les différentes comparaisons .....	94
Tableau IX : Gènes de détoxification surexprimés au Ghana chez <i>An. funestus</i> entre les différentes comparaisons .....	95
Tableau X : Gènes de détoxification surexprimés au Malawi chez <i>An. funestus</i> entre les différentes comparaisons .....	98
Tableau XI : Gènes de détoxification surexprimés chez <i>An. funestus</i> en Ouganda entre les différentes comparaisons .....	99
Tableau XII : Diversité génétique de <i>GSTe1</i> au Cameroun.....	103
Tableau XIII : Diversité génétique de <i>GSTe3</i> au Cameroun.....	105
Tableau XIV : Diversité génétique de <i>GSTe4</i> au Cameroun.....	107
Tableau XV : Diversité génétique de <i>GSTe5</i> au Cameroun.....	109
Tableau XVI : Diversité génétique de <i>GSTe6</i> au Cameroun.....	111
Tableau XVII : Diversité génétique de <i>GSTe7</i> au Cameroun .....	113
Tableau XVIII : Diversité génétique de <i>GSTe8</i> au Cameroun.....	115
Tableau XIX : Activité de conjugaison du CNDB par les GSTes synthétisées.....	143
Tableau XX : Association entre la mutation L119F-GSTe2 et la résistance aux insecticides utilisés pour les pulvérisations intra-domiciliaires. ....	153
Tableau XXI : Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0.....	158
Tableau XXII : Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 3.0.....	159
Tableau XXIII : Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire Olyset Plus.....	160

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ACE 1** : Acetyl cholineestérase

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique Complémentaire

**AMP** : Ampiciline

**An.** : *Anopheles*

**ARN** : Acide ribonucléique

**COEs** : Co-enzymes

**CRID** : "Centre for Research in Infectious Diseases"

**E. coli** : "Escherichia coli"

**GABA** : Acide Gamma-aminobutyrique

**GST** : Glutathion s-transférase

**GSTe** : Glutathion s-transférase epsilon

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**kdr** : knockdown resistance

**LB** : Luria-Bertani

**LAV** : Lutte anti-larvaire

**MII** : Moustiquaire imprégnée d'insecticide

**MILDA** : Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action

**OCEAC** : Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Central

**PBO** : Pypéronyl butoxide

**PID** : Pulvérisation intradomiciliaire

**PNLP** : Programme National de Lutte contre le Paludisme

**RNase** : Ribonucléase

**s.l.** : "sensu lato"

**s.s.** : "sensu stricto"

**TAE** : Tris Acetate d'éthylènediaminetétraacétique

**TBE**: Tris Borate d'éthylènediaminetétraacétique

## RESUME

Elucider les mécanismes de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est crucial pour le développement de nouveaux outils de lutte contre cette pandémie. Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué le rôle des glutathion s-transférases epsilon (GSTes) dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* en utilisant l'approche de caractérisation fonctionnelle. Une combinaison d'analyse a été utilisée associant le profil d'expression des GST epsilon chez *An. funestus*, la détection des marqueurs de résistance, la caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides et l'évaluation de l'impact de la variation allélique L119F de *GSTe2* sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle.

Pour le profil de susceptibilité au Cameroun, nous avons obtenu des taux de mortalité inférieurs à 90 % pour tous les insecticides testés montrant que les populations d'*An. funestus* du Cameroun ont développé la résistance au DDT ( $55,28 \pm 5,95$  %), à la perméthrine ( $48,88 \pm 2,31$  %) et à la deltaméthrine ( $53 \pm 2,5$  %). L'analyse transcriptionnelle des gènes associés à la résistance au DDT a révélé que, outre les cytochromes P450 (à l'exemple de *CYP6P9a/b*, *CYP6P5*, *CYP3I5A1*) et les GSTs (GST epsilon, delta et thêta), d'autres familles de gènes sont impliquées dans la résistance au DDT, notamment les carboxylestérases, les sulfotransférases, les UDP-glucuronosyltransférases ainsi que les transporteurs ABC et les métalloprotéines. Cette analyse a révélé que les gènes *GSTe1* (Cameroun (facteur de changement, FC : 2,54), Ghana (4,20), Malawi (2,51)), *GSTe2* (Cameroun (4,47), Ghana (7,52), Malawi (2,13)), *GSTe3* (Cameroun (2,49), Ouganda (2,60)), *GSTe4* au Ghana (3,47), *GSTe5* (Ghana (2,94), Malawi (2,26)), *GSTe6* (Cameroun (3,0), Ghana (3,11), Malawi (3,07), Ouganda (3,78)) et *GSTe7* au Ghana (2,39) sont surexprimés chez les populations d'*An. funestus* résistantes au DDT. La validation du profil d'expression de ces derniers par qPCR a confirmé que les GSTes sont différenciellement exprimés sur le continent et qu'ils sont plus associés à la résistance au DDT. Cependant, la recherche des variations alléliques a permis de détecter les allèles G26D-GSTe3, H181Y-GSTe4 et E189A-GSTe4 présents au Bénin et au Cameroun, et des allèles T201S-GSTe6 et G210E-GSTe6 présents au Bénin et au Malawi, mais absents au Cameroun.

Par ailleurs, la caractérisation structurelle des différents allèles a révélé que la présence des variations alléliques augmente la cavité de fixation du site actif des GSTes G26-GSTe3 (37,88) ; Y/A-GSTe4 (29,18) et E/S-GSTe6 (19,45) et permet une meilleure affinité avec le DDT et la perméthrine. L'évaluation de l'activité métabolique des insecticides par les protéines synthétisées confirme que les GSTes sont capables d'éliminer le DDT et les pyréthriinoïdes. Seules les protéines de *GSTe4* ont montré une activité métabolique vis-à-vis de la deltaméthrine.

Cependant, les protéines mutées ont montré une plus grande capacité à éliminer les insecticides. L'expression transgénique des GSTes chez la drosophile a montré que l'expression de *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe6* et la présence des variations alléliques confèrent une plus grande résistance aux DDT et aux pyréthriinoïdes. De même, l'inhibition de l'expression des *GSTe2*, *3*, *4*, *5* et *GSTe6* chez les moustiques par la technique de l'ARN interférence augmente leurs susceptibilités aux insecticides, confirmant ainsi que la surexpression des GSTes contribue à la résistance aux insecticides observée chez *An. funestus*.

Nos résultats montrent que la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 augmente la capacité de survie d'*An. funestus* en présence des pyréthriinoïdes, du DDT et des moustiquaires PermaNet 3.0 et PermaNet 2.0., ce qui n'est pas le cas avec la moustiquaire Olyset Plus.

Cette étude a pu mettre en évidence que la surexpression des *GSTe1*, *2,3*, *4*, *5*, *6*, *7* et *8* ainsi que la présence des variations alléliques chez *An. funestus* accroît la résistance aux insecticides et par conséquent réduit l'efficacité des principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés au Cameroun.

**Mots Clés** : Paludisme ; *Anopheles funestus* ; résistance métabolique ; glutathion s-transférase ; analyse transcriptomique, diversité génétique, caractérisation structurelle, validation fonctionnelle.

## ABSTRACT

Elucidating the resistance mechanisms of malaria vectors to insecticides is crucial for the design of new and sustainable tools to fight this pandemic. In this study, we assessed the role of glutathione s-transferases epsilon (GSTes) in conferring insecticide resistance in *Anopheles funestus* using a functional characterization approach. A combination of analysis associating the expression profiling of GST epsilon in *An. funestus*, the detection of resistance markers, the structural and functional characterization of the role of GSTs on insecticide resistance and the evaluation of the impact of L119F allelic variation of *GSTe2* on the main vector control tools was used.

In Cameroon, mortality rates of mosquitoes after susceptibility testing were less than 90 % for all the insecticides tested, showing that *An. funestus* populations from Cameroon are resistant to DDT ( $55.28 \pm 5.95$  %), permethrin ( $48.88 \pm 2.31$  %) and deltamethrin ( $53 \pm 2.5$  %). Transcriptional analysis of genes associated with DDT resistance revealed that, in addition to cytochromes P450 (example of *CYP6P9a/b*, *CYP6P5*, *CYP315A1*) and GSTs (GST epsilon, delta and theta), other gene families were involved in DDT resistance, including carboxylesterases, sulfotransferases, UDP-glucuronosyltransferases and ABC transporters and metalloproteins. This analysis revealed that *GSTe1* ((Cameroon (Fold change, FC: 2.54), Ghana (4.20), Malawi (2.51)), *GSTe2* ((Cameroon (4.47), Ghana (7.52), Malawi (2.13)), *GSTe3* ((Cameroon (2.49), Uganda (2.60)), *GSTe4* in Ghana (3.47), *GSTe5* ((Ghana (2.94), Malawi (2, 26)), *GSTe6* ((Cameroon (3.0), Ghana (3.11), Malawi (3.07), Uganda (3.78)), and *GSTe7* in Ghana (2.39) were overexpressed in DDT resistant populations of *An. funestus*. Validation of the expression level of genes by qPCR confirmed that GSTes are differentially expressed on the continent and are more associated with DDT resistance. However, the polymorphism analysis helps to detect the G26D-GSTe3, H181Y-GSTe4 and E189A-GSTe4 alleles present in Benin and Cameroon, and T201S-GSTe6 and G201E-GSTe6 alleles present in Benin and Malawi and absent in Cameroon.

Furthermore, the structural characterization of the different alleles revealed that the presence of allelic variations increases the binding cavity at the active site of the GSTes G26-GSTe3 (37.88); Y/A-GSTe4 (29.18) and E/S-GSTe6 (19.45) and allows strong affinity with DDT and permethrin. The evaluation of insecticide metabolic activities of the synthesized proteins confirms that GSTes are able to eliminate DDT and permethrin. Only *GSTe4* proteins showed metabolic activity towards deltamethrin. However, the mutated proteins showed a greater ability to eliminate insecticides. Transgenic expression of GSTes in *Drosophila* showed that the expression of *GSTe3*, *GSTe4* and *GSTe6* and the presence of allelic variations confer

resistance to DDTs and pyrethroids. Similarly, the inhibition of the expression of *GSTe2*, *3*, *4*, *5* and *GSTe6* in mosquitoes by RNA interference technique increases their susceptibility to insecticides, confirming that the overexpression of GSTes contributes to insecticide resistance observed in *An. funestus*.

This study showed that the presence of L119F-GSTe2 allelic variation increases the ability of *An. funestus* to survive in the presence of pyrethroids, DDT, PermaNet 3.0, and PermaNet 2.0 mosquito nets. The opposite was observed with the Olyset Plus mosquito net.

This study was able to demonstrate that overexpression of *GSTe1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7* and *8* as well as the presence of allelic variations in *An. funestus* increase insecticide resistance and consequently reduces the effectiveness of vector control tools used in Cameroon.

**Keywords:** malaria; *Anopheles funestus*; metabolic resistance; glutathione s-transferase; transcriptomic analysis, genetic diversity, structural characterization, functional validation.

## INTRODUCTION

Le paludisme demeure, de par sa prévalence et sa gravité, l'une des principales parasitoses humaines et par conséquent un problème majeur de santé publique. D'après les récents rapports publiés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 241 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde en 2020 avec 627 000 décès (OMS, 2021). L'Afrique à elle seule a enregistré 95 % de la charge mondiale avec pour principales victimes les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. De même, le Cameroun n'est pas en reste à cette maladie, un cas de consultation sur quatre et un cas d'hospitalisation sur deux dans les formations sanitaires sont dus à cette maladie (PNLP, 2020). Les objectifs fixés dans la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 semblent loin d'être atteints dans les pays endémiques d'Afrique subsaharienne en dépit des efforts consentis dans la lutte contre le paludisme ces dernières années (OMS, 2020). En effet, le paludisme, est une maladie infectieuse due à un micro-organisme parasite du genre *Plasmodium* qui se transmet à l'homme par l'intermédiaire d'une piqûre de moustique du genre *Anopheles* (Smith *et al.*, 1994). Pour faire face à cette maladie, différentes interventions sont pratiquées à savoir : la lutte contre les moustiques vecteurs via l'utilisation des insecticides pour des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) et la pulvérisation intra-domiciliaire, la lutte contre le parasite chez l'homme à l'aide des antipaludiques et la validation de l'utilisation du vaccin antipaludique RTS, S/AS01 par l'OMS en octobre 2021 (OMS, 2021). Cependant, le paludisme reste toujours un problème majeur de santé publique et est considéré comme un facteur majorant la pauvreté de par son impact négatif sur le développement économique et humain dans les zones endémiques (Nchetnkou *et al.*, 2021; Sarma *et al.*, 2019). Une réduction du fardeau du paludisme avait été enregistrée entre 2000 et 2015 (Bhatt *et al.*, 2015), mais une augmentation du nombre de cas est observé depuis 2016 (OMS, 2021). Au vue de l'incidence persistante du paludisme, on pourrait se demander pourquoi après plusieurs décennies de lutte acharnée contre cette maladie, sa transmission et sa prévalence en Afrique restent si élevées. Plusieurs observations pourraient être évoquées pour expliquer la persistance du paludisme. En effet, pendant que le parasite développe les stratégies pour résister aux médicaments (Hyde, 2005; Wicht *et al.*, 2020), le moustique quant à lui développe les mécanismes de résistance pour assurer sa survie au contact de l'insecticide (Kleinschmidt *et al.*, 2018; Wondji *et al.*, 2012). En effet, l'une des premières barrières pour la lutte et le contrôle du paludisme en Afrique subsaharienne réside dans l'émergence de la résistance aux insecticides au sein des populations de vecteurs dû à leur utilisation en santé publique combinée aux pesticides utilisés en agriculture (Chouaibou *et al.*, 2016; Nkya *et al.*, 2014; Ranson and Lissenden, 2016).

Face à la pression de l'utilisation des insecticides depuis des décennies pour lutter contre les maladies, les vecteurs majeurs du paludisme tels qu'*Anopheles funestus* ont développé la résistance vis-à-vis de plusieurs classes d'insecticides à savoir les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates. Des études récentes ont permis de mettre en évidence l'association entre un niveau élevé de résistance aux insecticides et la perte d'efficacité significative des outils de lutte anti-vectorielle y compris les moustiquaires à base de synergiste tel que le piperonyl butoxide (PBO) chez les populations d'*An. funestus* (Ibrahim *et al.*, 2015; Menze *et al.*, 2018; Riveron *et al.*, 2018). Cette résistance aux insecticides est une grande menace pour une efficacité continue des outils de lutte anti-vectorielle (OMS, 2012) et entraîne par conséquent une augmentation du nombre de cas de paludisme depuis 2016 tel que rapporté par l'OMS (OMS, 2018). Plusieurs mécanismes de résistances sont mis en jeu par les anophèles donc les plus importants sont : la résistance par modifications de la cible et la résistance métabolique (Hemingway, 2000). Cependant, les bases moléculaires de la résistance métabolique sont complexes et impliquent entre autres une surexpression de gènes de détoxification tels que les cytochromes P450 (CYP450s), les glutathion s-transférases (GST) et les carboxylestérases (Liu *et al.*, 2011; Muleya *et al.*, 2008), et bien d'autres gènes/protéines tels que les protéines des appendices sensoriels récemment décrites (Ingham *et al.*, 2020).

De nombreuses études, y compris des analyses transcriptomiques à l'échelle du génome utilisant des puces à ADN/qPCR et une validation fonctionnelle, ont établi un lien entre la surexpression des glutathion s-transférases ainsi que la présence des variations alléliques de ces gènes sur la résistance des principaux vecteurs du paludisme aux insecticides (Ding *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2014; Ranson *et al.*, 2001). Pour le cas d'*An. funestus*, les progrès réalisés se sont concentrés sur l'étude de l'implication de GSTe2 dans la résistance permettant ainsi de mettre sur pied le premier marqueur de résistance à base d'ADN (L119F-GSTe2) couramment utilisé pour la surveillance de la résistance (Menze *et al.*, 2018; Riveron *et al.*, 2014; Tchouakui *et al.*, 2018). En plus, le gène *GSTe2* appartient à un cluster de GSTs de classe dite « epsilon » (GSTe) donc plusieurs gènes ont aussi exhibé une surexpression chez les moustiques résistants. Toutefois le rôle de ces gènes GST epsilon dans la résistance aux insecticides reste à déterminer. Le cluster epsilon des GST est constitué de 8 gènes nommés de *GSTe1* à *GSTe8*, mais à ce jour, la plupart d'études antérieures se sont concentrées sur le *GSTe2*, négligeant les 7 autres gènes de ce cluster malgré le fait qu'il a été démontré qu'ils sont également surexprimés lors de l'exposition des Anophèles aux insecticides (Fonseca-González *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2019; Ranson and Hemingway, 2005; Riveron *et al.*, 2013). D'où la nécessité d'étudier le rôle des autres GSTes sur la résistance aux insecticides chez *An. funestus*.

## Question de recherche

La surexpression du cluster epsilon des glutathion s-transférases accompagnée de variations alléliques sur leurs séquences seraient des facteurs pouvant conférer la résistance aux insecticides observée chez les vecteurs du paludisme tel qu'*Anopheles funestus* ?

## Hypothèse de recherche

Nous avons pour hypothèse de recherche que les glutathion s-transférases de la classe epsilon jouent un rôle important dans la capacité des moustiques de l'espèce *An. funestus* à survivre face à l'exposition aux insecticides.

## Objectifs de l'étude

L'objectif général de ce travail est de déterminer le rôle des glutathion s-transférases epsilon dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* en utilisant une approche de caractérisation fonctionnelle. Plus spécifiquement, il s'agit de :

- ✚ évaluer le profil d'expression des GSTes chez *Anopheles funestus* dans quelques pays d'Afrique et détecter des potentiels marqueurs de résistance ;
- ✚ réaliser la caractérisation structurale et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* ;
- ✚ évaluer l'impact de la variation allélique L119F de GSTe2 sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique.

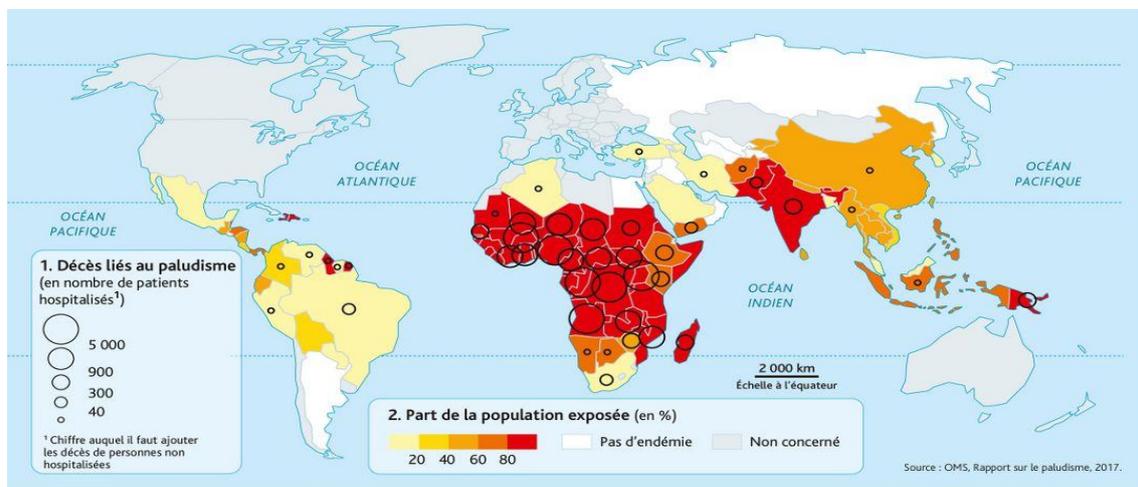
Le présent rapport est organisé en trois chapitres encadrés par une introduction et une conclusion. Le premier chapitre présente les généralités sur le paludisme, la résistance aux insecticides et l'implication des glutathion s-transférases dans la résistance aux insecticides. Le second porte sur la description des sites d'études, la méthodologie utilisée pour atteindre chaque objectif et la méthode d'exploitation des résultats. Le troisième chapitre s'étale sur la présentation et la discussion des principaux résultats obtenus.

## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## I.1. Généralités sur le paludisme

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

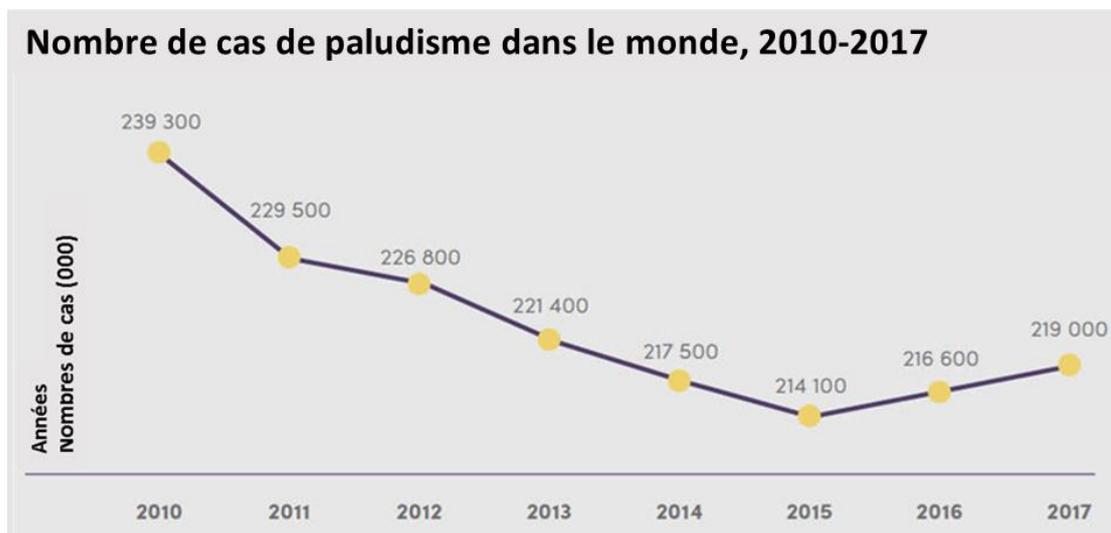
Connu depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et malgré la multiplication des moyens de lutte, le paludisme est toujours d'actualité et demeure un réel problème de santé publique dans le monde et plus particulièrement en Afrique subsaharienne (Steketee *et al.*, 2021). Le Paludisme se définit comme une maladie infectieuse due à un micro-organisme parasite du genre *Plasmodium* qui se transmet à l'homme par l'intermédiaire d'une piqûre de moustique du genre *Anopheles* (Smith *et al.*, 1994). Il se manifeste généralement par des épisodes fébriles aiguës accompagnées de frissons, maux de tête, maux de dos, douleurs articulaires, transpirations abondantes, nausées, vomissements, diarrhées et toux. En l'absence de traitement efficace et approprié, on peut évoluer vers un cas de paludisme dit « sévère », plus fréquent chez les enfants de moins de 5 ans, qui se manifeste entre autres par l'anémie sévère due à la destruction des globules rouges de l'enfant par le parasite, les convulsions, le coma, des troubles du comportement comme l'agitation, des propos incohérents et des hallucinations. Le paludisme sévère peut facilement conduire à la mort (Gupta *et al.*, 2021; Sevestre *et al.*, 2021). En effet, d'après les récents rapports publiés par l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2020, 241 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde avec environ 627 000 décès. En effet, l'Afrique est le continent le plus touché avec 95 % (228 millions de cas) de la charge mondiale et les couches les plus vulnérables sont les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (OMS, 2021). Cependant, une hausse du nombre de cas du paludisme de 2 % et du taux de mortalité de 12 % a été reporté en 2020 comparé à l'incidence de la maladie en 2019 où 224 millions de cas de paludisme et 558 000 de décès avaient été enregistrés (OMS, 2020, 2021). La Figure 1 montre la répartition du paludisme dans le monde.



© Belin Éducation/Humensis, 2019 Géographie, 2nd, 2019  
© EdiCarto

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

Néanmoins, une baisse significative de l'incidence et de la mortalité due au paludisme a été enregistrée entre 2000 et 2015 (Figure 2) (OMS, 2018) avec plus de 70 % de succès attribué à la lutte anti-vectorielle essentiellement menée au moyen de pulvérisations intra-domiciliaires à effet rémanent (PID) et des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) (Bhatt *et al.*, 2015). De même, dans ce domaine de la lutte anti-vectorielle, un certain nombre de nouveaux outils, de technologies et d'approches sont en cours de développement. Parmi les outils actuellement en phase de développement figurent notamment de nouveaux types de moustiquaires imprégnées d'insecticide, des répulsifs spatiaux contre les moustiques, des pièges à vecteurs et des appâts sucrés conçus pour attirer et tuer les moustiques (OMS, 2020).



**Figure 2 :** Évolution de l'incidence du paludisme dans le monde entre 2010 et 2017.  
Source : (OMS, 2018).

Encouragée par le succès des efforts de la lutte contre le paludisme à l'époque des Objectifs du Millénaire pour le développement (OMD), l'Assemblée mondiale de la Santé avait adopté en mai 2015 une nouvelle stratégie mondiale, comprenant des objectifs ambitieux pour d'avantage réduire l'incidence de cette maladie dans le monde entre 2016 et 2030 (OMS, 2020). Les objectifs intermédiaires et les avancés enregistrées jusqu'à 2020 sont consignés dans le Tableau I.

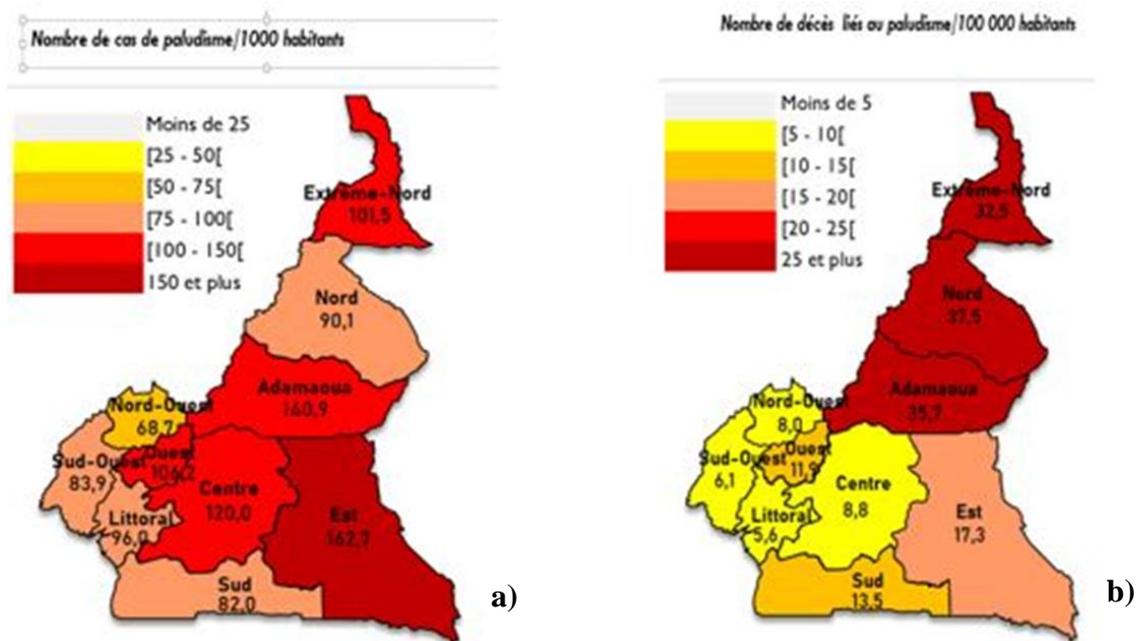
**Tableau I** : Stratégie mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 (OMS, 2020).

BUTS	OBJECTIFS INTERMÉDIAIRES		CIBLES
	2020	2025	2030
1. Réduire les taux de mortalité liée au paludisme au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40 % 18% de réduction obtenue 22% d'écart	Au moins 75 %	Au moins 90 %
2. Réduire l'incidence du paludisme au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40 % 3% de réduction obtenue 37% d'écart	Au moins 75 %	Au moins 90 %
3. Éliminer le paludisme des pays où il y avait transmission en 2015	Au moins 10 pays En bonne voie	Au moins 20 pays	Au moins 35 pays
4. Empêcher la réapparition du paludisme dans les pays exempts	Réapparition évitée En bonne voie	Réapparition évitée	Réapparition évitée

### I.1.2. Le paludisme au Cameroun

Le Cameroun fait partie des onze pays les plus touchés par le paludisme, avec 3 % de tous les cas de paludisme dans le monde et 3 % des décès dus au paludisme en 2019. Il est le troisième pays le plus touché d'Afrique centrale avec 12,7 % des cas (PMI, 2020). Le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus répandue sur l'ensemble du territoire national avec plus de 6 millions de cas et 15 048 décès dans les formations sanitaires enregistrés en 2020 (OMS, 2021). En 2020, il a été responsable de 23,6 % de consultation dans les formations sanitaires et 49,2% d'hospitalisation au Cameroun. Les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont les couches les plus affectées par cette maladie avec des prévalences nationales de 68,7 % et de 16,9 % respectivement (OMS, 2018; PNLP, 2020). Toutefois, entre 2016 et 2019, il y a eu des avancées dans la lutte contre le paludisme. Le nombre de cas a baissé de 3,7%, passant de 254 à 243 pour 1 000 habitants à risque. Durant la même période, le taux de mortalité a reculé de 17 %, passant de 0,52 à 0,43 pour 1 000 habitants à risque. Malgré cette baisse, les conséquences du paludisme sont très graves, car il contribue à la mortalité infanto-juvénile à travers les faibles poids de naissance, l'anémie sévère et les crises convulsives. Il contribue également à la mortalité maternelle à travers les avortements et les accouchements prématurés (PMI, 2019). Tout ceci entraîne de lourdes conséquences socio-économiques au regard du taux d'absentéisme au travail, la faible productivité, le faible rendement scolaire ainsi que la pauvreté des ménages faisant ainsi du paludisme une préoccupation majeure (Henderson *et al.*, 2020). La carte ci-dessous (Figure 3) montre l'incidence hospitalière du paludisme pour 1000 habitants dans les dix régions du Cameroun en 2019. Pour y remédier, le gouvernement

camerounais a fait de la lutte contre le paludisme une priorité, notamment dans sa stratégie nationale pour le secteur de la santé (2016-2027) (PNLP, 2020).



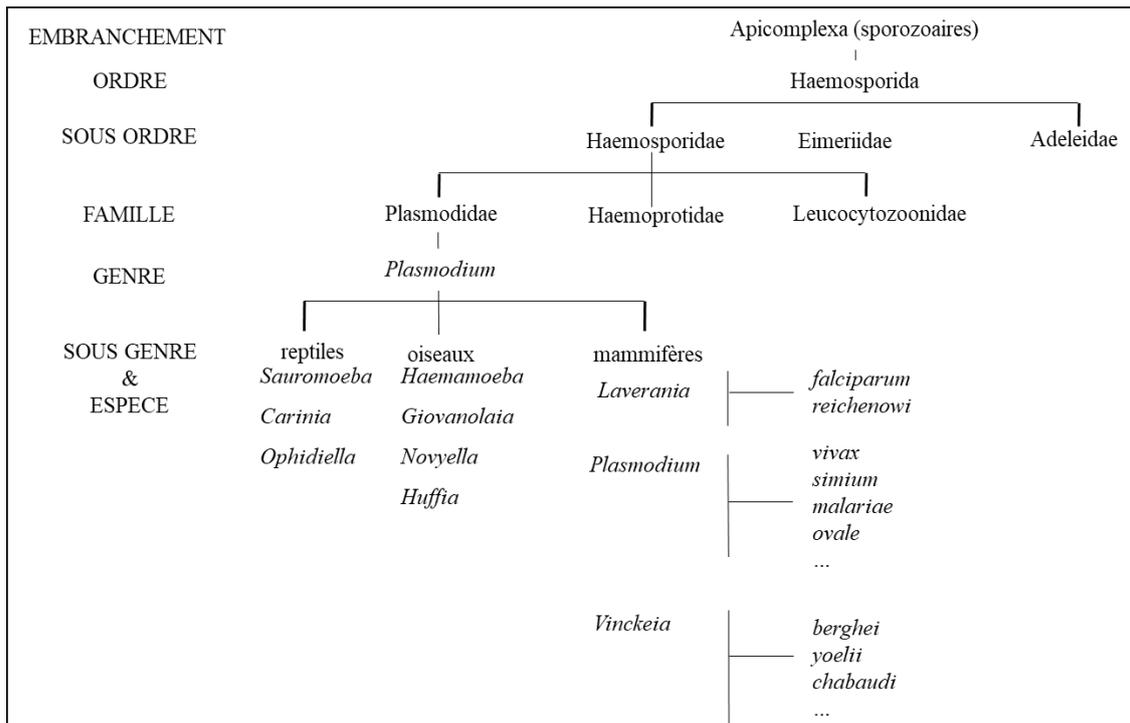
**Figure 3** : Incidence hospitalière du paludisme pour 1000 habitants dans les dix régions du Cameroun en 2019.

a) Nombre de cas de paludisme ; b) Nombre de décès liés au paludisme. (Source : PNLP, 2020)

## I.2. Agent pathogène du paludisme

### I.2.1. Systématique

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire unicellulaire qui ne peut survivre en dehors de son hôte. Il appartient à l'embranchement des Apicomplexa, à la classe des Sporozoea, à la sous-classe des Coccidia, à l'ordre des Euccocida, au sous-ordre des Haemosporina, à la famille des Plasmodiidae et au genre *Plasmodium*. Ce genre a été distingué des autres du fait qu'il soit capable d'infecter d'autres types cellulaires que les érythrocytes, et par sa capacité à être transmis par des vecteurs diptères (Gilles, 1993). Le genre *Plasmodium* comprend plus de 140 espèces (ANOFEL, 2014) réparties en dix sous-genres, dont trois sont spécifiques de mammifères (primates et rongeurs), quatre des oiseaux et trois des reptiles. Des trois sous-genres de mammifères, seuls *Plasmodium* et *Laverania* sont ceux retrouvés chez les primates (Figure 4).



**Figure 4 :** systématique du genre *Plasmodium* d'après Bruce-Chwatt (Bruce-Chwatt,1980).

### I.2.2. Agents responsables du paludisme chez l'homme

Le séquençage complet du génome de *P. falciparum* a conduit à la découverte de nouvelles techniques de phylogénies moléculaires et d'analyses de la structure du génome à l'échelle globale (Das *et al.*, 2007). Cependant, parmi toutes les espèces de *Plasmodium* identifiées dans le monde, seules cinq sont responsables du paludisme chez l'homme (ANOFEL, 2014), à savoir : *P. falciparum* (Welsh, 1897), *P. ovale* (Stephens 1892), *P. vivax* (Grassi & Feletti 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881)) et *Plasmodium knowlesi* (Sinton et Mulligan, 1933) récemment reconnu comme la cinquième espèce de *Plasmodium* causant le paludisme dans les populations humaines en Asie du Sud-Est. Ces plasmodies humaines sont très distantes phylogénétiquement l'une de l'autre, leur divergence évolutive étant antérieure à l'origine des hominidés (Annan, 2007).

✚ ***Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)** : espèce la plus pathogène, elle est présente mondialement dans les régions tropicales, particulièrement en Afrique subsaharienne. La période d'incubation est de douze jours en moyenne et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce maligne. La première infection est sévère et peut engendrer des complications susceptibles d'entraîner la mort du sujet infecté en l'absence de traitement (Manguin *et al.*, 2010). C'est un parasite d'hématies de tous les âges, la schizogonie

érythrocytaire se faisant dans les organes profonds. En cas de complication, le parasite peut passer dans le système nerveux central ; on parle alors de neuropaludisme (Mouchet, 2004).

✚ **Plasmodium vivax (Grassi et Feletti, 1890)** : espèce présente dans de nombreuses parties du monde à côté de *P. falciparum*. Elle est moins exigeante en température que *P. falciparum* durant sa phase de développement chez le moustique et elle se retrouve aussi dans les régions tempérées. *Plasmodium vivax* est surtout prévalent en Asie, en Amérique latine et dans quelques pays d'Afrique (Wirtz *et al.*, 1987). La période d'inoculation dure de huit à vingt-sept jours et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce bénigne. Capable de persistance à l'état latent dans le foie de l'homme sous forme d'hypnozoïte, *P. vivax* peut entraîner des cas de rechute jusqu'à huit ans après la première infection (Cornejo and Escalante, 2006; Loy *et al.*, 2017).

✚ **Plasmodium malariae (Laveran, 1881)** se rencontre dans toute la région afro-tropicale à des fréquences très variables de 2 à 45 %. Elle est généralement plus fréquente dans les zones forestières. Elle est à l'origine de la fièvre quarte bénigne à recrudescence tardive. Sa longévité est d'environ 21 jours et elle s'attaque principalement aux hématies vieilles. Sa recrudescence peut aller jusqu'à 10 ou 20 ans, par réactivation de formes érythrocytaires latentes malgré l'absence d'hypnozoïtes (Robert *et al.*, 1996). Cette espèce a été trouvée chez les chimpanzés et gorilles au Cameroun (Collins and Jeffery, 2007).

✚ **Plasmodium ovale (Stephens, 1922)** : moins prévalente, c'est une espèce trouvée principalement en Afrique et dans les îles du Pacifique occidental. Longtemps confondue à la précédente, elle a été décrite comme remplaçant *P. vivax* chez les sujets Duffy négatifs (Molineaux *et al.*, 1980). Le délai de prépatence est d'environ seize jours et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce bénigne. Tout comme *P. vivax* dont il est similaire morphologiquement et biologiquement, *P. ovale* peut persister sous forme endormie dans le foie (d'hypnozoïtes hépatiques) et entraîner des cas de rechute des années après la première infection (Groger *et al.*, 2017).

✚ **Plasmodium knowlesi (Knowles, 1932)** : connue antérieurement comme parasite de singes, cette espèce a été découverte récemment chez l'homme dans plusieurs pays d'Asie du Sud (Lee *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2004). Bien que sa morphologie ressemble à celle de *P. malariae*, *P. knowlesi* a une symptomatologie similaire à celle de *P. falciparum*, pouvant

conduire à la mort de l'homme infecté (Cox-Singh et al., 2010). Le délai de prépatence dure neuf à douze jours dans d'une infection à *P. knowlesi* (Zaw and Lin, 2019).

Plusieurs de ces parasites se seraient retrouvés associés à l'homme par transfert latéral à partir d'autres espèces d'hôtes vertébrés (Garnham, 1966). *P. reichenowi*, parasite de chimpanzés et de gorilles, est le seul proche parent connu de *P. falciparum* et est classé avec lui à part dans le sous-genre *Laverania* (Figure 4) ; relation phylogénétique confirmée par les études de biologie moléculaire (Ayala et al., 1999).

### **I.2.3. Cycle de développement du Plasmodium**

Le cycle de développement du Plasmodium est hétéroxène. Il comprend un hôte intermédiaire, ici l'homme, et un hôte définitif, le moustique femelle du genre Anophèles. Le Plasmodium se reproduit suivant deux types de multiplication : une multiplication asexuée appelée schizogonie qui se déroule chez l'homme et une multiplication sexuée appelée sporogonie qui se déroule chez le moustique, raison pour laquelle ce dernier est l'hôte définitif (Barrera et al., 2007) (Figure5).

#### **🚦 Phase asexuée chez l'Homme**

Il s'agit de la phase asexuée du cycle du parasite. La transmission du parasite d'un Homme à un autre se fait par l'intermédiaire de l'anophèle femelle infectée, au moment de la prise du repas sanguin. Chez l'homme, le cycle comprend deux phases, une phase exo-érythrocytaire (schizogonie exo-érythrocytaire ou pré-érythrocytaire ou hépatique) et une phase érythrocytaire comprenant la schizogonie érythrocytaire et la gamétocytogénèse. La gamétocytogénèse est le processus de formation des gamétocytes qui marque l'initiation de l'étape sexuelle du Plasmodium (Doolan, 2011).

#### **- La phase hépatique ou pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire**

L'anophèle femelle sonde la peau avec son proboscis à la recherche des vaisseaux sanguins, puis inocule une salive anticoagulante et agglutinante. Les sporozoïtes sont alors inoculés dans les tissus intracutanés et dans les capillaires sanguins de l'hôte vertébré. Les sporozoïtes mobiles circulent dans la peau, la lymphe et le sang pendant moins d'une heure puis, gagnent les hépatocytes. Dans l'hépatocyte, le noyau du sporozoïte devient un schizonte (hépatique) à la suite d'un certain nombre de divisions et chaque noyau fils s'entoure d'une portion de cytoplasme pour devenir un mérozoïte. Après 7 à 15 jours de maturation, les schizontes éclatent et libèrent les mérozoïtes qui gagnent la circulation sanguine (Miller et al., 1975).

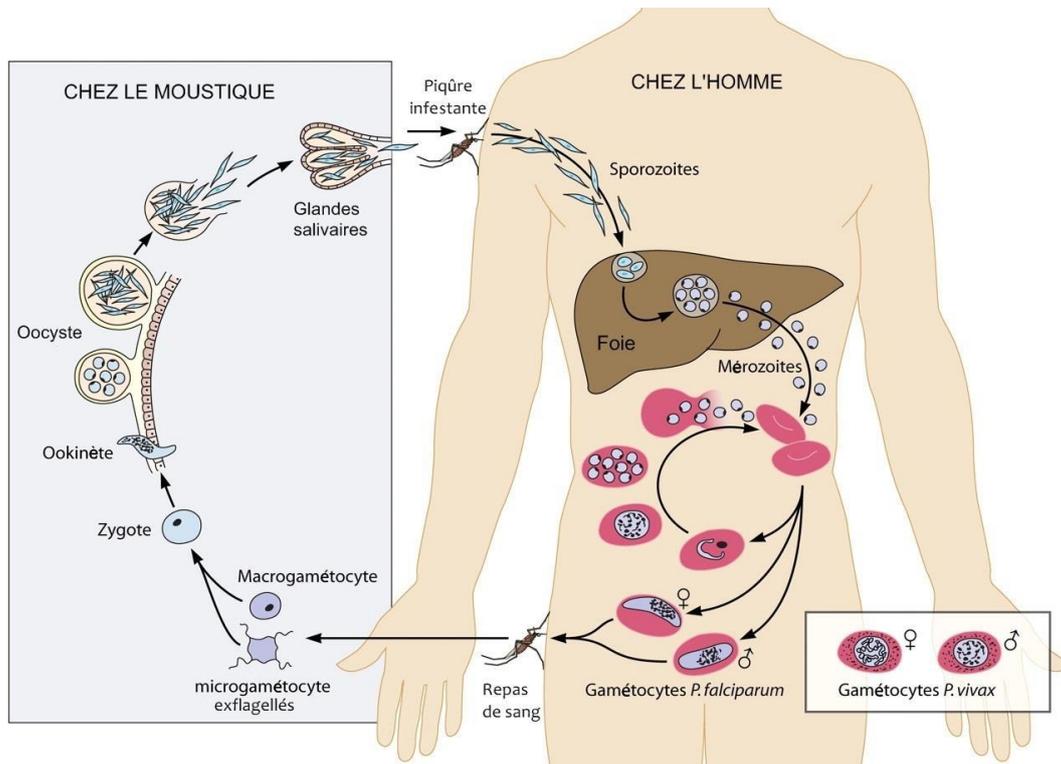
### - **La phase sanguine ou érythrocytaire**

Une fois dans la circulation sanguine, les mérozoïtes pénètrent très rapidement les hématies, augmentent de volume pour devenir des trophozoïtes et divisent leurs noyaux plusieurs fois pour devenir des schizontes (érythrocytaires). Les schizontes devenus matures, ou corps en rosace éclatent et libèrent les mérozoïtes dont certains vont pénétrer de nouveaux globules rouges et débiter un nouveau cycle schizogonique. La durée de ce cycle de réplication varie de 24 heures pour *P. knowlesi* à 48 heures pour *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. ovale*, et à 72 heures pour *P. malariae*. Cependant, certains stades prémérozoïtes encore appelés hypnozoïtes demeurent dormants dans le foie puis, à un moment donné, prédéterminé selon l'espèce et la souche, commencent à se développer et à entreprendre leur schizogonie exoérythrocytaire (Bray and Garnham, 1982). Ceci sera à l'origine de nouveaux mérozoïtes qui vont envahir le sang et se multiplier dans les globules pour déclencher de véritables rechutes. Après plusieurs cycles, certains mérozoïtes vont subir une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée et se transformer en gamétocytes à potentiel mâle ou femelle dont les stades matures, bloqués, restent dans le sang périphérique de l'Homme. C'est la première étape de la phase asexuée (Bozdech *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2018).

### **Phase sexuée proprement dite chez le moustique vecteur**

Au cours de la prise de son repas sanguin sur un homme impaludé, l'anophèle femelle ingère avec les globules rouges, tous les stades parasitaires présents dans le sang capillaire. Les parasites asexués sont digérés et seuls les gamétocytes assurent la poursuite du cycle. Pour ce qui est de la cinétique de développement du plasmodium chez l'anophèle, après la demi-heure suivant leur ingestion dans l'estomac de l'anophèle, les gamétocytes vont subir la gamétogénèse. Le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète femelle tandis que le gamétocyte mâle subit une série de divisions nucléaires rapides aboutissant à la formation de huit microgamètes mâles. Une heure après l'ingestion, les gamètes mâles et femelles, donnent par fécondation, un œuf diploïde ou zygote au sein duquel se déroule la méiose. Au cours des vingt-quatre heures suivant l'ingestion, le zygote se développe en une forme mobile allongée appelée ookinète (Sinden *et al.*, 1985). Trente à quarante-huit heures après l'ingestion, l'ookinète traverse la matrice périthrophique, pénètre dans les cellules épithéliales stomacales et s'enkyste au niveau de la membrane basale pour former l'oocyste. Pendant sept à neuf jours, dans l'oocyste, le noyau de l'ookinète subit des divisions mitotiques et se différencie en milliers de sporozoïtes haploïdes. A maturité, l'oocyste éclate et libère les sporozoïtes qui envahissent les glandes salivaires ; invasion facilitée par le mouvement péristaltique de l'hémolymphe dans

le vaisseau dorsal du moustique (Hillyer *et al.*, 2007). De ce réservoir où ils finissent leur maturation, les sporozoïtes pourront être injectés à l'homme avec la salive du moustique lors de la prise d'un nouveau repas de sang, débutant ainsi un nouveau cycle. La durée de la sporogonie est fonction de l'espèce plasmodiale, de l'espèce anophélienne et des conditions de température ambiante (Collins, 2012).



**Figure 5 :** Cycle biologique de développement de plasmodium. (modifié de Bousema & Dra-keley, 2011)

### I.3. Les vecteurs du paludisme

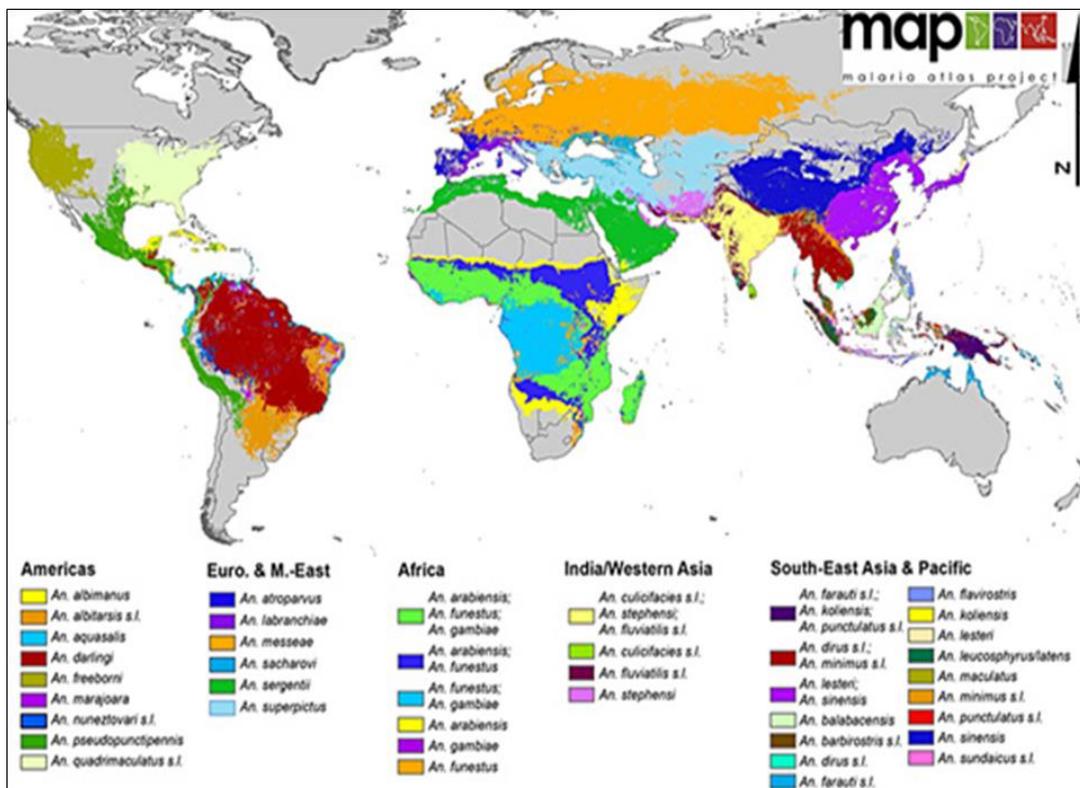
#### I.3.1. Diversité et répartition géographique des anophèles

Le plasmodium, agent responsable du paludisme est transmis à l'homme par la piqûre du moustique du genre *Anopheles* qui comprend près de 528 espèces dont environ 41 ont été établies comme vecteurs dans le monde (Harbach, 2011; Sinka *et al.*, 2012) . La faune anophélienne d'Afrique est estimée à 160 espèces, mais seul 16 sont d'excellents vecteurs (Mouchet *et al.*, 2004). Le continent africain paye le plus gros fardeau car il possède les espèces vectrices les plus efficaces et efficientes du paludisme humain (Gillies and Coetzee, 1987), notamment ceux du complexe *An. gambiae* s.s. (Guerra *et al.*, 2008) et du groupe *An. funestus* s.l. (Coetzee and Fontenille, 2004).

Pour ce qui est de la répartition du paludisme dans le monde, il dépend en partie des conditions locales, ce qui explique l'hétérogénéité de la distribution du paludisme. De même,

la distribution des anophèles peut être locale ou régionale (Figure 6). Toutefois, contrairement à certaines espèces d'*Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, vecteurs des virus de la dengue, du Chikungunya) ou de *Culex* (*C. quinquefasciatus*, vecteur des virus du West Nile, de l'Encéphalite de St. Louis) qui ont colonisé plusieurs continents, aucune espèce anophélienne n'a de distribution cosmopolite (Manguin *et al.*, 2008). Dans le monde, on distingue :

- ✚ des zones impaludées avec anophèles (Europe, Amérique du Nord, continent antarctique, Groenland, Islande, Polynésie centrale et orientale); on parle d'anophélisme sans paludisme c'est-à-dire l'existence des anophèles vecteurs, mais sans parasite ;
- ✚ des zones d'endémie palustre (Afrique sub-saharienne) où il y a coexistence des anophèles vecteurs et/ou non avec leur parasite.



**Figure 6** : Carte mondiale des espèces vectrices dominantes du paludisme.

Source : (Carnevale *et al.*, 2009)

### I.3.2. Position systématique du genre *Anopheles*

La classification des anophèles a été décrite pour la première fois par l'entomologiste Johann Wilhelm Meigen en 1818 telle que présentée dans la Figure 7. Les Anophèles sont des membres de l'embranchement des Arthropoda, classe des Insecta, sous-classe des Pterygota,

ordre des Diptera, sous-ordre des Nematocera, famille des Culicidae, sous-famille des Anophelinae (Knight and Stone, 1977).

Embranchement	: Arthropoda	(= pattes articulées)
Classe	: Insecta	(= corps segmenté en trois parties)
Sous-classe	: Pterygota	(= avec des ailes)
Ordre	: Diptera	(= avec 2 ailes)
Sous-ordre	: Nematocera	(= avec antennes rondes et longues)
Famille	: Culicidae	(= moustiques)
Sous-famille	: Anophelinae	(= anophèle)
Genres	: <i>Anopheles</i> , <i>Bironella</i> , <i>Chagasia</i>	

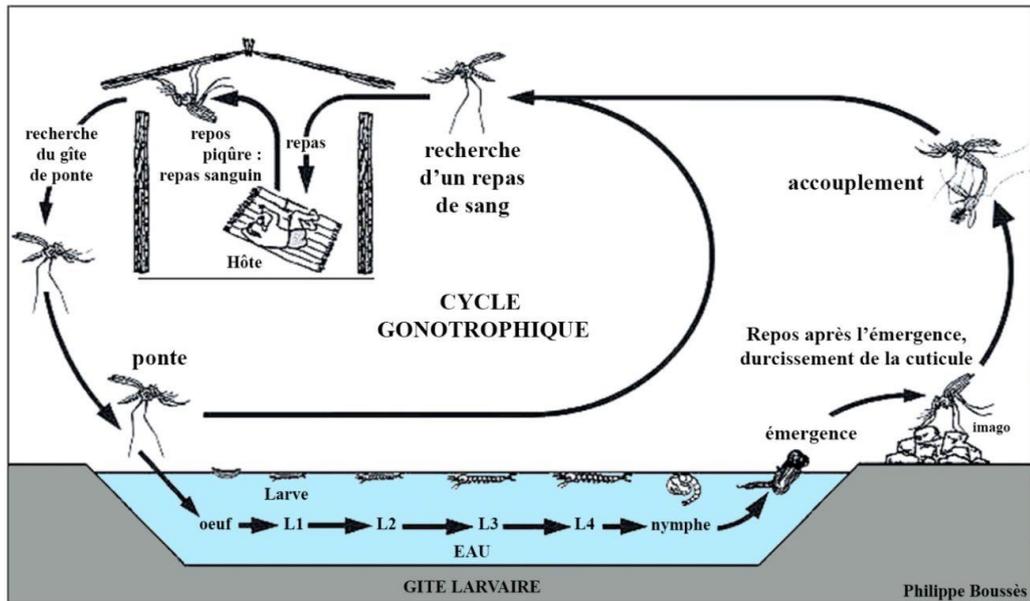
**Figure 7** : Position systématique des anophèles.

Source : (Knight and Stone, 1977)

On dénombre environ 528 espèces d’anophèles dont 41 transmettent efficacement le paludisme dans le monde (Harbach, 2011; Sinka *et al.*, 2012). Leur distribution et leur capacité vectorielle varient selon les régions géographiques. La faune anophélienne d’Afrique est estimée à 160 espèces, mais seul 16 sont d’excellents vecteurs (Mouchet *et al.*, 2004). Trois espèces à savoir *An. gambiaes* s.s., *An. arabiensis*, et *An. funestus* s.s. sont considérées comme vecteurs majeurs et appartiennent à des complexes ou groupes d’espèces (Fontenille *et al.*, 2003; Fontenille and Simard, 2004). Toutefois, certaines espèces telles qu’*An. nili* s.s., *An. moucheti* s.s., *An. carnevalei*, *An. coustani*, *An. flavicosta*, *An. hancocki*, *A. melas*, *A. merus*, *An. ovengensis*, *An. paludis*, *An. pharoensis*, *An. rufipes* et *An. ziemanni* sont considérées comme des vecteurs secondaires ou d’importance locale et ont un faible rôle dans l’épidémiologie de la transmission du paludisme (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006; Antonio-Nkondjio and Simard, 2013; Kerah *et al.*, 2009; Tabue *et al.*, 2014).

### I.3.3. Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes dont le cycle de vie comporte une métamorphose complète, ce sont des holométaboles et leur développement est caractérisé par une succession de deux phases : une phase aquatique (œuf, larve et nymphe) et une phase aérienne (adulte) (Figure 8).



**Figure 8 :** Cycle de développement des anophèles.

Source : (Carnevale *et al.*, 2009).

### 🚦 Phase aquatique

Les œufs d'anophèles pondus séparément sont munis de flotteurs qui leur permettent de rester à la surface de l'eau durant l'embryogenèse. Sous des conditions favorables de température, l'incubation des œufs dure deux à trois jours et après éclosion, les œufs donnent naissance aux larves de stade I (L1) mesurant environ 1 mm qui vont évoluer par des mues successives pour donner des larves de stades II (L2), III (L3) et IV (L4) mesurant de 5 mm à 1 cm. Comme tous les autres culicidés, les larves d'anophèles se nourrissent en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Au terme de leur développement, elles subissent une mue particulière, la nymphose, pour donner des nymphes mobiles qui ne se nourrissent pas. De profonds remaniements morphologiques vont se produire au sein de la nymphe et, de cette dernière émergera un moustique adulte mâle ou femelle. Cependant, bien qu'étant des stades aquatiques, les larves et nymphes ont une respiration aérienne. A la température de 25 °C, la durée de la phase aquatique est d'une dizaine de jours pour *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* (Coetzee and Fontenille, 2004). En effet, plus la température est élevée, plus la durée de la phase aquatique se raccourcit (Youmsi and Marlène, 2018).

### 🚦 Phase aérienne : émergence, accouplement et cycle gonotrophique

L'émergence a lieu à la surface du plan d'eau et dure quelques minutes. Sous l'effet de la pression interne, la cuticule nymphale éclate sur une ligne médiodorsale du céphalothorax, l'adulte se dégage rapidement de l'exuvie et s'envole dès que ses ailes ont séché. Après

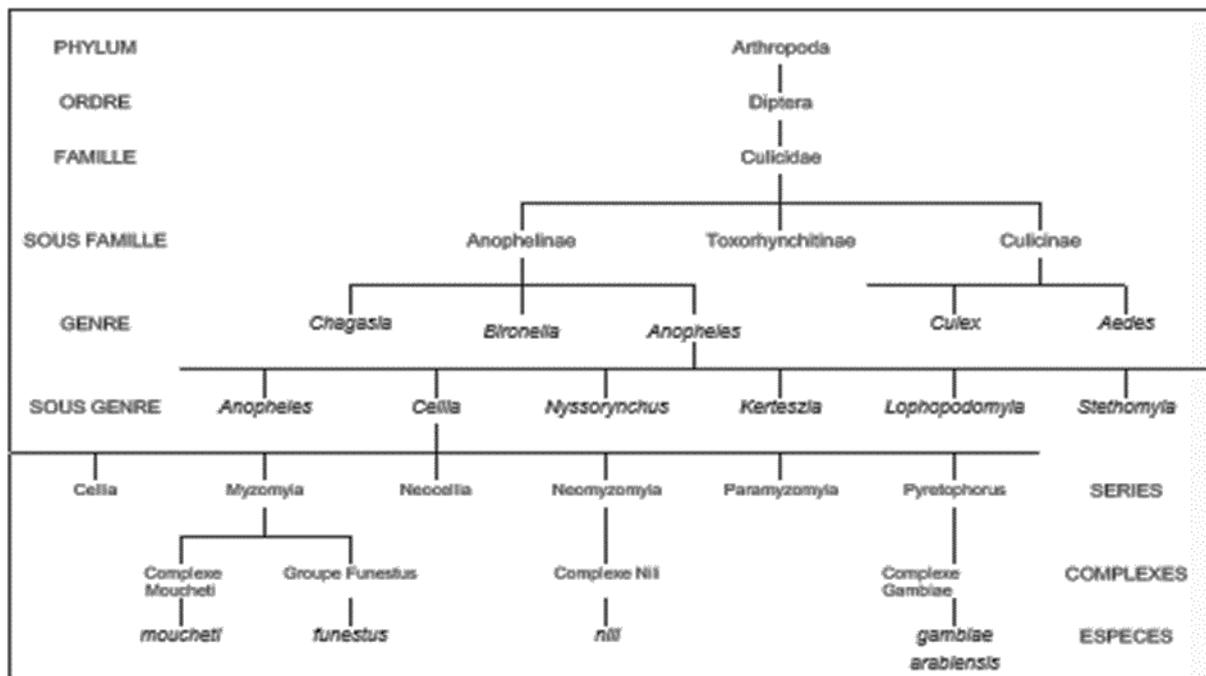
l'émergence, les femelles ont besoin de douze à vingt-quatre heures et les mâles de soixante-douze heures pour que leur cuticule durcisse et que les organes de reproduction mâles se mettent en place. Cette maturation se fait par une rotation de 180 degrés de l'appareil génital et de l'extrémité abdominale (Clements, 1992).

Avant l'accouplement, les mâles peuvent former des essaims observables à quelques mètres du sol et généralement au crépuscule (Diabaté *et al.*, 2006; Manoukis *et al.*, 2009). La copulation, de courte durée (quelques secondes) peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre lorsque le couple (la femelle accrochée par les claspers du mâle) est au sol (Carnevale *et al.*, 2009; Charlwood *et al.*, 2002). De manière générale, les femelles d'anophèles ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Clements, 1999).

Pour assurer la survie de l'espèce, les femelles ont besoin de prendre du sang, car les protéines du sang sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. De ce fait, seule la femelle est hématophage. La succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez la femelle entre deux repas de sang successifs constitue le cycle gonotrophique (Carnevale *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2001). Il est composé de trois phases : recherche de l'hôte vertébré et prise du repas de sang ; digestion du sang et maturation ovarienne ; et pour finir recherche du lieu de ponte et ponte. La durée du cycle gonotrophique varie entre deux et trois jours pour les femelles pares (c'est-à-dire ayant effectué au moins une ponte) et jusqu'à cinq jours pour les femelles nullipares (n'ayant pas encore effectué une ponte) (Danis and Mouchet, 1991; Detinova *et al.*, 1962). Deux à trois jours après la prise du repas de sang, l'anophèle femelle pond des œufs sur l'eau. La fécondité varie selon les espèces et d'autres facteurs comme l'âge et la saison. De nombreuses espèces prennent d'abord un repas de sang avant de s'accoupler (Charlwood *et al.*, 2003).

#### **I.3.4. Relations phylogénétiques entre les anophèles vecteurs du plasmodium**

La Figure 9 indique les relations phylogénétiques entre les cinq espèces majoritairement impliquées dans la transmission du paludisme en Afrique à savoir : *Anopheles gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. Moucheti*.



**Figure 9 :** Classification partielle des anophèles.  
Source : (Bruce-Chwatt and Pull, 1980; Harbach, 2004).

### I.3.5. Les membres du complexe *Anopheles funestus*

Largement distribuée en Afrique subsaharienne, *An. funestus* est l'un des principaux vecteurs africains du paludisme (Coetzee and Koekemoer, 2013). *An. funestus* sensu stricto appartient à un groupe de 13 espèces morphologiquement très proches au stade adulte (Coetzee and Fontenille, 2004; Dia *et al.*, 2013). *Anopheles funestus* est un endophage principalement anthropophile avec une endophilie marquée (Grjebine, 1966; Tantely *et al.*, 2016). Ses gîtes larvaires sont les eaux semi-permanentes ou permanentes à végétation dressées telles les rizières en phase d'épiaisons, les ruisseaux, les drains d'irrigation. Le complexe d'*anopheles funestus* est divisés en trois sous-groupes à savoir :

- ✚ **le sous-groupe Funestus** : il est constitué de 7 espèces donc 4 possèdent une morphologie identique à tous les stades de la vie à savoir *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. parensis* et *An. aruni*. Les autres membres de ce sous-groupe sont *An. funestus-like*, *An. confusus* et *An. longipalpis type C* (Gillies and Coetzee, 1987; Gillies and De Meillon, 1968) ;
- ✚ **le sous-groupe Minimus** : composé d'*An. lesoni* et *An. longipalpis type A* ;
- ✚ **le sous-groupe Rivulorum** : qui comprend *An. rivulorum*, *An. brucei* et *An. fuscivenosus*.

*Anopheles lesoni* est le plus distinct au stade de l'œuf et de la larve, tandis qu'*An. confusus* est facilement identifiable sur les caractéristiques larvaires. *An. rivulorum* et *An.*

*brucei* ont également des larves distinctes bien que ces deux espèces soient pratiquement indiscernables l'une de l'autre. Cependant seul *An. funestus* s.s, est très anthropophile, le reste du groupe est principalement zoophile. Néanmoins, *An. rivulorum* a été impliqué comme vecteur mineur dans une localité de Tanzanie (Wilkes *et al.*, 1996). *An. funestus* est présent partout sur le continent africain (Figure 6), tandis que les autres espèces présentent une distribution locale à travers le continent (Dia *et al.*, 2013). Pour ce qui est de la distribution géographique des espèces *Anopheles funestus*, *An. parensis*, *An. fuscivenosus*, *An. confusus* et *An. aruni* ne sont présentes qu'en Afrique de l'Est, *An. vaneedeni* est localisé en Afrique du Sud, et *An. brucei* est rapporté au Nigeria, alors qu'*An. funestus* s.s., *An. lesoni* et *An. rivulorum* s.s. sont largement présents sur l'ensemble de l'Afrique subsaharienne (Coetzee and Fontenille, 2004) .

Pendant qu'*An. gambiae* se reproduit généralement dans de petites mares et flaques temporaires dépendantes de la pluie, *An. funestus* se développe dans de plans d'eau permanents ou semi-permanents contenant de la végétation émergente (Serazin *et al.*, 2009). *An. funestus* est plus abondant en saison sèche alors que les densités d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* ont diminué, prolongeant ainsi la période de transmission du paludisme (Gillies and De Meillon, 1968). *An. funestus* est le principal vecteur de la transmission du paludisme dans de nombreux endroits et a été impliqué dans des épidémies de paludisme (Fontenille *et al.*, 1990, Hargreaves *et al.*, 2003). Des taux d'infection plasmodiale élevés ont été reportés chez *An. funestus* au Cameroun (Tchouakui *et al.*, 2019).

Malgré son implication dans la transmission du paludisme, le moustique du genre *An. funestus* a été négligé pendant près d'un demi-siècle, la plupart des recherches se concentrant sur les membres du complexe *An. gambiae* (Coetzee and Fontenille, 2004). Cette négligence a été attribuée à la difficulté de coloniser *An. funestus* en laboratoire notamment *An. funestus sensu stricto* qui est le principal vecteur de ce groupe comparé à l'adaptabilité de *An. gambiae* aux conditions de laboratoire ainsi que la facilité avec laquelle les espèces de ce groupe peuvent être colonisées. Toutefois, des progrès récents permettant la manipulation de cette espèce en insectarium fournissent maintenant la possibilité d'étudier plusieurs aspects biologiques et génétiques d'*An. funestus* dont nous avons pris l'avantage pour nos travaux.

#### **I.4. Moyens de lutte contre le paludisme**

Bien que l'éradication du paludisme demeure un défi surtout en Afrique qui représente le plus gros fardeau du paludisme, l'implication des différents acteurs de la lutte contre le paludisme, des bailleurs de fonds aux Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme

(PNLP) et autres acteurs sur le terrain, permet d'accentuer la lutte et d'intervenir dans des zones de plus en plus étendues, dans une tentative sans précédent de réduire significativement et durablement la transmission de Plasmodium et ses conséquences sur les populations vivant en zone d'endémie. Les méthodes actuelles de contrôle du paludisme ciblent le parasite et le vecteur.

#### **I.4.1. Lutte antiparasitaire**

Réduire l'intensité de la transmission du parasite passe par la réduction du nombre de porteurs de parasites susceptibles de permettre l'ingestion de ces derniers par des anophèles femelles lors d'un repas sanguin à travers : le diagnostic, le développement d'un vaccin, et le traitement efficace de l'infection.

##### **I.4.1.1. Le diagnostic**

Il est préalable au traitement et doit se faire de façon précoce et fiable afin de limiter le plus tôt possible les dommages causés par la maladie (morbidité et mortalité), l'apparition et la distribution des gènes de résistance aux médicaments utilisés pour le traitement. De nos jours, le diagnostic du paludisme passe par différentes techniques parmi lesquelles la goutte épaisse et le test de diagnostic rapide (TDR) (A-Elgayoum *et al.*, 2009; Parajuli *et al.*, 2009).

##### **I.4.1.2. Traitements médicamenteux chez l'homme**

Le traitement médicamenteux a pour objectif de guérir le sujet infecté en éliminant rapidement et totalement les plasmodies de son sang. Ceci afin d'éviter des complications pouvant conduire à une infection chronique et potentiellement à la mort. Du point de vue de la santé publique, un traitement efficace a aussi pour but de réduire la transmission du paludisme en diminuant les réservoirs, principalement les porteurs de gamétocytes, et d'éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (OMS, 2018). Les molécules utilisées dans le traitement curatif sont entre autres :

- ✚ **les antipaludiques naturels ou d'hémi-synthèse** : nous avons la quinine, l'artémisinine. La quinine agit principalement sur les trophozoïtes matures de l'hématozoaire et n'empêche ni la séquestration ni le développement ultérieur des stades annulaires circulants de *P. falciparum*. L'artémisinine est un puissant schizonticide sanguin à action rapide, actif contre toutes les espèces de Plasmodium. Face aux hématozoaires asexués, elle est dotée d'un spectre d'activité d'une étendue inhabituelle, puisqu'elle tue aussi bien les stades annulaires, jeunes que les schizontes (OMS, 2011) ;

- ✚ **les antipaludiques de synthèse** : la chloroquine et l'amodiaquine sont des molécules qui agissent en perturbant la détoxification de l'hème par le parasite. Une résistance très répandue à la chloroquine la rend désormais pratiquement inutilisable contre les infestations à *P. falciparum* dans la plupart des régions du monde, mais elle reste néanmoins extrêmement efficace contre les infestations à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Cependant, l'amodiaquine est efficace contre certaines souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes (Bissagnéné, 2008; Howes *et al.*, 2016) ;
- ✚ **les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA)** : c'est une combinaison qui consiste à associer un antipaludique à courte durée d'action (un dérivé de l'artémisinine) et un autre antipaludique à action prolongée (amodiaquine, luméfantine, méfloquine, sulfadoxinepyriméthamine...) en vue de mettre à profit l'association synergique ou additive afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et de retarder l'apparition d'une résistance. Parmi les CTA recommandées par l'OMS, nous pouvons citer : Artémether-luméfantine ; Artésunate + amodiaquine ; Artésunate + sulfadoxine pyriméthamine et Artésunate + méfloquine (OMS, 2015).

En outre, il existe également des moyens de prévention médicamenteuse tels que la chimioprophylaxie chez la femme enceinte (sulfadoxine pyriméthamine) ; le traitement préventif intermittent chez les nourrissons (sulfadoxine pyriméthamine) et la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants de 6 mois à 5 ans (amodiaquine+sulfadoxine pyriméthamine). La chimioprophylaxie du paludisme est l'utilisation de médicaments antipaludiques pour prévenir l'apparition des symptômes du paludisme (Schlagenhauf *et al.*, 2010), en particulier chez les voyageurs en provenance de régions exemptes de paludisme se rendant dans des zones endémiques (Schlitzer, 2008). Malheureusement, la résistance aux antipaludiques pose un problème pour le contrôle du paludisme (Ashley *et al.*, 2014; Cowman and Foote, 1990; Maude *et al.*, 2014; White *et al.*, 2014).

#### **I.4.1.3 Vaccins antipaludiques**

Au vu du développement de la résistance des plasmodiums aux antipaludéens et des moustiques aux insecticides observé ces dernières années qui freine l'éradication du paludisme ; la mise sur pied d'un vaccin efficace demeure une solution majeure pour le contrôle du paludisme. A cet effet, de nombreuses recherches de développement de vaccin antipaludique sont en cours. Cependant ; le cycle de vie complexe du Plasmodium chez l'homme ainsi que la grande variabilité antigénique des protéines nécessaires au cycle de vie du parasite, représentent un défi pour le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme. Par conséquent, il

existe de nombreuses approches différentes pour le développement de vaccins antipaludiques. Ils comprennent le ciblage de la production d'anticorps spécifiques contre les antigènes exprimés par les différents stades parasitaires (Douglas *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017; Sauboin *et al.*, 2015). Le premier vaccin avait été testé en 2009 dans sept pays, chez plus de 15 000 enfants, ce vaccin avait montré une efficacité pour prévenir les épisodes de paludisme clinique et les épisodes de paludisme grave. Cependant, cette efficacité n'était pas suffisante pour qu'une stratégie vaccinale opérationnelle puisse être envisagée (Greenwood and Targett, 2009; Saul, 2007). A ce jour, seul le Vaccin Mosquirix ou RTS, S/AS01 antigénique recombinant dirigé contre les protéines de surface des sporozoïtes du *P. falciparum* a dépassé la phase III de son développement clinique et a été validé par l'OMS en octobre 2021 pour son application chez les enfants de moins de 5 ans. Développé par le géant pharmaceutique britannique GlaxoSmithKline en avril 2019, ce vaccin réduit l'incidence de cas de paludisme de 39 % et réduit les cas de paludisme grave de 31,5 % parmi les enfants de 5 à 17 mois ayant reçu quatre doses de vaccins (Duffy and Gorres, 2020; Kazmin *et al.*, 2017; Kurtovic *et al.*, 2020; Suscovich *et al.*, 2020).

De même, pour la première fois, un nouveau vaccin contre le paludisme « R21 » mis au point par des chercheurs de l'Université d'Oxford et des scientifiques du Burkina Faso a démontré une efficacité 77 % contre la maladie lors de sa deuxième phase des essais. Il s'agit d'un résultat exceptionnel. L'OMS vise une efficacité de plus de 75 % pour un vaccin antipaludique. Jusqu'ici, ce niveau n'avait jamais été atteint. La rapidité et la réussite de la mise au point des vaccins contre la Covid-19 montrent que c'est possible de mettre sur pieds un vaccin contre le paludisme, et l'on devrait s'en inspirer pour terminer, homologuer et distribuer le vaccin antipaludique. C'est important non seulement en raison de la menace que représente le paludisme, mais aussi parce qu'investir dans les vaccins, est également une façon de se préparer aux prochaines pandémies (Dattoo *et al.*, 2021).

#### **I.4.2. Lutte anti-vectorielle**

Au regard de l'incidence du paludisme et des dégâts qu'il cause en Afrique particulièrement ainsi que le rôle des Anophèles dans la transmission du plasmodium et compte tenu de l'absence d'un vaccin efficace contre le plasmodium à nos jours, la lutte contre les vecteurs se présente comme une solution pour faire face à cette maladie. L'objectif principal de la lutte anti-vectorielle est la diminution de la morbidité et de la mortalité palustres grâce à l'abaissement des taux de transmission (OMS, 2005). En effet, la réduction significative du paludisme obtenue ces 15 dernières années a été associée en grande partie à la lutte anti-

vectorielle (Bhatt *et al.*, 2015), montrant ainsi la place de la lutte anti-vectorielle dans la lutte contre du paludisme. Diverses approches sont utilisées pour contrôler les vecteurs, il s'agit des luttes physiques, environnementales, biologiques et chimiques, appliquées indépendamment ou en combinaison. Des progrès récents ont également permis d'appliquer un large éventail de techniques biotechnologiques à ces fins.

#### **I.4.2.1. La méthode biologique**

Les méthodes de lutte biologique font référence à l'utilisation d'organismes vivants et des virus tels que les poissons prédateurs, les prédateurs invertébrés et les toxines produites par des agents microbiens capables d'affecter les populations d'arthropodes visées (Imbahale *et al.*, 2011). L'intérêt pour les méthodes de contrôle biologique n'a pas cessé de croître, d'abord avec l'apparition de la résistance des arthropodes aux insecticides, puis la prise de conscience environnementale globale (Mogi, 2007). La bactérie *Bacillus thuringiensis*, la variété *israelensis*, de sérotype H14 (*Bti*) est devenue l'insecticide microbien (bio-pesticide) le plus utilisé pour lutter contre les ravageurs et les espèces vectrices (Becker, 1988; Rowe *et al.*, 2003). *Bti* n'est pas toxique pour les humains, les mammifères, les oiseaux, les poissons, les plantes et la plupart des organismes aquatiques, mais il a été établi qu'il est un puissant frein à la croissance pour *Culex pipiens* (Altalhi, 2005; Sanahuja *et al.*, 2011). De même ; les champignons *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* ont montré de bons résultats contre plusieurs espèces de Culicidae, et *Anopheles gambiae* s.s. (Farenhorst *et al.*, 2009; Lovett *et al.*, 2019; Scholte *et al.*, 2005). En effet, les adultes infectés ont présenté des taux de survie et de fécondité réduits, ainsi qu'une moindre capacité à prendre le repas sanguin (Scholte *et al.*, 2006). Affectant des paramètres clés définissant l'intensité de transmission du paludisme, ce type d'outil présente un potentiel important comme stratégie alternative du lutte antipaludique (Blanford *et al.*, 2005) ou comme complément dans la lutte contre des populations résistantes aux insecticides chimiques (Farenhorst *et al.*, 2009).

Une autre approche biologique est l'introduction de symbiotes *Wolbachia* dans les populations de moustiques (Pan *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2011). Par exemple, il a été démontré que l'introduction d'une souche de *Wolbachia* dans des populations de terrain d'*Aedes aegypti* entraîne une diminution de la transmission du virus de la dengue (Hoffmann *et al.*, 2011). La souche wAlb de *Wolbachia* a également été établie dans les populations de laboratoire d'*An. stephensi* et il a été démontré qu'il confère une résistance chez les moustiques à *P. falciparum* (Bian *et al.*, 2013). *Wolbachia* se propage par incompatibilité cytoplasmique, rendant les

insectes résistants à une variété d'agent pathogène humain (Hancock *et al.*, 2016; Kriesner *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2020).

#### **I.4.2.1. La méthode écologique**

Cette méthode vise à aménager l'environnement de manière à le rendre défavorable au développement ou à la survie des vecteurs. Le principal moyen de lutte écologique contre les anophèles vecteurs consiste à supprimer les gîtes larvaires potentiels par drainage, comblement ou amélioration de l'évacuation des eaux de pluie (Benelli and Beier, 2017; Keiser *et al.*, 2005; Rodhain and Perez, 1985). Ce type d'opération peut être envisagé dans certains cas, par exemple en présence d'un gîte important et très productif dans un village, mais s'avère souvent difficile à réaliser en raison de la présence de nombreux gîtes naturels disséminés et temporaires (Bomblies, 2012; Gillies and Coetzee, 1987). Cependant, il semble que la réduction des gîtes larvaires potentiels dans un périmètre relativement limité autour des habitations puisse avoir un effet important sur la transmission palustre locale (Gu and Novak, 2009), puisque la moindre disponibilité de sites de ponte entraîne probablement une augmentation de la durée du cycle trophogonique, accompagnée d'une baisse du taux de survie des vecteurs (Gu *et al.*, 2008; Killeen *et al.*, 2001). Les méthodes de culture irriguée peuvent également être définies de manière à limiter les possibilités de développement des vecteurs, principalement par l'aménagement, l'entretien et le nettoyage des canaux, et l'assèchement périodique des parcelles (Boelee, 2003; Keiser *et al.*, 2005).

#### **I.4.2.3. La méthode génétique**

Plusieurs techniques de lutte génétique sont en cours de développement, mais aucune n'est actuellement applicable à la lutte opérationnelle contre les vecteurs du paludisme. Les avancées scientifiques menées pour la lutte génétique se sont focalisées sur la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement (Fontenille *et al.*, 2005; Tabachnick, 2003). En effet, l'utilisation de mâles stériles entrant en compétition avec les mâles sauvages fertiles pourrait permettre de réduire la fécondité des femelles sauvages, ainsi que la manipulation génétique de vecteurs dans le but de créer des souches réfractaires à l'infection ou principalement zoophile (Baton *et al.*, 2021; Lyimo and Ferguson, 2009; Pates and Curtis, 2005). Cependant, des recherches ont été menées à partir des années 1950 afin d'envisager le contrôle de culicidés d'importance médicale par cette technique, mais elles sont confrontées à plusieurs contraintes éthiques dans leur mise en œuvre opérationnelle (Dame *et al.*, 2009). Ainsi, le succès de l'emploi de moustiques génétiquement modifiés n'est

qu'hypothétique et de nombreuses recherches sont nécessaires afin d'évaluer sa faisabilité. Car la mise au point d'une telle méthode de contrôle du paludisme devrait passer par la modification génétique stable des anophèles vecteurs pour les rendre résistants à l'infection par *Plasmodium*, et la compréhension de la propagation de cette résistance dans les populations naturelles (Benedict and Robinson, 2003). Cependant, bien que n'impliquant pas forcément l'introduction de transgènes dans les populations, l'utilisation de mâles stérilisés par irradiation a permis de lutter efficacement contre différents insectes, et des ravageurs de cultures (Boete and Koella, 2003).

#### **I.4.2.3. La méthode de forçage génétique**

La méthode de **forçage génétique** ou *gene drive* est une nouvelle approche de la lutte anti-vectorielle en cours de développement de plus en plus convoitée comme méthode de lutte génétique contre les vecteurs (Burt *et al.*, 2018). En effet, il s'agit d'un processus naturel par lequel certains gènes sont hérités à un taux supérieur à celui de Mendel et peuvent se propager à travers une population même s'ils causent des dommages aux organismes qui les portent. De nombreux systèmes de forçage génétique synthétique différents ont été proposés pour supprimer le nombre de moustiques et/ou réduire la compétence vectorielle (Hartley *et al.*, 2019; Macias *et al.*, 2017). Cette méthode de lutte, apparue au début du XXI<sup>e</sup> siècle, utilise la technique CRISPR/cas9 (Hammond *et al.*, 2016). Le forçage génétique permet de favoriser l'héritage d'un gène particulier et d'augmenter sa prévalence dans une population. Le forçage génétique peut être utilisé pour la prévention de la propagation d'insectes porteurs de maladies pour contrôler les espèces envahissantes ou pour éliminer la résistance insecticide ou aux pesticides de certaines espèces. La technique peut être utilisée pour ajouter, interrompre ou modifier des gènes d'une population entière de manière à provoquer une réduction drastique de cette population en réduisant ses capacités de reproduction (Carballar-Lejarazú *et al.*, 2020). Le forçage génétique fonctionne uniquement pour les espèces ayant une reproduction sexuelle active, elles ne peuvent pas être employées pour modifier des populations de virus ou de bactéries. Cependant, les approches de forçage génétique pour la lutte anti-vectorielle promettent d'avoir des caractéristiques clés qui motivent leur développement continu et leur examen minutieux par toutes les personnes concernées.

#### **I.4.2.4. La méthode chimique**

Cette technique de lutte repose principalement sur l'utilisation de nombreuses substances végétales ou synthétiques permettant de tuer les vecteurs. Bon nombre de produits sont utilisés dans cette lutte cependant, le but recherché demeure l'action efficace, rapide et

persistante sur les vecteurs visés, tout en présentant le moins d'effets possibles sur l'homme et les organismes non-cibles (Rodhain and Perez, 1985). Cette lutte chimique, inclut l'utilisation des produits chimiques principalement pour les pulvérisations intra-domiciliaires (PID) et l'imprégnation des moustiquaires à longue durée d'action (MILDA) (Killeen *et al.*, 2007; Pates and Curtis, 2005; Pluess *et al.*, 2010). Les principaux insecticides utilisés pour la lutte anti-vectorielle appartiennent aux organochlorés (DDT, dieldrine), aux organophosphorés (malathion, fénitrothion, téméphos, chlorpyrifos), aux carbamates (propraxur) et aux pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, alpha-cyperméthrine, bifenthrine). Ces produits peuvent être appliqués directement dans l'environnement (naturel comme domestique) sous différentes formulations (suspension, poudre mouillable, émulsion, tablette et microcapsule) (Hemingway *et al.*, 2004; Zaim and Guillet, 2002). En revanche, seuls les pyréthriinoïdes sont autorisés en imprégnation de moustiquaires (Hill *et al.*, 2006; OMS, 2018). On peut également citer l'existence de régulateurs de croissance, protéines analogues d'hormones de mue ou de métamorphose, permettant d'empêcher le développement larvaire normal des insectes visés (Rodhain and Perez, 1985), bien qu'étant encore peu utilisés dans la lutte contre les vecteurs du paludisme.

### **I.5. Les insecticides utilisés dans le cadre de la lutte anti-vectorielle**

Les insecticides sont des substances d'origine chimique ou biologique qui permettent d'éliminer les insectes (Ware and Whitacre, 2004). Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis-à-vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles (Koureas *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2020). Les familles chimiques d'insecticides sont liées aux modes d'actions, fondées par exemple sur la neurotoxicité de certaines molécules, sur leur impact sur la respiration cellulaire, la formation de la cuticule ou sur la perturbation de la mue. De nos jours, quatre grandes classes sont recommandées par l'OMS pour leurs utilisations en santé publique à savoir : les pyréthriinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés, et les carbamates (Carnevale and Robert, 2017; Robert *et al.*, 2001). Cependant, il faut noter que d'autres classes d'insecticides sont de plus en plus testées et recommandées tel que les pyrroles et les néonicotinoïdes (Hunt and Treacy, 1998; Oxborough *et al.*, 2019).

#### **I.5.1. Les pyréthriinoïdes**

Les pyréthriinoïdes ont pour cible le canal sodium (Na<sup>+</sup>) situé sur les fibres nerveuses. Dotés d'une toxicité considérable et agissante par contact, ils tuent presque instantanément les insectes par effet de choc neurotoxique, permettant de les utiliser à des doses très réduites.

Comme mode d'action, les pyréthriinoïdes tuent l'insecte en bloquant le fonctionnement du canal sodium (Na<sup>+</sup>) indispensable à la transmission de l'influx nerveux (Salgado *et al.*, 1983). L'insecte physiologiquement désorienté passe par des phases d'incoordination, de convulsion et de tétanisation. La mort survient plus ou moins rapidement suivant la dose et la puissance de l'insecticide. Réputés peu toxiques pour les mammifères, on leur attribue le coefficient de sécurité (rapport des toxicités pour les insectes et pour les mammifères) le plus élevé parmi les insecticides chimiques (Elliott *et al.*, 1978). On distingue les pyréthriinoïdes de type I, (comme la perméthrine et la bifenthrine), et de type II (comme la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine et l'alpha-cyperméthrine) qui se différencient par la présence d'un groupement alpha-cyanés pour le type II. Ces molécules sont actuellement largement utilisées dans le monde entier pour le contrôle des moustiques du fait de leur efficacité, de leur faible coût et du risque sanitaire réduit sur l'homme et la majorité des mammifères (Hemingway *et al.*, 2004; OMS, 2016b); les pyréthriinoïdes sont également utilisées en pulvérisation intra-domiciliaire (Diabate *et al.*, 2002). Cependant, toute modification structurale diminuant leur affinité avec les insecticides peut induire une résistance.

### **I.5.2. Les organochlorés**

Utilisés pour la lutte anti-vectorielle depuis 1940, les organochlorés sont des toxiques neurotropes à large spectre d'action qui agissent en altérant le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux. Ce sont des insecticides de contact qui agissent sur l'insecte par contact et ingestion, induisant un tremblement généralisé (incoordination motrice) puis une paralysie (Davies *et al.*, 2007). La toxicité aiguë des organochlorés envers l'humain est relativement faible, dans les conditions normales d'utilisation. Cette famille d'insecticide comprend le DDT, le méthoxychlore, la dieldrine, le chlordane, le toxaphène, le mirex, le képone, le lindane et l'hexachlorure de benzène. Depuis les années 1970, le DDT et la plupart des autres composés d'hydrocarbures chlorés ont été restreints ou interdits à des fins agricoles dans la plupart des pays, en partie en raison de leur persistance longue dans l'environnement et aussi en raison des préoccupations croissantes découlant de leur liposolubilité (ayant une forte partition dans les lipides par rapport à l'eau) et l'accumulation à long terme qui en résulte dans les tissus adipeux des organismes non ciblés (Mellanby, 1992). Cependant, le DDT continue d'être utilisé dans la lutte contre les insectes vecteurs à des fins de santé publique, comme cela a été approuvé par l'OMS en 2006 pour les PID (Sadasivaiah *et al.*, 2007). Contrairement aux autres organochlorés, la dieldrine possède un mécanisme d'action bien particulier qui affecte le bon fonctionnement des récepteurs de

l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Cette dernière se fixe sur les sites GABA et entraîne une inhibition de la dynamique du canal chlore qui reste alors en position ouverte. Ce dysfonctionnement conduit à une inactivation de la membrane nerveuse qui, lorsqu'elle se prolonge, se traduit par une paralysie du système nerveux.

### **I.5.3. Les organophosphorés**

Les organophosphorés agissent sur le système nerveux par inhibition de l'acétylcholinestérase, qui est bloquée sous une forme inactive. En effet, l'acétylcholine s'accumule au niveau de la synapse empêchant la transmission de l'influx nerveux et entraînant la mort de l'insecte. Les organophosphorés sont normalement des esters, des amides ou des dérivés thiols des acides phosphoriques et ils constituent un groupe très important de composés dont la structure et les propriétés chimiques varient énormément (Bloomquist, 1996). Généralement, les OP réagissent avec un groupe hydroxyle sérine au sein du site actif de l'enzyme, phosphorylant le groupe hydroxyle sérine et produisant un "groupe partant" hydroxylé. Ce processus inactive l'enzyme et bloque la dégradation du neurotransmetteur, l'acétylcholine. Les organophosphorés utilisés dans les programmes de lutte contre les moustiques comprennent : le fénitrothion, téméphos, chloropyrifos, pirimiphos-méthyl et le malathion (Fikes, 1990). Du fait de leur liposolubilité élevée, les organophosphorés pénètrent facilement dans l'organisme des insectes (Testud and Grillet, 2007).

### **I.5.4. Les carbamates**

Les carbamates sont les dérivés de l'acide carbamique qui agissent comme les Organophosphorés, en inhibant l'acétylcholinestérase (Fournier and Mutero, 1994; Fukuto, 1990). Ils agissent le plus souvent par contact. La première étape du processus d'inhibition implique la formation du complexe enzyme-inhibiteur suivie de la carbamylation du groupe hydroxyle de la sérine et l'inhibition de l'enzyme (Metcalf, 1971). Les insecticides de cette famille sont entre autres : le carbaryl, l'oxamyl, le carbofuran, le thiodicarbe, le bendiocarbe, et le propoxur (Singh, 2012).

### **I.5.5. Autres classes d'insecticides**

#### **I.5.5.1. Les néonicotinoïdes**

Les néonicotinoïdes correspondent à une classe d'insecticide neurotoxique très fréquemment utilisée dans le monde, ils comprennent l'acétamipride, la clothianidine et l'imidaclopride. Leur succès tient notamment à l'impact plus modéré de leur toxicité sur les neurones des mammifères, par rapport aux organophosphorés et les carbamates. En effet, les

néonicotinoïdes, comme la nicotine, se lient sur les récepteurs nicotiques présents sur les neurones du système nerveux central chez les insectes et déclenchent une réponse. Leur activation génère un blocage engendrant une paralysie mortelle (Nauen and Denholm, 2005; Thany, 2010). Il serait important de mentionner que de nouveaux produits récemment homologués par l'OMS sont à base de néonicotinoïdes tels que le Sumishield, comportant la clothianidine (pour la PID) et Fludora Fusion (Bayer) contenant la clothianidine et la deltaméthrine (Fongnikin *et al.*, 2020; OMS, 2012).

### **I.5.5.2. Les pyrroles**

Les pyrroles sont une classe d'insecticide qui présente un niveau d'activité modéré contre un large spectre d'insectes et d'acariens. Cette classe comprend principalement le chlofenapyr et le fipronil. Ils agissent par désaccouplement de la phosphorylation oxydative via l'interruption du gradient de proton en bloquant la respiration chez l'insecte (Dagg *et al.*, 2019). L'utilisation des MILDA à base de chlophenapyr à l'exemple de *Interceptor G2* de BASF a été validée par l'OMS dans le cadre de la lutte anti-vectorielle pour faire face au phénomène de résistance aux insecticides de plus en plus observé chez les vecteurs vis-à-vis des pyréthrinoïdes (N'Guessan *et al.*, 2016; OMS, 2017).

## **I.6. Le phénomène de résistances aux insecticides chez les moustiques**

### **I.6.1. Définition et état de la résistance aux insecticides**

Le développement de la résistance a des impacts considérables sur la gestion des maladies à transmission vectorielle telle que le paludisme. En effet, pour qu'un insecticide soit efficace, il faut qu'il :

- ✚ entre en contact avec l'insecte (ou l'inverse) ;
- ✚ pénètre dans l'organisme (en traversant la cuticule ou par ingestion) ;
- ✚ soit transporté jusqu'à sa cible ;
- ✚ puisse interagir avec sa cible.

Tout mécanisme qui bloque cette séquence d'événements conduit à une résistance donc les mécanismes diffèrent selon les classes d'insecticides. La résistance d'une espèce cible peut être définie comme une diminution héréditaire de la sensibilité à un insecticide (Nauen, 2007). Sur le plan fondamental, il s'agit d'une adaptation suite à un développement des mécanismes de résistance permettant au moustique d'assurer sa survie suite à la pression exercée par l'utilisation d'un ou de plusieurs insecticides, selon un processus de sélection naturelle.

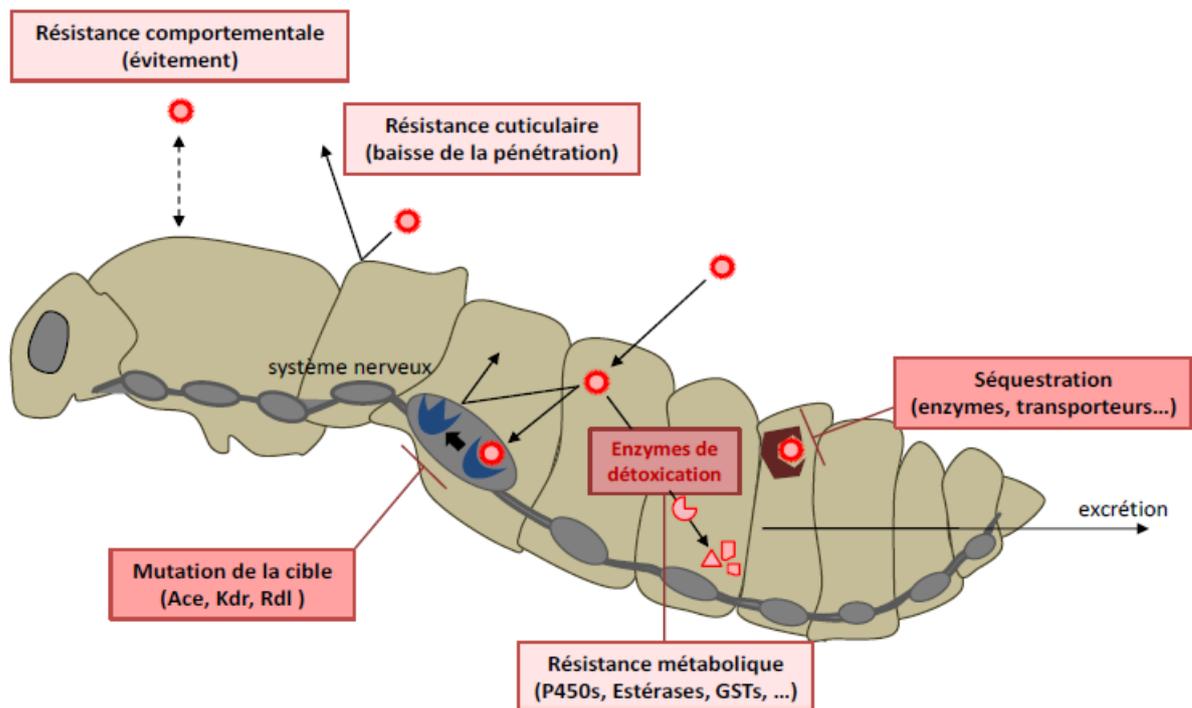
Les individus résistants sont porteurs d'une ou plusieurs mutations géniques (on parle alors d'allèles de résistance) codant pour des protéines qui interagissent avec l'insecticide.

Ainsi, les protéines mutées empêchent l'insecticide d'atteindre sa cible, par exemple en le dégradant, ou en modifiant cette cible permettant aux insectes porteurs de ces mutations de survivre à des doses d'insecticide normalement létales. Les insecticides ne provoquent pas l'apparition de ces mutations directement, mais sélectionnent les individus qui les portent, car ils sont aptes à survivre et à se reproduire en présence de ces insecticides. En conséquence, la fréquence du ou des allèles de résistance augmente dans les populations exposées à l'insecticide au fur et à mesure des générations.

Certaines espèces peuvent être résistantes à une large gamme de composés chimiques. On parle alors de résistance « croisée » lorsqu'un seul mécanisme confère la résistance à différentes classes d'insecticides et de résistance « multiple » lorsque plusieurs mécanismes distincts confèrent la résistance à différentes classes d'insecticides (Whalon *et al.*, 2008).

### **I.6.2. Les mécanismes de résistances aux insecticides**

Les mécanismes entraînant une pénétration réduite de l'insecticide dans le corps de l'arthropode (Figure 10), son excrétion accrue ou sa séquestration sont mal documentés et ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans la résistance chez les insectes vecteurs de pathogènes. En revanche, les mécanismes touchant les processus biochimiques (mutation de la cible et dégradation métabolique de l'insecticide) sont plus fréquents et peuvent aboutir à des niveaux de résistance considérables (Hollingworth and Dong, 2008; Roberts and Andre, 1994). La plupart des études se concentrent donc sur ces deux types de mécanismes qui peuvent être la conséquence de mutations nucléotidiques ponctuelles dans des gènes effecteurs, d'une amplification génique (augmentation du nombre de copies du gène) ou bien d'une modification de l'expression de certains gènes due à une altération de leur régulation (Hemingway, 2000; Perry *et al.*, 2011; Scott, 1999).



**Figure 10** : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides.  
 Source : (Selon J.P. David, H.M. Ismail et M.I. Paine)

### I.6.2.1. La résistance comportementale

La résistance comportementale correspond à un changement de comportement suite à une exposition aux insecticides. Ce mécanisme permet de réduire ou d'éviter le contact entre le moustique et l'insecticide et donc d'améliorer la survie de l'insecte (Wang and Zhu, 2004). Certains moustiques réduisent leurs mouvements en présence de l'insecticide, cette diminution de l'activité locomotrice est perçue comme un comportement protecteur, car il permet une diminution de la respiration et donc une diminution du contact avec l'insecticide (Pimentel *et al.*, 2012). Chez l'insecte, on distingue deux catégories de mécanismes comportementaux de "résistance", qui permettent à ce dernier d'éviter le contact avec l'insecticide ou de limiter la durée de ce contact (Haubruge and Amichot, 1998). Le mécanisme de résistance comportementale peut être dépendant du stimulus, ce qui implique une reconnaissance de la substance toxique par des récepteurs sensoriels de l'insecte, créant une irritabilité (qui pousse l'insecte à quitter l'environnement toxique au contact de l'insecticide) et une répulsion (qui permet à l'insecte d'éviter le contact avec le pesticide), on parlera alors de résistance associée à la mobilité de l'insecte. De même, la résistance comportementale peut aussi correspondre à la possibilité pour l'insecte de limiter le temps de contact avec le pesticide, on parlera dans ce cas de résistance associée à l'immobilité de l'insecte (Davidson, 1953). Une étude menée sur la blatte (*Blattella germanica*) montre que certains individus présentent une répulsion vis-à-vis

du gel contenu dans les appâts pour insectes. Ces insectes mangent très peu voire pas ce gel et sont beaucoup plus tolérants à l'insecticide utilisé (37,5 % de mortalité pour la souche résistante contre 100 % pour la souche sensible après 7 jours) (Wang and Zhu, 2004). Cependant, il est à noter que les mécanismes impliqués dans la résistance comportementale ont été peu étudiés, car un changement de comportement est difficilement quantifiable.

#### **I.6.2.2. La résistance cuticulaire**

Le mécanisme de résistance par pénétration réduite correspond à un ralentissement de la pénétration de l'insecticide à travers la cuticule du moustique grâce à une modification biochimique de celle-ci. La cuticule qui joue le rôle de protection de l'organisme vis-à-vis du milieu extérieur est riche en lipides. Les insecticides lipophiles comme les pyréthriinoïdes ou les organophosphorés vont pouvoir traverser cette barrière biologique par diffusion puis être transportés via l'hémolymphe jusqu'aux organes cibles. Les mesures comparatives de l'épaisseur de la cuticule entre moustiques résistants et sensibles à la perméthrine chez *Anopheles funestus*, ont relevé que le moustique résistant présente une cuticule plus épaisse de 9,5 à 10 % permettant un taux d'absorption plus faible de l'insecticide (Wood *et al.*, 2010). D'autres études ont mis en évidence ce mode de résistance chez la mouche domestique (*Musca domestica*), la teigne (*Plutella xylostella*) ou encore la noctuelle de la tomate (*Helicoverpa armigera*). Une mesure de la quantité de deltaméthrine radiomarquée à l'extérieur de l'insecte après une heure d'exposition montre une pénétration significativement plus faible chez les souches résistantes que chez la souche sensible de la noctuelle (Ahmad *et al.*, 2006). Ces mécanismes permettraient de ralentir la pénétration de l'insecticide dans l'organisme et pourraient renforcer l'effet des autres mécanismes de résistance. La sur-transcription de certains gènes cuticulaires chez d'*An. gambiae*, suggère leur rôle potentiel dans la résistance de ce dernier aux pyréthriinoïdes (Awolola *et al.*, 2009). Seul, ce mécanisme offre une résistance moindre comparée aux autres mécanismes physiologiques, mais combiné à des mécanismes de détoxification, ils peuvent ensemble générer des niveaux bien plus importants de résistance tel qu'observé dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* (Clarkson *et al.*, 2021; Djouaka *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2021).

#### **I.6.2.3. La résistance par modification du site cible**

Le changement de conformation d'une protéine ciblée par l'insecticide entraîne le plus souvent une diminution de la capacité de liaison de l'insecticide et par conséquent une diminution voire même une perte de l'efficacité de l'insecticide. Dans la plupart des cas, la résistance par modification des sites ciblés s'explique par la présence d'une mutation qui

entraîne une substitution d'un ou de plusieurs acides aminés dans la séquence protéique de la cible de l'insecticide (Ffrench-Constant, 1999). Vu que la cible majeure des insecticides est constituée du récepteur GABA, du canal sodium voltage-dépendant, d'acétylcholinestérase et le nAChR, toutes modifications de ces sites pourraient donc affecter l'effet des insecticides sur les insectes.

#### ✚ Modifications du récepteur canal de l'acide $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) :

Ces récepteurs sont la cible de certains organochlorés comme la dieldrine. Ceux-ci se fixent sur le récepteur et bloquent le passage d'ions chlorure (Buckingham *et al.*, 2005). Il a été démontré qu'une substitution de l'alanine par la sérine ou glycine en position 302 (A302S/G) provoquerait une altération du site de liaison des insecticides sur le récepteur et stabiliserait également l'état ouvert du récepteur (Ffrench-Constant, 1999; Karatolos *et al.*, 2012). La présence de cette mutation a déjà été associée à la résistance aux insecticides chez différentes espèces de moustiques et de mouches domestiques (Asih *et al.*, 2012; Belinato and Martins, 2016; Janer *et al.*, 2019). Chez *An. funestus*, il a été observé que la mutation de la leucine par la serine en position 296 (A296S) du récepteur GABA était responsable de la résistance de ce vecteur à la Dieldrine (Wondji *et al.*, 2011).

#### ✚ Modifications du récepteur canal sodium voltage-dépendant :

Les pyréthriinoïdes et le DDT se fixent sur le récepteur canal sodium voltage-dépendant et retardent sa fermeture ce qui perturbe la transmission synaptique. Dans la plupart des cas, la résistance à ces insecticides est due à une mutation du gène *kdr*, correspondant à une substitution de la leucine par la phénylalanine en position 1014 (L1014F) (Ranson *et al.*, 2000). Ce mécanisme de résistance a été mis en évidence pour la première fois chez la mouche domestique exposée au DDT (Busvine, 1951). D'autres substitutions ont été découvertes au même locus: L1014H chez le puceron du pêcher (*Myzus persicae*) et L1014S chez le moustique (*Anopheles gambiae*) (Martinez-Torres *et al.*, 1998). La présence des mutations L1014F et L1014F a également été reportée au Cameroun chez *An. gambiae* (Bamou *et al.*, 2019; Nwane *et al.*, 2011). Cependant, les efforts menés dans l'optique de détecter ces mutations chez *An. funestus*, ont montré qu'ils n'existent pas chez ce vecteur (Irving and Wondji, 2017), tout comme aucune étude n'a encore permis d'identifier ces mutations chez *An. funestus* à nos jours.

#### ✚ Modifications de l'acétylcholinestérase :

Les carbamates et les organophosphorés se fixent sur l'acétylcholinestérase et l'empêchent de dégrader l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques conduisant à un état hyper

excité. De nombreuses mutations ont été identifiées provoquant la résistance aux organophosphorés et aux carbamates chez les moustiques et les drosophiles (Kareemi *et al.*, 2021). Par exemple, plusieurs études ont montré qu'il existe une association significative entre la présence de la mutation d'une glycine en sérine en position 119 chez *An. gambiae* et *Culex quinquefasciatus* et leur habilité à survivre en présence des insecticides tels que les carbamates et les organophosphorés (Djouaka *et al.*, 2011). La présence de la mutation G119S a également été reportée au Cameroun chez *An. gambiae* (Elanga-Ndille *et al.*, 2019b) et chez *An. funestus* (Menze *et al.*, 2018).

#### ✚ Modifications du récepteur nicotinique à l'acétylcholine :

Les néonicotinoïdes sont des agonistes du récepteur de l'acétylcholine et provoquent une activation continue de ce récepteur. Une étude réalisée chez le puceron *Myzus persicae* a permis de mettre en évidence la présence d'une substitution de l'arginine par la thréonine en position 81 (R81T) au niveau de la boucle D d'une des six sous-unités du nAChR chez des individus résistants aux néonicotinoïdes (Liu *et al.*, 2005; Troczka *et al.*, 2021). La boucle D pourrait donc jouer un rôle important dans l'interaction entre le nAChR et l'imidaclopride (Barrès and Mottet, 2017; Furlan *et al.*, 2021). De même, une étude menée chez la cicadelle (*Nilaparvata lugens*) a mis en évidence une mutation de la tyrosine par une sérine en position 151 (Y151S) chez une souche résistante à l'imidaclopride, tout comme l'expression hétérologue de ces sous-unités dans des cellules S2 de drosophile a confirmé l'implication de cette substitution Y151S dans la résistance aux néonicotinoïdes (Liu *et al.*, 2010).

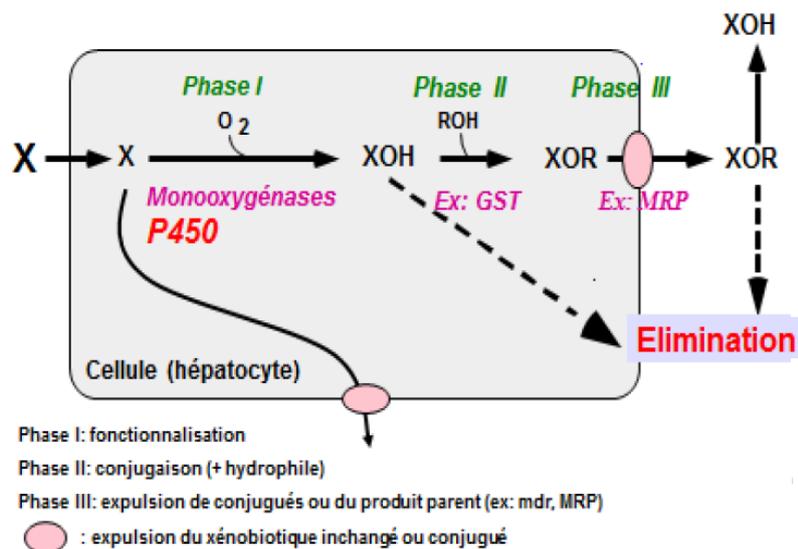
#### I.6.2.4. La résistance métabolique

Les enzymes de détoxification jouent un rôle important dans la résistance aux insecticides. En effet, une augmentation de la métabolisation de l'insecticide entraîne une diminution de la quantité d'insecticide dans l'organisme et donc une diminution de la quantité qui atteindra la cible, induisant une perte d'efficacité de l'insecticide. Dans ce cas, on dit que l'insecte est devenu tolérant à l'insecticide (Boyer, 2006; Haubruge and Amichot, 1998). La résistance métabolique peut être le résultat de différents mécanismes se caractérisant par une surexpression d'enzymes de détoxification, une mutation dans la séquence de l'enzyme, une duplication de l'enzyme ou une meilleure efficacité de l'enzyme pour son substrat (Perry *et al.*, 2011). En effet, plusieurs xénobiotiques possèdent un caractère lipophile et peuvent devenir plus hydrosolubles par biotransformation dans l'insecte, et de ce fait plus facile à excréter. Les possibilités qu'ont les insectes de dégrader les insecticides sont associées aux systèmes

enzymatiques de détoxification (Figure 11). On distingue trois phases de détoxification (Panini *et al.*, 2016):

- ✚ les réactions de la phase I, appelées réactions d'hydrolyse et d'oxydation, incluent l'activation et/ou la conversion des molécules exogènes en un composé plus polaire. L'introduction de groupes fonctionnels augmente la solubilité dans l'eau et permet, soit leur stockage loin des tissus sensibles, soit leur excrétion. Ces métabolites issus des xénobiotiques peuvent être pris en charge par les enzymes impliqués dans la phase II (Chung *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007);
- ✚ les réactions de la phase II, permettent de conjuguer les substrats très hydrophiles endogènes avec les métabolites issus de la phase I ou les xénobiotiques pour favoriser leur excrétion. Cette phase de conjugaison fait intervenir différentes classes d'enzymes ayant chacun un cofacteur spécifique. Par exemple les UDP-glucuronyl transférases ont pour substrat l'acide glucuronique, les N-acyltransférases et les acides aminés tandis que les glutathion s-transférases conjuguent les xénobiotiques ou les métabolites en présence du glutathion. Certaines de ces glutathion s-transférases ont la capacité de métaboliser certains insecticides comme le DDT (Ranson *et al.*, 2001) ;
- ✚ la phase III de détoxification : dite phase de transport ou d'élimination, elle est assurée par les transporteurs. En effet, après les réactions de la phase 2, les métabolites hydrophiles sont transportés hors de la cellule, à travers la membrane cellulaire, par l'intermédiaire des protéines membranaires appelées « transporteurs ». Les transporteurs sont présents dans de nombreux tissus, y compris le foie, les intestins, les reins et le cerveau, où ils peuvent fournir une barrière contre l'entrée des xénobiotiques, ou un mécanisme pour déplacer activement les xénobiotiques et endobiotiques de l'intérieur et à l'extérieur des cellules (Xu *et al.*, 2005). Les transporteurs appartiennent à une famille de protéines appelée les transporteurs ABC (pour ATP-Binding Cassette), car ils nécessitent l'énergie chimique, sous forme d'ATP, pour pomper activement les toxines à travers la membrane cellulaire et hors de la cellule (Merzendorfer, 2014). Ils sont parfois appelés protéines de résistance *multidroque* (PRM), car les cellules cancéreuses résistantes aux médicaments les utilisent comme protection contre les médicaments de chimiothérapie (Riddick *et al.*, 2005; Van Brussel *et al.*, 1999). Des études antérieures ont pu mettre en exergue le rôle des transporteurs dans la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* (Pignatelli *et al.*, 2018) et chez *An. coulouzi* (Abulhassan *et al.*, 2019) ;

Pour les insecticides, cette métabolisation se traduit souvent par une perte d'activité et d'efficacité des produits avec le développement du phénomène de résistance. Trois familles principales d'enzymes participent à ce processus à savoir : les cytochromes P450 qui introduisent un atome d'oxygène dans leurs substrats ; les glutathion s-transférases qui catalysent la conjugaison des molécules ayant un centre électrophile avec le groupement thiol du glutathion et les hydrolases qui clivent les esters et les amides, augmentant ainsi la polarité des métabolites. A côté de ces trois familles d'enzymes, nous pouvons aussi noter l'implication des transporteurs extra-membranaires (ABCs) et les protéines cuticulaires (Hemingway *et al.*, 2004).



**Figure 11 :** Les différentes étapes possibles du métabolisme des xénobiotiques. (X : xénobiotique ; GST : glutathion s-transférase ; MRP : *multidrug resistance proteins*). Source : (Ioannides, 2001).

Les xénobiotiques peuvent être métabolisés ou non par les enzymes de la phase I et/ou de la phase II. Ce métabolisme permet la formation de métabolites hydrosolubles facilement excrétable, mais également des métabolites réactifs ayant une toxicité importante. Cependant, il serait important de noter qu'un xénobiotique n'est pas obligatoirement métabolisé par les enzymes des deux phases. Il peut être directement éliminé ou pris en charge par une seule des deux phases avant d'être éliminé par l'organisme. De plus, un xénobiotique peut être métabolisé suite à l'action combinée des enzymes de la phase I et de la phase II. Ces réactions enzymatiques peuvent également générer des intermédiaires très réactifs avec une toxicité plus importante que le xénobiotique de départ. Ces mécanismes peuvent entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les intermédiaires peuvent également se lier à des macromolécules comme l'ADN, les protéines et/ou les lipides et ainsi conduire à une toxicité.

## **I.7. La résistance métabolique et l'implication des gènes de détoxification**

### **I.7.1. Les glutathion s-transférases**

Les glutathion s-transférases représentent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles actives durant la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Ces protéines sont retrouvées chez les vertébrés comme les invertébrés et sont principalement localisées au niveau du cytosol. Les GSTs sont impliquées dans le transport intracellulaire, la biosynthèse des hormones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Enayati *et al.*, 2005). De même, les glutathion s-transférases jouent un rôle important dans la détoxification de substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances au glutathion endogène (Franciosa and Berge, 1995). Au moins six classes de GST spécifiques aux insectes ont été identifiées chez les anophèles (Ranson *et al.*, 2002). Cependant, les classes Delta et Epsilon, exclusivement présentes chez les insectes sont les plus abondantes (Ranson and Hemingway, 2005). Des études antérieures du rôle des GST epsilon (GSTes) sur la résistance aux insecticides ont montré que ces GST pourraient intervenir dans la résistance aux pyréthrinoïdes en détoxifiant les produits de peroxydation lipidique induits par les pyréthrinoïdes et/ou en les protégeant du stress oxydatif induit par l'exposition aux insecticides plutôt que le métabolisme direct des pyréthrinoïdes (Vontas *et al.*, 2001). Chez *An. funestus*, des travaux antérieurs avaient reporté que la surexpression de GSTe2 couplée à un changement d'acides aminés sont associés à la résistance au DDT et à la perméthrine. En effet, une seule mutation du gène *GSTe2* (L119F) s'est avérée conférer à la fois une résistance élevée au DDT et une résistance croisée à la perméthrine chez certaines populations d'*An. funestus* en Afrique de l'Ouest et Centrale (Riveron *et al.*, 2014).

### **I.7.2. Les cytochromes P450**

Les monooxygénases à cytochromes P450 appartiennent aux classes d'enzymes intervenant pendant la phase I de métabolisation. Ils sont très importants pour l'organisme, car ils sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, pesticides...) et des composés endogènes (hormones, acides gras, stéroïdes) (Li *et al.*, 2007). Découverts en 1958 dans les microsomes de foie de rat et identifiés comme des pigments qui avaient la propriété d'absorber fortement à 450 nm une fois réduits et complexés avec le monoxyde de carbone, les cytochromes P450 catalysent des réactions d'oxydation (Klingenberg, 1958). Chez les insectes, les fonctions physiologiques des CYPs restent moins bien définies que chez les vertébrés. Cependant, ceux-ci sont impliqués dans divers processus biologiques. Plusieurs CYPs jouent un rôle dans la voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes spécifiques des insectes. Les

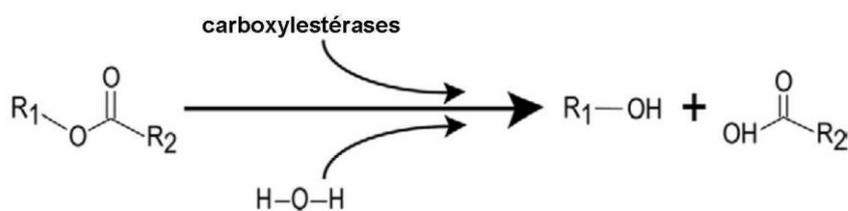
CYPs sont également impliqués dans le développement des organes sensoriels externes, et l'agressivité dans le comportement sexuel chez les mâles (Willingham and Keil, 2004). De même, nombreuses études montrent l'implication des P450s dans la résistance aux insecticides chez les moustiques et les drosophiles (Casimiro *et al.*, 2014; Le Goff *et al.*, 2003; Riveron *et al.*, 2018; Wondji *et al.*, 2009).

Les P450s apparaissent être largement impliqués dans la résistance des moustiques aux insecticides. Globalement, les familles de CYP6 et de CYP9 représentent la majorité des cytochromes de P450s candidats à la résistance métabolique, c'est-à-dire potentiellement impliqués dans la métabolisation des insecticides chez les moustiques *An. funestus* (Ibrahim *et al.*, 2015; Mugenzi *et al.*, 2020; Weedall *et al.*, 2019), *An. gambiae* (Adolfi *et al.*, 2019; Balabanidou *et al.*, 2016; Edi *et al.*, 2014), *Ae. aegypti* (Ishak *et al.*, 2017; Vontas *et al.*, 2020) et *C. quinquefasciatus* (Itokawa *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2021). C'est le cas des gènes CYP6P4 et CYP6P9 d'*An. funestus* donc la surexpression est liée à la résistance aux pyréthriinoïdes (Wondji *et al.*, 2009). Certaines de ces enzymes ont ensuite été validées par des approches fonctionnelles comme capables de dégrader les pyréthriinoïdes (Riveron *et al.*, 2013; Stevenson *et al.*, 2012), les carbamates (Ibrahim *et al.*, 2016) et les organochlorés (Mitchell *et al.*, 2012). La présence des variations alléliques des Cytochromes P450 a été associée à la résistance aux insecticides chez les insectes. Des études décrivent le rôle de telles modifications chez *D. melanogaster* avec notamment les mutations R335S, L336V et V476L dans le gène *CYP6a2* responsables d'une métabolisation accrue du DDT (Amichot *et al.*, 2004). Pour ce qui est de l'impact des variations alléliques de cytochromes P450 sur la résistance aux insecticides chez *An. funestus*, il avait été montré que la présence des mutations Val109Ile, Asp335Glu et Asn384Ser sur le gène *CYP6P9b* augmente sa capacité à métaboliser la perméthrine (Ibrahim *et al.*, 2015). De même, les variations alléliques et la surexpression des CYP325A chez les populations *An. funestus* du Cameroun leur confère la résistances aux pyréthriinoïdes (Wamba *et al.*, 2021).

### **I.7.3. Les estérases**

Les carboxylestérases sont impliquées dans la détoxification de phase I, capable de métaboliser de nombreux composés endogènes et exogènes (Montella *et al.*, 2012). Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters permettant la libération d'un alcool et d'un acide carboxylique (Figure 12). Elles sont capables de métaboliser plusieurs molécules, car elles présentent une faible spécificité de substrat. La résistance aux insecticides basée sur les estérases est très répandue (Li *et al.*, 2007). Cette résistance peut résulter de trois mécanismes

distincts à savoir : l'amplification des gènes, la surexpression des gènes et des mutations dans la séquence codante des gènes. Elles peuvent par exemple conférer la résistance aux pyréthrinoïdes (Bhatt *et al.*, 2020; Devonshire and Moores, 1982; Orihuela *et al.*, 2014). Les estérases constituent le principal mécanisme de résistance des moustiques aux insecticides organophosphorés et le second pour la résistance aux carbamates (Peiris and Hemingway, 1993). Chez le genre *Culex*, la résistance conférée par les estérases réside dans la séquestration très rapide de l'insecticide par ces enzymes puis sa dégradation lente (Karunaratne *et al.*, 1993). Les estérases sont responsables de la résistance de *C. quinquefasciatus* aux organophosphorés et à la perméthrine (Delannay *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2021). Des activités estérases élevées ont été retrouvées chez des populations d'*Ae. aegypti* et d'*An. stephensi* résistantes aux organophosphorés (Bisset *et al.*, 2011; Marcombe *et al.*, 2009; Vivekanandhan *et al.*, 2021) suggérant ainsi leur implication dans la résistance par leur activité catalytique. Le rôle des estérases dans la résistance et le métabolisme des pyréthrinoïdes a également été montré chez les moustiques *Ae. aegypti* (Scott *et al.*, 2021) et *An. gambiae* (Kpanou *et al.*, 2021). Une étude récente de l'expression différentielle des gènes de détoxification entre les moustiques résistants et les moustiques sensibles par la technique de séquençage a permis de mettre en exergue la surexpression de certains carboxylestérases chez les populations résistantes (Riveron *et al.*, 2014; Weedall *et al.*, 2019). Cependant à nos jours, le rôle fonctionnel de ces estérases dans l'hydrolyse des organophosphorés, des carbamates ou des insecticides à pyréthrinoïdes demeure peu caractérisé.

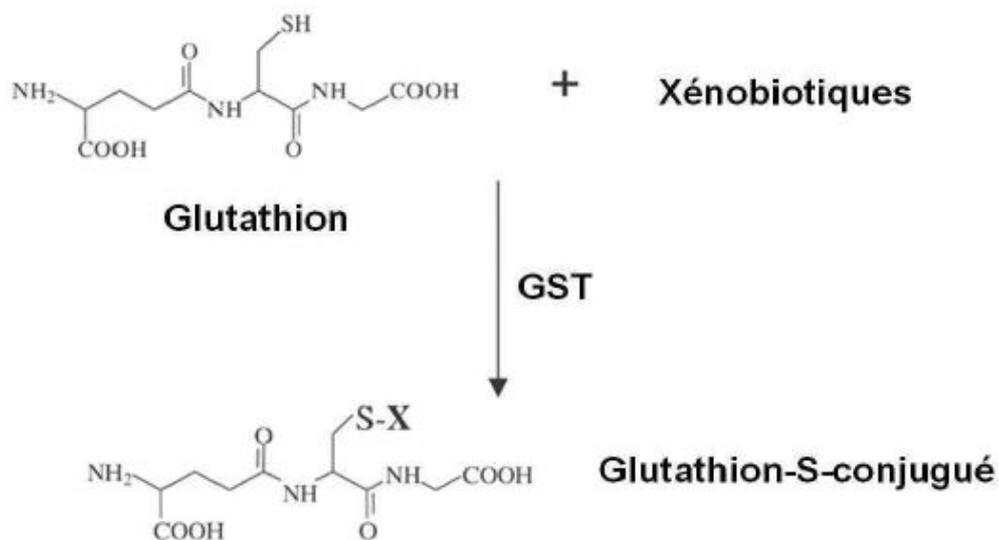


**Figure 12** : Réaction d'hydrolyse d'un substrat par les carboxylestérases.  
Source : (Montella *et al.*, 2012).

### I.8. Aperçu général des glutathion s-transférases

Les GSTs sont des enzymes de phase II du processus intracellulaire de détoxification. Elles interviennent principalement dans des réactions de conjugaison du glutathion (GSH) sur des molécules toxiques, généralement hydrophobes, par attaque nucléophile sur un centre électrophile (carbone, azote ou soufre) (Figure 13). Leur action a principalement pour but de rendre ces molécules plus hydrosolubles, permettant leur excrétion via des acteurs de la phase III de détoxification ou leur séquestration dans des compartiments cellulaires comme les vacuoles

(Coleman *et al.*, 1997; Sheehan *et al.*, 2001). La faible spécificité de substrat des GSTs leur permet de métaboliser un grand nombre de xénobiotiques comme les insecticides et aussi des composés endogènes comme les époxydes, les hydroperoxydes organiques, les produits de peroxydation des lipides et les carbonyles insaturés (Li *et al.*, 2007). Certaines GSTs ont la capacité de catalyser une réaction de déhydrochlorination en utilisant cette fois le GSH comme un cofacteur. Ces protéines sont retrouvées chez les vertébrés comme les invertébrés et sont principalement localisées au niveau du cytosol. Les GSTs sont impliquées dans le transport intracellulaire, la biosynthèse d'hormones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Enayati *et al.*, 2005).



**Figure 13** : Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion catalysé par une GST.

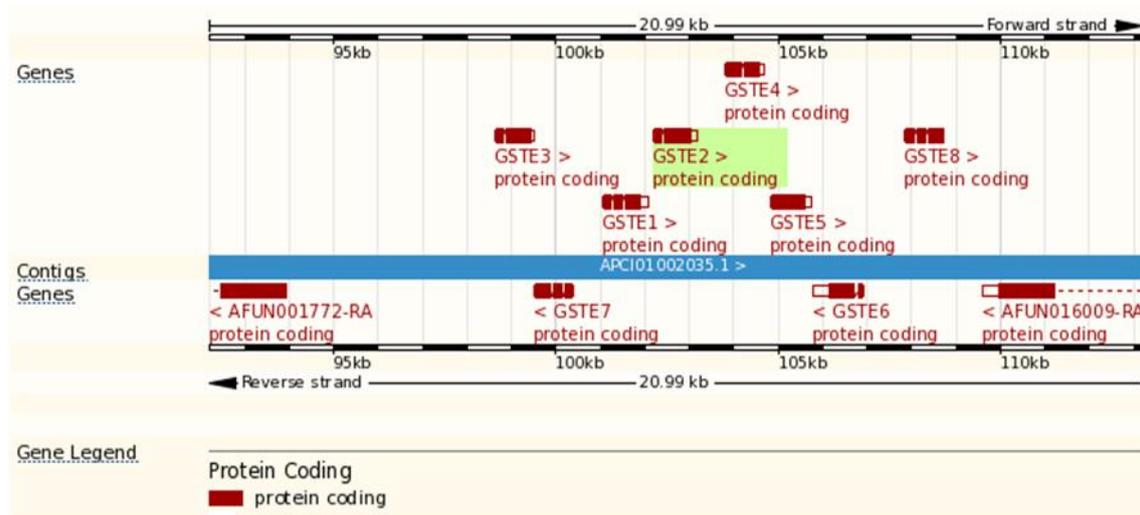
### I.8.1. Classes et structures des GSTs

Les GSTs sont classées en trois groupes en fonction de leur localisation dans la cellule : les GSTs cytosoliques, les GSTs microsomales et les GSTs mitochondriaux. Ce troisième groupe de GSTs appartenant à la classe Kappa et présent dans la mitochondrie n'est retrouvé que chez les mammifères. La comparaison phylogénétique des GSTs d'insectes et de mammifères ont mis en évidence une orthologie entre les GSTs du groupe II des insectes et la classe Sigma des mammifères. Cependant, plusieurs classes ont été trouvées comme spécifiques aux insectes, le groupe I initial renommé en classe Delta et le groupe III renommé en classe Epsilon. L'évolution indépendante de ces deux classes de GSTs chez *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* suggère un rôle important de ces enzymes dans l'adaptation de l'organisme à l'environnement (Ranson *et al.*, 2002). Les autres GSTs appartiennent aux classes Zeta, Theta et Omega.

## I.8.2. Classification des GSTs chez les insectes

### ✚ Les GSTs Epsilon

La classe Epsilon des GSTs est spécifique aux insectes. La plupart des GSTs Epsilon caractérisées ont une activité de conjugaison du 1 chloro 2,4, le dinitrobenzène (CDNB), qui est généralement utilisée pour détecter l'activité GST, et beaucoup ne sont pas retenus par les matrices d'affinité à base de glutathion (Figure 14). Les études antérieures ont permis de mettre en évidence l'implication des GSTs Epsilon des anophèles et des drosophiles dans la détoxification des insecticides (Ortelli *et al.*, 2003; Ranson *et al.*, 2002; Riveron *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2001). De même, il a été montré que certains GST Epsilon des moustiques ont une activité peroxydasique et joueraient un rôle important dans la protection contre le stress oxydatif (Lumjuan *et al.*, 2005; Ortelli *et al.*, 2003). Huit membres ont été identifiés chez *An. gambiae* et *An. funestus* à ce jour, trois ont été identifiés dans la base de données des marqueurs de séquences exprimées EST (expressed sequence tag) d'*Ae. Aegypti* (Lumjuan *et al.*, 2007).



**Figure 14 :** Cluster epsilon des glutathion s-transférases d'*Anopheles funestus*. (Source : *Vector base*).

### ✚ Les GSTs Delta

La classe Delta des GSTs est celle qui a le plus été caractérisée à ce jour. L'expansion indépendante des GSTs Delta dans différentes familles des insectes suggère qu'elles sont impliquées dans l'adaptation des insectes à leurs niches écologiques particulières et dans la détoxification des xénobiotiques environnementaux. Il serait intéressant de noter que la surexpression des GSTd a été impliquée dans la résistance à toutes les principales classes d'insecticides (Tang and Tu, 1994; Vontas *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1991).

### ✚ Les GSTs Omega

La classe Omega des GSTs a été identifiée pour la première fois chez l'homme, mais les membres de cette classe sont également présents chez les nématodes et les insectes. La fonction physiologique des GSTs Oméga n'est pas claire, mais des études antérieures ont montré qu'ils pouvaient jouer un rôle d'entretien en protégeant la cellule contre le stress oxydatif (Board *et al.*, 2000; Whitbread *et al.*, 2005).

### ✚ Les GSTs Sigma

Ceux-ci jouent un rôle structurel chez les insectes. Chez *An. gambiae*, deux variants d'épissage alternatif d'AgGSTs1 ont été détectés, mais leur distribution tissulaire n'a pas encore été déterminée. Récemment, des GST Sigma des insectes (avec ou sans extension N-terminale) se sont révélées être catalytiquement actifs exhibant une affinité élevée pour le produit de peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonéanal (4-HNE)(Singh *et al.*, 2001).

### ✚ Les GSTs Thêta

Présents dans plusieurs organismes, ils sont connus comme l'ancêtre de toutes les classes de GSTs. La classe Thêta des GSTs des insectes est jusqu'ici peut caractérisée biochimiquement et son rôle physiologique n'est pas encore connu (Ranson and Hemingway, 2005).

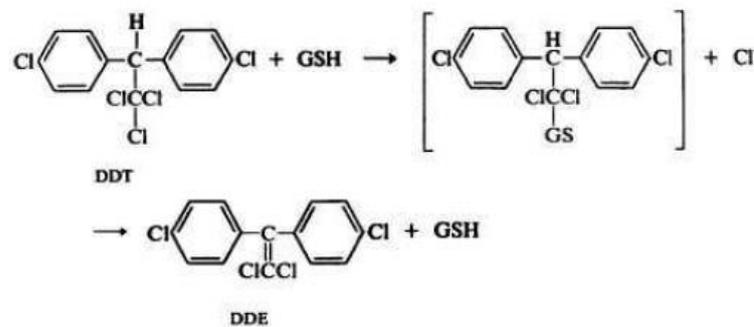
### ✚ Les GSTs Zeta

Les GSTs Zeta se trouvent dans de nombreuses espèces différentes, et leurs séquences sont hautement conservées, en particulier à l'extrémité N-terminale des protéines chez les insectes et les mammifères. La structure hautement conservée de cette protéine suggère qu'elle joue un rôle essentiel d'entretien ménager, et à cet égard, GSTZ1-1 catalyse une étape importante dans la voie de dégradation de la tyrosine (Board and Anders, 2011).

## I.9. Rôle du cluster epsilon des GSTs dans la résistance aux insecticides

Il a été montré que le *GSTe2* d'*An. gambiae* et son orthologue chez *Ae. aegypti* confèrent une résistance au DDT par déchloration (Ortelli *et al.*, 2003; Ranson *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2012). De plus le *GSTe2* d'*Ae. aegypti* a aussi fréquemment été rencontrée surexprimée chez les populations résistantes aux pyréthrinoides (Marcombe *et al.*, 2012; Strode *et al.*, 2008). Une duplication de *GSTe2*, *GSTe5* et *GSTe7* observée chez *Ae. aegypti* leur confère une résistance au téméphos (Helvecio *et al.*, 2020; Matthews *et al.*, 2018). L'augmentation de la dynamique conformationnelle des isoformes de la classe GST epsilon d'*An. gambiae* favorise la résistance au DDT. En effet, il s'est avéré que le réarrangement structurel observé avec la mutation F120L-GSTE2, confère une résistance accrue au DDT (Pontes *et al.*, 2016). Certaines GSTs sont

capables de catalyser une réaction de déhydrochlorination en particulier celle du DDT en un métabolite secondaire, le DDE en utilisant le GSH en cofacteur (Figure 15).



**Figure 15 :** Modèle de la réaction de déhydrochlorination du DDT par une GST (Enayati *et al.*, 2005).

Pour ce qui est d'*An. funestus*, les efforts menés jusqu'ici se sont focalisés sur la caractérisation du rôle de *GSTe2* sur la résistance aux insecticides. En effet, une étude antérieure a montré que la surexpression des *GSTe2* et la présence de la mutation L119F-GSTE2 confèrent la résistance au DDT et à la perméthrine en augmentant l'activité métabolique du variant vis-à-vis de ces insecticides. Cette mutation serait responsable d'une perte d'efficacité des moustiquaires et aurait un coût biologique sur les traits de vies des moustiques (Menze *et al.*, 2020; Tchakounte *et al.*, 2019; Tchouakui *et al.*, 2018). De même, il a été démontré que la présence de cette mutation chez les *Anophèles funestus* résistants au DDT et aux pyréthrinoïdes impactent leurs compétences vectorielles vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* (Ndo *et al.*, 2019).

## I.10. Méthodes utilisées dans les études d'évaluation du rôle des gènes de détoxifications dans la résistance aux insecticides

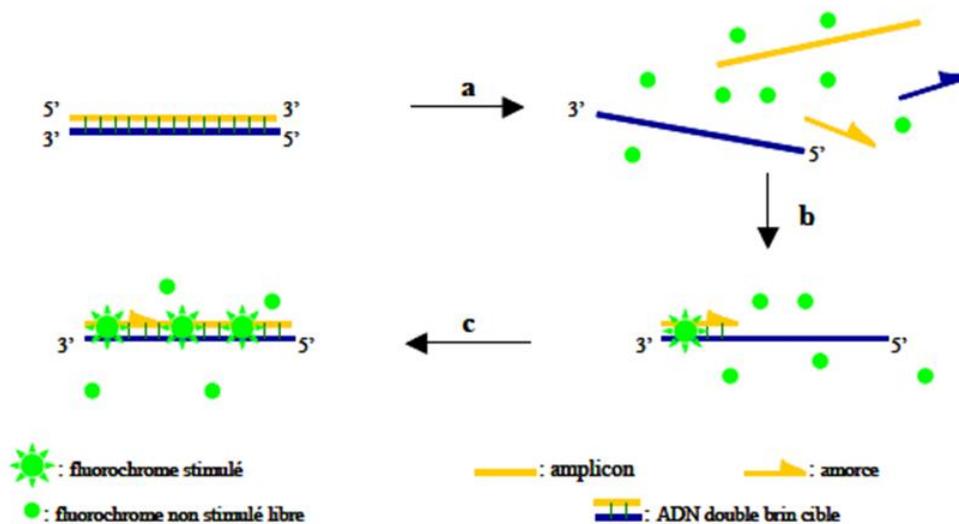
### I.10.1 Méthodes utilisées pour l'étude de l'expression des gènes

#### I.10.1.1. La technique de PCR quantitative à temps réel (RT-qPCR)

La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet, l'amplification, la détection et la quantification de l'ADN. Elle repose sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent (par exemple SYBR Green ou sonde Taqman®) dont le signal augmente proportionnellement à la quantité d'ADN synthétisée au cours de la réaction. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Cependant, cette technique permet d'étudier le niveau

d'expression d'un seul gène à la fois par réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons :

- ✚ **les agents se liant à l'ADN double brin** : les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes : les agents intercalant comme le bromure d'éthidium (Higuchi *et al.*, 1992) et le SYBR Green (Morrison *et al.*, 1998) et les agents se fixant au sillon mineur (Searle and Embrey, 1990). Leur émission fluorescente augmente lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent augmenter en fluorescence lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR (Figure 16).
- ✚ **les sondes fluorescentes** : pour cette catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : hydrolyse des sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers) (Wittwer *et al.*, 1997). Cependant, ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente (Bustin, 2000).



**Figure 16** : Agents se liant à l'ADN double brin.

(a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel. (Bustin, 2000).

### I.10.1.2. La technique de puce à ADN ou « micro-arrays »

La technologie des microarrays, ou biopuces est une méthode permettant d'analyser simultanément plusieurs milliers de gènes au sein d'un seul échantillon. Elle se décline sous de nombreuses formes permettant l'analyse de l'ADN (génomique) ou de l'ARN (transcriptome)

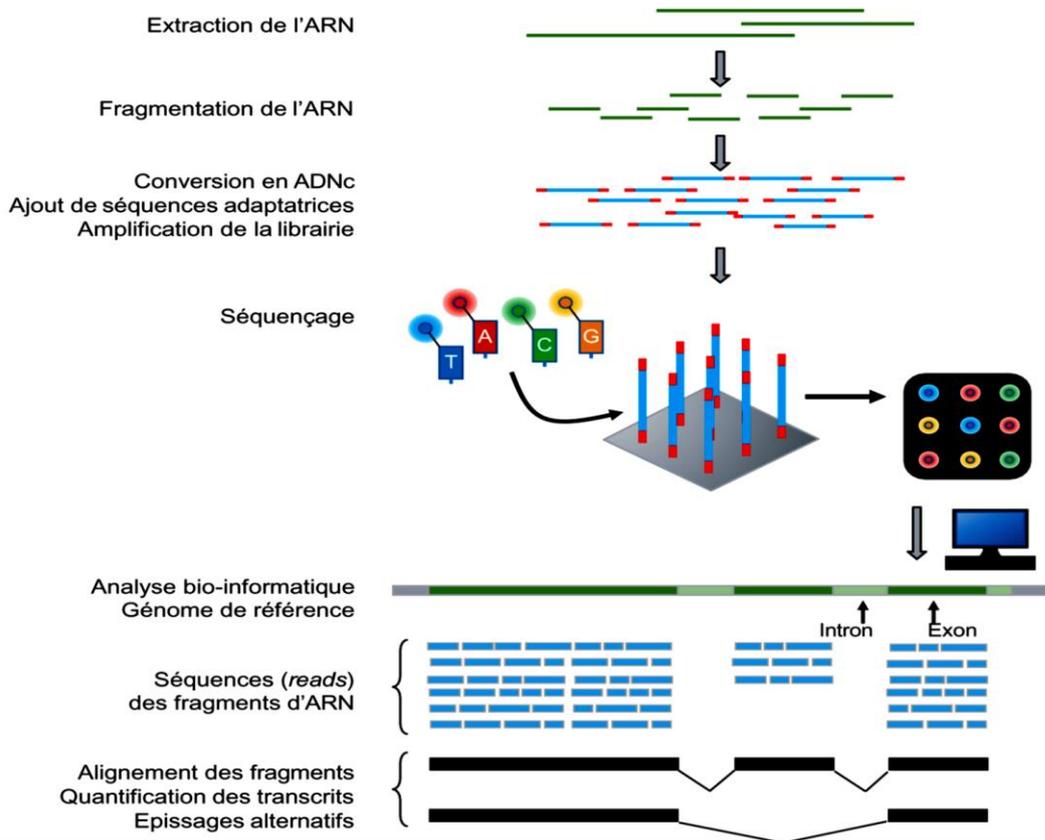
(Skena *et al.*, 1995). Pour ce qui est de l'analyse transcriptomique, ici, les ARN extraits d'une population cellulaire sont transcrits en ADNc par transcription inverse puis, les ADNc sont à nouveau transcrits en ARN complémentaires (ARNc) marqués à la biotine. Les ARNc sont déposés sur la puce et s'hybrident uniquement dans les régions contenant des sondes qui leur sont spécifiques. L'ARNc hybridé est coloré à l'aide d'une molécule fluorescente (streptavidine–phycoérythrine) qui se lie à la biotine. Les puces sont scannées avec un laser. Un module de criblage mesure l'intensité de fluorescence émise par chaque unité d'hybridation. Chaque unité est spécifique d'un gène. L'intensité de fluorescence de chaque unité est directement proportionnelle au nombre de molécules d'ARN présentes dans l'échantillon, c'est-à-dire au niveau d'expression de chaque gène (Lacroix *et al.*, 2005). Cette technique a longtemps été utilisée pour l'étudier l'expression différentielle des gènes de détoxification entre les moustiques résistants et les moustiques sensibles aux insecticides (Dana *et al.*, 2005; Isaacs *et al.*, 2018; Marinotti *et al.*, 2006) . Cependant, une limite de cette technique réside au fait qu'elle ne permet que la détermination du niveau d'expression des gènes déjà connus.

### **I.10.3. Technique du séquençage de l'ARN ou ARNseq**

L'application des méthodes de séquençage de ARN apporte une dimension nouvelle à l'étude du transcriptome. Alors que l'utilisation des puces repose sur la conception de sondes nucléotidiques, le RNA-seq permet de déterminer la séquence des transcrits sans connaissance préalable du gène d'intérêt (Wang *et al.*, 2009). Cette technique peut être regroupée en trois principales étapes à savoir (Figure17) (Ozsolak and Milos, 2011):

- ✚ l'extraction et le fractionnement des ARN, suivis de la constitution d'une librairie d'ADNc : après purification, les ARN sont fragmentés en courtes séquences (les procédés de séquençage ne peuvent prendre en charge que de courts fragments, de l'ordre de 200 à 300 bases alors que les transcrits d'ARN peuvent contenir plusieurs milliers de bases). Les fragments d'ARN sont convertis en ADNc double brin (plus stable, plus facile à amplifier et à manipuler que l'ARN). Les fragments sont ligaturés de part et d'autre des adaptateurs de séquençage qui permettent à l'automate de reconnaître les fragments et de séquencer plusieurs échantillons en même temps. Par la suite, les ADNc sont ensuite amplifiés ;
- ✚ le séquençage proprement dit : la plateforme Illumina utilise des nucléotides marqués avec des fluorochromes différents. Les fluorochromes incorporés au brin synthétisé sont visualisés un par un à l'aide d'un lecteur optique ;

- ✚ L'analyse bio-informatique (alignement, assemblage et quantification) des millions de séquences générées : les millions de séquences de fragments d'ARN sont réalignés et assemblés. Il est ensuite possible de quantifier les niveaux d'expression des transcrits, de détecter des altérations génomiques, de relever des variations de séquence non détectables à l'échelle génomique, telles que l'expression de transcrits alternatifs.



**Figure 17** : Etapes du séquençage de l'ARN (ARN-seq).  
(Uhel and Zafrani, 2019).

## I.10.2. Méthodes utilisées pour l'analyse structurale

### I.10.2.1 Détermination expérimentale de la structure 3D des protéines et de l'affinité avec l'insecticide

Plusieurs méthodes expérimentales permettent de définir la structure 3D des protéines.

#### ✚ La cristallographie à rayon X :

La détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine ici nécessite d'obtenir un cristal. Dans le but de préserver l'intégrité de la protéine, ce cristal doit contenir 40 à 60 % d'eau par volume. Cette première étape est particulièrement limitante, car la cristallisation dépend de la pureté et de l'homogénéité de la protéine et les cristaux se forment lorsque les

molécules précipitent lentement à partir de la solution saturée. Certaines protéines présentent des propriétés ne permettant pas l'obtention de cristaux. Le degré de flexibilité de la protéine est notamment un facteur déterminant. Le cristal est ensuite exposé aux rayons X et permet d'obtenir un diagramme de diffraction à partir duquel une carte de densité est calculée. Ici, l'expertise du cristallographe est également essentielle pour lever les ambiguïtés. En général, une résolution inférieure à 2,5 Å permet l'obtention de modèles corrects (Kleywegt *et al.*, 1997).

### **La Résonance Magnétique Nucléaire en solution (RMN) :**

La RMN en solution s'est imposée comme une technique complémentaire de la cristallographie, elle est la deuxième plus grande pourvoyeuse de structures protéiques. Le principe repose sur l'application d'un champ magnétique permettant de synchroniser tous les moments magnétiques de la protéine. Les spécificités de retour à l'équilibre de chaque atome sont ensuite étudiées. Ces dernières dépendent de son environnement dans la protéine et permettent d'obtenir des contraintes et des distances interatomiques. Un modèle 3D peut alors être déduit. Contrairement à la cristallographie, la spectroscopie RMN donne des informations localisées au niveau des atomes de la protéine. Seuls les noyaux des atomes possédant un moment magnétique de spin sont visibles en RMN. Cette technique demande donc le plus souvent un marquage préalable de la molécule avec des isotopes appropriés. La RMN est en général limitée à l'étude de petites protéines. Cependant, elle présente l'avantage de donner des informations sur les protéines en solution, elle est donc une technique de choix pour l'étude de la dynamique des protéines (Kleywegt and Jones, 1997b).

#### **I.10.2.2. Prédiction de la structure tridimensionnelle et de l'affinité protéine-insecticide à partir de la séquence protéique**

##### **a) Modélisation de la structure 3D de la protéine**

Lorsque la structure tridimensionnelle d'une protéine n'est pas connue, la construction d'un modèle 3D à partir de sa séquence en acides aminés peut fournir des informations essentielles sur ses propriétés et son mécanisme de fonctionnement. Il s'agit d'une modélisation computationnelle *in silico* de la structure 3D de la protéine à partir des logiciels bio-informatiques. Cette modélisation peut se faire par reconnaissance de repliement ou par homologie à partir d'une structure de référence présentant plus de 30% d'identité de séquence avec la protéine à modéliser (Baker and Sali, 2001). Le logiciel le plus utilisé de nos jours est Modeller créé par Sali et Blundell en 1993 (Šali and Blundell, 1993). La modélisation se fait en plusieurs étapes (Kleywegt and Jones, 1997a):

- la sélection de la structure de référence la plus pertinente biologiquement ;

- l'alignement des séquences de la protéine cible et du support ;
- la construction du modèle à proprement parler en s'appuyant sur les régions conservées.

Actuellement, cette méthode est celle permettant d'obtenir les modèles les plus précis. Cependant, le positionnement des chaînes latérales est encore délicat. De même, la modélisation des boucles, plus flexibles et de séquence souvent plus divergente par rapport à la structure de référence, reste un problème très difficile (Zhu *et al.*, 2006).

### **b) prédiction de l'interaction protéine- insecticide par arrimage moléculaire**

Le processus de l'arrimage moléculaire ou *docking* consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique. Des études ont montré que certains algorithmes de *docking* sont plus fiables que d'autres pour reproduire le mode de fixation expérimentale de ligands (Kollman *et al.*, 2000). Il repose sur le principe selon lequel un faible niveau d'énergie correspond à une meilleure liaison protéine-ligand. Une étude de Warren a montré que les algorithmes de *docking* sont capables de générer une conformation similaire à celle déterminée expérimentalement par cristallographie. La principale préoccupation de l'opération de *docking* est de prendre en compte la flexibilité des deux entités. Tout algorithme d'arrimage moléculaire requiert en amont une recherche conformationnelle le plus exhaustif possible de la molécule organique (Verdonk *et al.*, 2005).

### **I.10.3. Outils utilisés pour la validation fonctionnelle du rôle des gènes de détoxification dans la résistance aux insecticides**

La validation fonctionnelle consiste à élucider le rôle que peut jouer les gènes d'intérêts dans la résistance aux insecticides en utilisant les données issues des études d'analyse génomique et transcriptomique.

#### **I.10.3.1. Expression transgénique des gènes d'intérêt chez la drosophile**

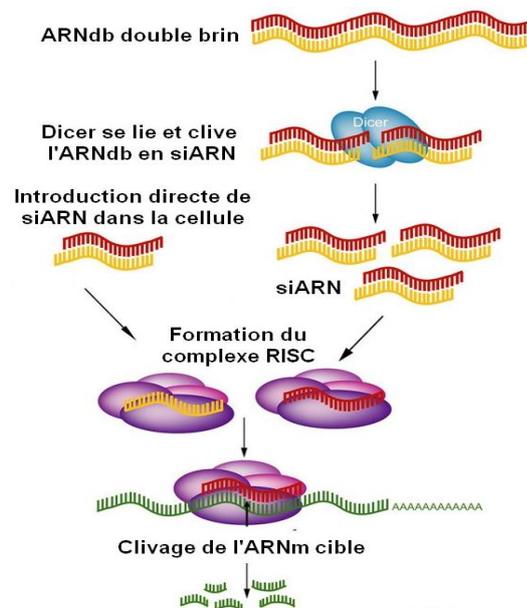
Cette technique consiste à exprimer le gène d'intérêt provenant du moustique chez la drosophile en utilisant le système GAL4-Actin et d'évaluer l'impact de la surexpression de ce gène sur la résistance aux insecticides indépendamment des autres gènes de détoxification du moustique. En effet, il y a près de 30 ans, Fischer et collaborateurs ont démontré qu'il était possible d'utiliser le facteur de transcription de levure GAL4 chez la mouche de fruits *Drosophila melanogaster* pour activer l'expression d'un gène rapporteur inséré en amont d'une séquence d'activation (*Upstream Activation Sequence* : UAS) (Fischer *et al.*, 1988). Ce travail a ouvert la voie pour le développement de l'un des outils fonctionnels les plus puissants pour la

validation du rôle des gènes d'intérêt, le système GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Pour rendre la drosophile transgénique, le gène d'intérêt est cloné dans le vecteur d'expression de la drosophile pUAS et injecté dans la cellule germinale de cette dernière. Cette technique est simple, rapide et permet de répondre sur l'implication des gènes d'intérêt dans la résistance aux insecticides de manière spécifique sans toutefois nécessiter un grand espace de travail et une plateforme technique de dernière génération. De même, plusieurs utilisations du système GAL4/UAS ont déjà permis d'élucider le rôle des gènes de détoxification des Aèdes et des Anophèles dans la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes (Ishak *et al.*, 2016; Riveron *et al.*, 2017).

### **I.10.3.2. Technique de l'ARN interférence**

L'interférence par ARN sert à réguler ou à réduire au silence l'expression d'un ou plusieurs gènes cible. L'ARN interférent désigne un acide ribonucléique simple ou double brin, qui interfère avec un ARN messager spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine d'où la réduction de l'expression du gène correspondant. Ce mécanisme d'interférence par ARN, qui a probablement été sélectionné au cours de l'évolution comme un moyen de protection contre l'introduction de génomes étrangers, notamment viraux, il a également été très utile pour comprendre la fonction de certains gènes chez les organismes vivants tels que les moustiques (Brown and Catteruccia, 2006; Sanchez-Vargas *et al.*, 2004). En effet, la molécule d'ARN se trouve naturellement dans l'organisme sous forme d'un seul brin. L'administration d'un ARN double brin dans une cellule d'un organisme vivant active la ribonucléase de type III appelée Dicer (Figure 18). Celle-ci clive l'ARN double brin en petits nucléotides de 21 à 25 paires de bases appelés siRNA (*small RNA*). Le Dicer transfère alors les siRNA à un gros complexe multi-protéique, le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Un des brins du siRNA, dit passager, est éliminé tandis que l'autre encore appelé « brin guide » dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire à ce dernier. Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé entraînant par conséquent l'inhibition de l'expression du gène d'intérêt : ce phénomène est encore appelé « *gene knockdown* ou *gene silencing* ». L'ARN double brin est le plus souvent administrés aux insectes par micro-injection ou dans l'alimentation (Ci and Siomi, 2009). Toutefois, d'autres méthodes telles que l'application topique (Killiny *et al.*, 2014), l'administration via des plantes transgéniques (Zhang *et al.*, 2017) et sous forme d'aérosols liés aux nanoparticules se sont également révélées efficaces pour certains insectes (Li-Byarlay *et al.*, 2013; Thairu *et al.*, 2017). Le succès de cette

technique dépend en grande partie de la spécificité de la séquence d'ARN double brin administrée et de l'ARNm cible, car quelques bases non-complémentaires suffisent pour empêcher le clivage (Xu *et al.*, 2016). Malgré les défis, la technique d'ARNi a été employée avec succès pour étudier les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides, en particulier la résistance induite par les enzymes de détoxification (Li *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012).



**Figure 18** : Mécanisme de l'ARN interférence. (Xu *et al.*, 2016).

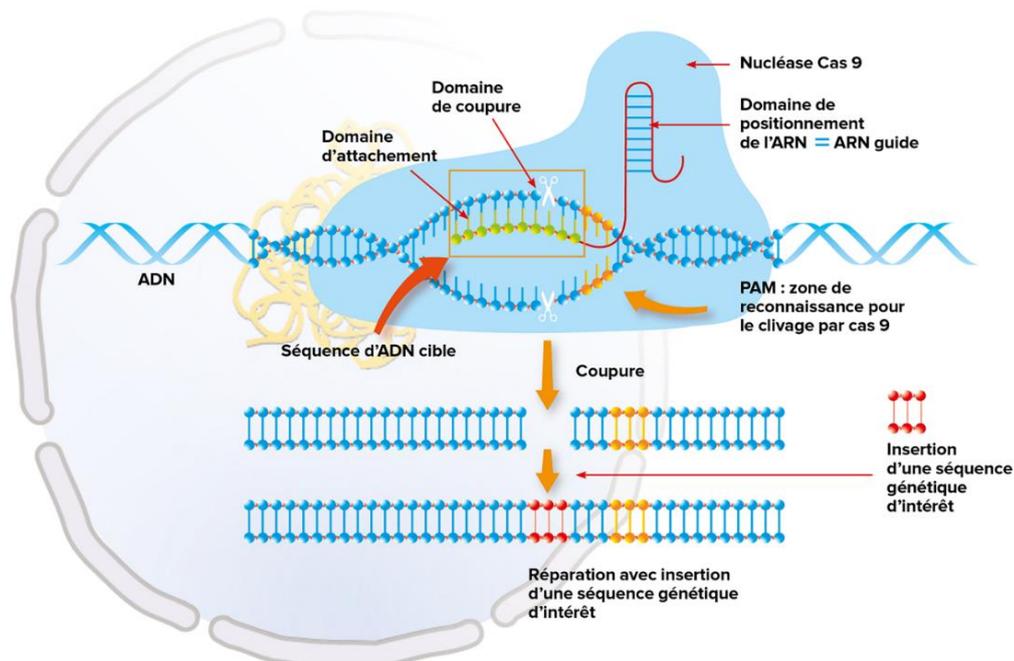
### I.10.3.3. Le système CRISPR/Cas9

CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated proteins*) est une protéine bactérienne qui sert de système immunitaire rudimentaire. Elle a en effet pour principale caractéristique de pouvoir reconnaître et couper une séquence d'ADN particulière (Lander, 2016). Modifiée par les chercheurs pour qu'elle reconnaisse la séquence de leur choix, CRISPR-Cas9 peut ainsi potentiellement supprimer des mutations et devenir le pivot des thérapies géniques ou de la validation du rôle des gènes d'intérêts dans la résistance aux insecticides (Hsu *et al.*, 2014). Distingué par un prix Nobel en 2020, c'est un outil de modification du génome. Plus facile et plus rapide à utiliser que les techniques antérieures, c'est une approche prometteuse pour la thérapie génique (Cui *et al.*, 2017; Reid and O'Brochta, 2016). En effet, le système CRISPR/Cas9 est un nouveau système simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome. Il est constitué d'un « ARN guide », qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN (Figure 19). Une fois la séquence d'ADN coupée, les systèmes de

réparation de la cellule vont recoller les extrémités des deux morceaux d'ADN créés par la coupure. Il y a alors 2 possibilités :

- En l'absence de séquence de jonction modèle, le processus de réparation rajoute ou enlève quelques nucléotides à chacune des extrémités d'ADN afin de pouvoir les recoller ; cela provoque des « anomalies » dans la séquence d'ADN ciblée : le gène devient alors aléatoirement inactif ou réparé ;
- En présence d'une séquence d'ADN synthétique sans anomalie génétique apportée par les chercheurs dans la cellule, le processus de réparation l'intègre au niveau de la coupure : le gène est alors réparé ou corrigé.

Le système CRISPR/Cas9 permet ainsi d'inhiber de manière irréversible l'expression d'un gène d'intérêt d'où l'appellation « *gene knock-out* » et d'évaluer l'impact de cette surexpression dans la résistance aux insecticides (Somers *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017).



**Figure 19 :** Retouche génétique par le système CRISPR-CAS9.  
(Homem and Davies, 2018)

#### I.10.4. Activités métaboliques des protéines recombinantes d'intérêts

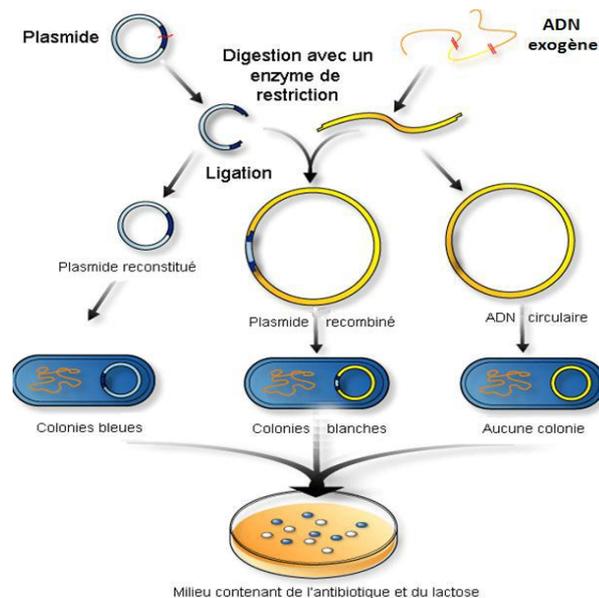
Dans le cadre de la lutte anti-vectorielle, l'étude de l'activité métabolique permet de valider si la protéine surexprimée dans un organisme est capable de métaboliser l'insecticide et le rendre moins toxique pour le vecteur. La détermination de l'activité enzymatique d'un gène d'intérêt se fait *in vitro* et communément en utilisant la cellule bactérienne *E. Colis*. Elle passe par plusieurs prérequis à savoir :

### ✚ La synthèse de la protéine recombinante :

Une protéine recombinante est une protéine produite par une cellule procaryote ou eucaryote dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. En effet, un gène codant une protéine d'intérêt après insertion dans un vecteur d'expression est introduit dans le patrimoine génétique de l'espèce productrice (bactéries, cellules de mammifères, cellules d'insectes, cellules végétales, animaux, etc.), y est exprimé puis traduit en protéine (Schmid *et al.*, 2006) (Figure 20). Les bactéries sont majoritairement utilisées pour la transformation du fait qu'elles sont faciles à cultiver et leur croissance est rapide (Karpushova *et al.*, 2005).

### ✚ Evaluation de l'activité métabolique :

La protéine recombinante synthétisée est mise en contact avec l'insecticide à tester pendant 1 h à 2 h de temps, en présence d'un tampon et des cofacteurs si nécessaire (Liu, 2015). Par la suite, la composition du milieu réactionnel est déterminée par la technique de Chromatographie (HPLC). Ceci permettra de savoir si la protéine recombinante a métabolisé l'insecticide dans le cas où les produits du métabolisme sont détectés par HPLC (Grant *et al.*, 1989). Des études antérieures ont permis de montrer que les protéines recombinantes des insectes ont la capacité de métaboliser les insecticides, permettant ainsi de valider le rôle de la surexpression de ces gènes, en majorités de la famille des cytochromes P450, glutathion s-transférases et les estérases dans la résistance aux pyréthrinoïdes observée chez les Aèdes (Aponte *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2008) et les anophèles (Ochomo *et al.*, 2013; Riveron *et al.*, 2013).

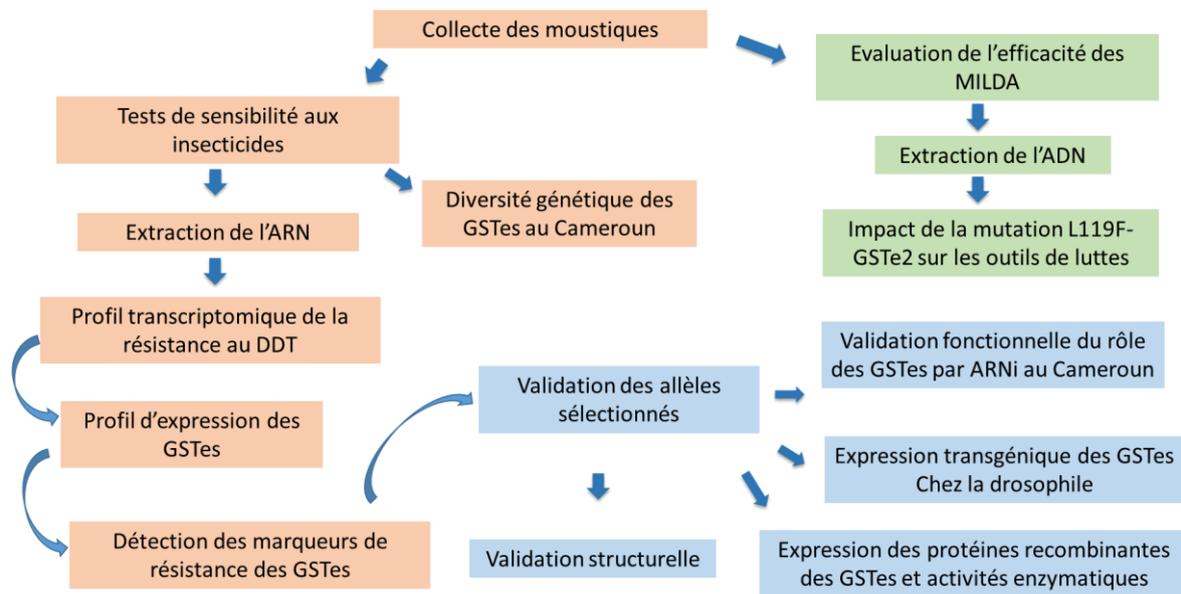


**Figure 20 :** Vue d'ensemble du clonage d'un gène. (Wong, 1995).

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## II.1. Schéma de l'étude

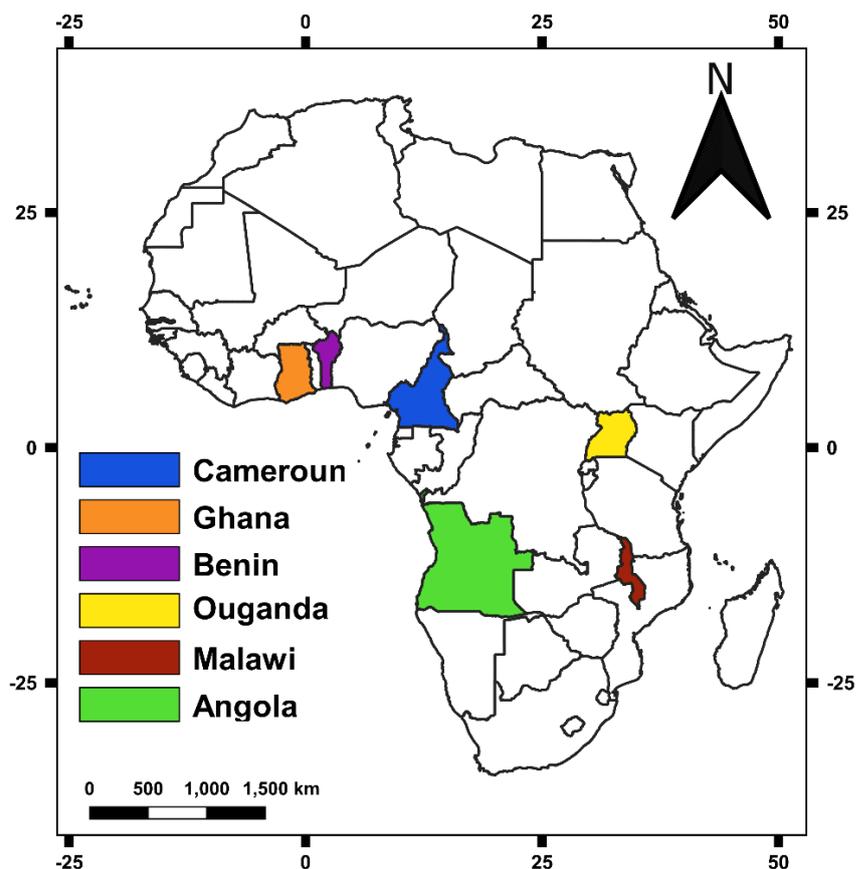
La figure 21 ci-dessous résume l'ensemble des activités menées pour atteindre les objectifs de cette étude. Nous avons tour à tour : évalué le profil d'expression des GSTs epsilon chez *An. funestus* dans quelques pays d'Afrique et détecté les potentiels marqueurs de résistance ; réalisé la caractérisation structurale et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* et pour finir nous avons évalué l'impact de la variation allélique L119F de *GSTe2* sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique.



**Figure 21** : Schéma de la méthodologie expérimentale.

## II.2. Description des sites de l'étude

L'étude a été menée avec des échantillons provenant de différents pays appartenant à quatre régions d'Afrique à savoir : Mibellon au Cameroun (6°46' N, 11°70' E ; 2015 et 2019), Obuasi au Ghana (5°56' N, 1°37' W ; 2014), Kpome au Bénin (6°55' N, 2°19' E ; 2014), Chikwawa au Malawi (16°10' S, 34°47' E ; 2014) et Tororo en Ouganda (0°45' N, 34°50' E ; 2014). Les moustiques de laboratoire de la souche FANG (sensible) et la souche Fumoz (résistante) ont également été utilisés dans cette étude (Figure 22).



**Figure 22** : Différentes zones de collecte des moustiques pour l'étude.

### II.2.1. Description du site d'étude de Mibellon

Mibellon est un village du Cameroun, situé dans la région de l'Adamaoua, département du Mayo-Banyo, arrondissement de Bankim. Mibellon est situé au milieu d'une savane arbustive à environ 75Km de Foumban. C'est un village d'environ 200 habitants ayant pour principale activité l'agriculture. Les maisons y sont en grande majorité construites en terre battue et recouvertes de paille ou de tôle. Dans ce village comme dans la plupart des villes du Cameroun ; le principal outil de lutte anti-vectorielle mis sur pied est l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (par plus de 70 % de la population). Aux abords du village, on note la présence d'un lac bordé d'une végétation émergente. Le choix de ce site a été guidé par la densité des moustiques du groupe *An funestus* et par la résistance aux insecticides reportée précédemment (Menze *et al.*, 2018).

### II.2.2. Description du site d'étude de Kpome

Kpome est une localité rurale située dans le sud du Bénin. C'est un village constitué d'un ensemble de maisons traditionnelles construites avec de la terre, du bois ou des blocs de ciment. C'est un village contenant 9000 habitants avec comme principales activités l'agriculture et la pêche. Kpome est entouré par une rivière, quelques marécages et des ruisseaux qui

enjambent les différents quartiers de cette localité avant de rejoindre la rivière. Pour ce qui est de la végétation, Kpome est principalement de type humide (végétation aquatique), constitué d'arbustes et d'arbres (Djouaka *et al.*, 2016). La présence constante d'eau autour de cette localité favorise le développement larvaire des moustiques du genre *An. funestus*. Le choix de ce site d'étude a été guidé par la surexpression des GSTes et l'implication du gène GSTe2 dans la résistance aux insecticides chez *An. funestus* démontrées par les travaux antérieurs (Riveron *et al.*, 2014).

### **II.2.3. Description du site d'étude de Tororo**

Tororo est un district situé dans le département de Nagongera, à l'est de l'Ouganda. Cette zone est caractérisée par des savanes entrecoupées par des roches. C'est une zone de savane humide où il y a généralement deux saisons des pluies (mai-juin et novembre-décembre) avec des précipitations annuelles de 1.000 à 1.500 mm. Tororo est une zone rurale située dans la région orientale à une altitude de 1.185 m au-dessus du niveau de la mer où le maïs, le riz, le manioc, les patates douces, le sorgho, l'arachide, le soja, les haricots et le millet sont cultivés. Tororo est historiquement une zone de transmission élevée du paludisme avec le taux d'inoculation entomologique annuel de *Plasmodium falciparum* estimé à 562 piqûres par personne en 2001 et 125 entre 2011-2012 (Kilama *et al.*, 2014; Okello *et al.*, 2006). Les moustiques du genre *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* sont les principales espèces vectrices du paludisme dans cette région.

### **II.2.4. Description du site d'étude de Chikwawa**

Chikwawa est un village situé au Sud du Malawi. C'est une zone de savane qui se trouve sur la rive ouest de la rivière Shire, à 50 kilomètres de la ville de Blantyre. Par sa position géographique, le Malawi est un lien entre les territoires de l'Afrique de l'Est et ceux de l'Afrique australe. À Chikwawa, la saison pluvieuse est oppressante et nuageuse dans l'ensemble, la saison sèche est dégagée dans l'ensemble et le climat est très chaud tout au long de l'année. Les températures sont fortement influencées par l'altitude, elle varie généralement de 20 °C à 36 °C. En effet, la température est élevée dans la période d'octobre-novembre et elle est basse entre juin et juillet. L'agriculture est la principale activité menée par les populations de Chikwawa. Le Malawi fait partie des 20 pays présentant les prévalences et les taux de mortalité du paludisme les plus élevés dans le monde (représentant 2 % des cas et des décès dans le monde)(OMS, 2020). Les moustiques du genre *An. funestus* et *An. arabiensis* sont les principaux vecteurs du paludisme dans cette région (Wondji *et al.*, 2012).

### II.3. Échantillonnage et identification morphologique

La collecte des moustiques dans les différents sites d'étude s'est faite à l'intérieur des maisons entre 6 h et 8 h du matin à l'aide d'un aspirateur électrique (Figure 23). La technique consiste à collecter les moustiques endophiles en se servant d'un aspirateur électrique et d'une lampe torche comme source d'éclairage. L'aspirateur est constitué d'un ventilateur qui crée un flux d'air attirant les moustiques dans une boîte dont le fond est muni d'un grillage à maille fine. Une fois en marche, il est baladé en direction de tous les coins de l'habitation où peuvent se reposer les moustiques (angle du mur, sous le lit, sous la moustiquaire, vêtements etc ...). Après 20 à 30 secondes, la boîte est refermée à l'aide d'un couvercle et une fois le ventilateur à l'arrêt, les moustiques sont transférés dans une cage prévue à cet effet au-dessus de laquelle du coton imbibé de jus de sucre était déposé. Puis les moustiques ont été mis dans les gobelets avant d'être transférés à l'insectarium soit du CRID pour le Cameroun, de l'IITA-Cotonou (Benin), du Malaria Alert Centre (Malawi), Uganda Virus Research Institute (Uganda) pour être élevés et obtenir la première génération. Chaque femelle d'*An. funestus* s.l. et a été ensuite placée dans un tube Eppendorf de 1.5ml pour pontes individuelles après un séjour de quatre à cinq jours à l'insectarium (temps au bout duquel ces femelles deviennent gravides) suivant le protocole précédemment décrit (Morgan *et al.*, 2010). Les pontes individuelles ainsi recueillies sont mises dans des gobelets en carton contenant de l'eau minérale pour éclosion des œufs. L'identification morphologique des moustiques s'est faite à l'aide des clés spécifiques d'identification des anophèles adultes (Annexe 1) (Gillies and Coetzee, 1987; Gillies and De Meillon, 1968).



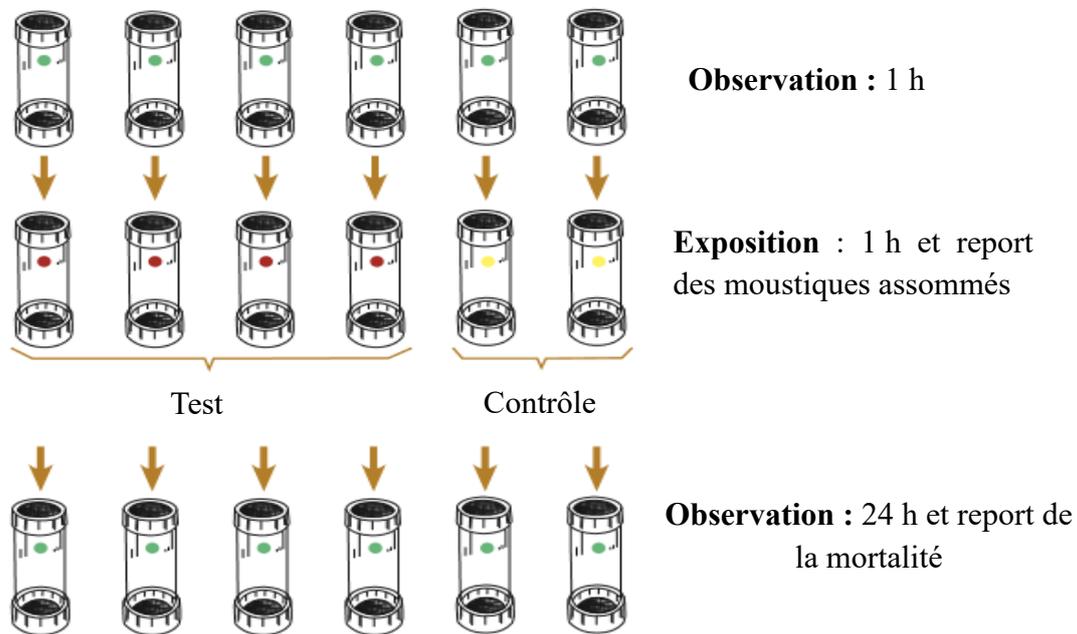
**Figure 23 :** Dispositif de collecte des moustiques adultes.  
a) aspirateur électrique ; b) collecte des moustiques à l'intérieur des maisons.

## II. 4. Tests de sensibilité aux insecticides : tests en tube de l’OMS

Le profil de résistance des populations d’*An funestus* du Cameroun a été établi par exposition des moustiques adultes de 2 à 5 jours aux insecticides selon le Protocole de l’OMS (OMS, 2016a) (Figure 24). Le profil de résistance a été testé vis-à-vis de deux classes d’insecticides : les Pyréthriinoïdes (Perméthrine 0,75 % et Deltaméthrine 0,05 %) et un organochloré (DDT 4 %). Cependant, le groupe témoin a été exposés aux papiers non imprégnés d’insecticide. Les taux de mortalité ont été relevés 24 h après exposition aux insecticides. Les moustiques morts ont été transférés dans les tubes contenant le gel de silice puis conservés dans un réfrigérateur à -20°C tandis que les survivants ont été conservés dans le RNAlater (solution permettant de conserver la structure de l’ARN) à -80°C, pour une extraction future de leurs matériels biologiques.

L’interprétation des résultats se fait selon les critères OMS (OMS,2016) ci-contre :

- Une mortalité  $\geq 98$  % la population est sensible
- Une mortalité entre 90-97 % résistance probable
- Une mortalité  $< 90$  % la population est résistante.



**Figure 24** : Procédure du test de sensibilité aux insecticides. (WHO, 2016).

## **II.5. Extraction des biomolécules (ARN et ADN) et synthèse de l'ADNc**

### **II.5.1. Extraction de l'ADN génomique du moustique**

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. L'objectif de l'extraction de l'ADN dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques purifiés d'*An. funestus*, afin de pouvoir mener des analyses spécifiques en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à savoir : l'identification moléculaire des moustiques *An. funestus* ; l'étude de la diversité génétique de notre population de moustique ; la validation des principaux outils de lutte utilisés dans le cadre de la lutte anti-vectorielle au Cameroun.

#### **II.5.1.1. Principe de l'extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN repose sur :

- la lyse des cellules par broyage dans un tampon de lyse ;
- l'élimination des protéines du broyat au moyen de solvants et l'ADN en solution dans la phase aqueuse supérieure est récupérée par centrifugation ;
- l'élimination des autres acides nucléiques (ARN) par addition des ribonucléases qui vont hydrolyser sélectivement l'ARN en laissant l'ADN intact ;
- la concentration de l'ADN par précipitation suite à un ajout d'éthanol dans la phase aqueuse.

#### **II.5.1.2. Protocole d'extraction de l'ADN**

L'ADN a été extrait suivant le protocole décrit par Livak (Livak, 1984). Le moustique est broyé dans le tampon "Livak" (constituée de 1,6 ml 5 M NaCl ; 5,48 g sucrose ; 1,57 g Tris ; 10,16 ml 0,5 M EDTA, et de 2,5 ml 20 % SDS). En effet, 50 µl de Livak préchauffé (65°C) sont introduits dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml portant un numéro d'identification et contenant un moustique entier chacun. L'insecte est broyé à l'aide d'un piston fixé à un broyeur électrique. Au terme du broyage, chaque piston est rincé avec 50 µl de tampon Livak et le broyat est incubé au bain-marie à 65°C pendant 30 minutes afin de dénaturer les nucléases. Après l'incubation, les tubes sont centrifugés brièvement afin de condenser le broyat au fond du tube puis 14 µl d'acétate de potassium 8 M sont ajoutés à chaque tube et l'ensemble est mélangé à l'aide d'un vortex. Le mélange est ensuite incubé sur la glace pendant 30 minutes, puis les tubes sont immédiatement centrifugés pendant 20 minutes à 4°C à une vitesse de 17,900 g pour précipiter les débris cellulaires et les protéines dénaturées. Le surnageant de chaque tube est délicatement transféré dans un nouveau tube stérile (de capacité 1,5 ml) portant les mêmes indications que le précédent. A ce surnageant, 200 µl d'éthanol absolu sont ajoutés

et ceci est mélangé à l'aide d'un vortex puis centrifugé pendant 15 minutes aux conditions susmentionnées afin de précipiter l'ADN. L'éthanol absolu est délicatement retiré (en évitant d'endommager le culot déposé au fond du tube) puis 100 µl d'éthanol glacial à 70 % sont introduits dans chaque tube afin de rincer le culot. Ce dernier est séché pendant environ une heure et l'ADN est reconstitué dans 100 µl d'eau stérile (Sigma®, Saint Louis, Missouri USA) et incubé au bain-marie à 65°C pendant 10 minutes pour homogénéisation. La détermination des concentrations d'ADN obtenues pour chaque moustique s'est faite par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop Lite (Thermo Scientific inc., Wilmington, USA) puis les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

## **II.5.2. Extraction de l'ARN des moustiques**

La molécule d'ARN est un matériel biologique capital ayant servi à la synthèse de l'ADNc utilisé pour le clonage, la mise sur pied des lignées de drosophiles transgéniques et l'expression hétérologue des protéines utilisées pour la validation fonctionnelle des GSTes faite dans la présente étude.

### **II.5.2.1. Principe d'extraction de l'ARN**

L'extraction de l'ARN se déroule en deux étapes. La première étape va permettre de réaliser une lyse cellulaire grâce à un tampon de lyse afin de libérer l'ensemble des ARN suivi d'une étape d'extraction proprement dite.

### **II.5.2.2. Protocol d'extraction de L'ARN**

L'extraction de l'ARN a été faite grâce au kit d'extraction Pico-pure (Arcturus, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Elle s'est faite en deux étapes à savoir : l'extraction puis isolement de l'ARN. Les moustiques ont été broyés à l'aide d'un pilon à broyage et d'un broyeur à moteur dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 100 µl du tampon d'extraction (XB). Toutes les étapes ont été effectuées sur la glace après une étape initiale d'incubation à 42 C pendant 30 minutes dans une colonne de purification de l'ARN pré-conditionnée en utilisant 250 µl de tampon de conditionnement (CB). Par la suite, une incubation à température ambiante pendant 5 minutes a été faite, suivie d'une centrifugation de la colonne dans le tube collecteur fourni par le fabricant à 16000 g pendant 1 minute. Les échantillons ont été centrifugés à 14000 g pendant 2 minutes dans le but de former le culot au fond du tube, puis le surnageant est prélevé et introduit dans un nouveau tube Eppendorf en se rassurant de ne prendre aucun déchet. Par la suite 100 µl d'éthanol 70 % sont prélevés et introduits dans le surnageant et le tout est mélangé. Le mélange est prélevé et introduit dans la colonne de

purification pré-conditionnée. Il s'en suit une centrifugation de 2 minutes à 100 g, suivi immédiatement par une seconde centrifugation à 16000 g pendant 30 secondes, le flux qui a traversé est jeté. Puis 100 µl de tampon de lavage W1 sont introduits dans la colonne de purification suivie d'une centrifugation pendant 1 minute à 8000 g.

Les échantillons ont subi un traitement à base de DNase utilisant une solution formée de l'ensemble DNase sans RNase. Pour cela 5 µl de DNase sont mélangés avec 35 µl de tampon RDD (il permet une digestion efficace de l'ADN sur colonne et garantit également que l'ARN reste lié à la colonne) lentement et par inversion. Les 40 µl du mélange DNase obtenue ont été introduits dans la colonne de purification suivie d'une incubation pendant 15 minutes et à température ambiante. Le tampon W1 est introduit à l'intérieur de chaque colonne de purification à un volume de 40 µl et centrifugé pendant 1 minute à 8000 g. Puis 100 µl de tampon de lavage 2 (W2) ont été introduits dans la colonne de purification à deux reprises et centrifugés pendant 1 minute à 8000 g dans un premier temps, ensuite pendant 2 minutes à 16000 g. La colonne de purification est vérifiée dans le but de détecter s'il y n'a plus de résidu du tampon de lavage, le flux qui a traversé est versé. Elle est recentrifugée à 16000 g pendant 1 minute et transférée dans un nouveau tube de micro-centrifugation qui se trouve dans le kit.

Enfin, 30 µl d'eau stérile (Sigma water) sont introduits directement sur la membrane de la colonne de purification, en se rassurant de ne pas toucher la membrane avec l'embout. Une incubation de la colonne pendant 1 minute et à température ambiante s'est faite, suivi d'une centrifugation pendant 1 minute à 16000 g pour éluer l'ARN. L'ARN ainsi obtenu est conservé à -80°C. Les concentrations d'ARN obtenues pour chaque échantillon ont été mesurées et lues au spectrophotomètre Nanotrop Lite (Thermo Scientific inc., Wilmington, USA).

### **II.5.3. Synthèse de l'ADNc**

L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de l'ARN messager extrait des moustiques. Pour y parvenir, 1000 ng d'ARN total sont nécessaires pour la synthèse de l'ADNc. Pour cette synthèse un mélange constitué de 1 µl d'Oligo (dt) 20 (50 mM); 8 µl d'ARN + H<sub>2</sub>O ; 3 µl d'eau stérile et 1 µl de dNTPs (10 mM) a été utilisé et porté à 65°C pendant 5 minutes. Par la suite un mix de : 4 µl de tampon de brin 5 x; 1 µl de DTT 0,1 M ; 1 µl de "RNase Out" et 1,5 µl de "Superscript III RT" a été préparé, puis mélangé avec la première solution. A la fin, une solution ayant un volume de 20,5 µl a été obtenue et introduite dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) avec les conditions suivantes : 25°C→5 min, 50°C→60 min, 70°C→15 min. Lorsque le cycle s'est achevé, les échantillons ont été retirés du thermocycleur,

1 µl de RNase H (E-Coli) y a été ajouté et le tout porté à 37°C pendant 20 minutes, pour éliminer toute possibilité de présence d'ARN dans le milieu.

## **II.6. Identification moléculaire des membres du groupe *Funestus***

L'identification moléculaire des espèces du groupe *Funestus* a été faite sur la base d'une PCR multiplexe ciblant la région ITS2 (Second Internal Transcribed Spacer Region) de l'ADN ribosomal (Cohuet *et al.*, 2003; Koekemoer *et al.*, 2002). Pratiquement, le milieu réactionnel était composé de 1µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10×, 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), 200 µM de dNTPs, 0,34 mM de chaque amorce (Annexe 2a), 0.04 unité de Kappa Taq polymérase (Qiagen, Valencia, CA, USA) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µl. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 45°C, 40 secondes à 72°C) suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer).

## **II.7. Evaluation du profil d'expression des GSTes chez *Anopheles funestus* dans quelques pays d'Afrique et détection des potentiels marqueurs de résistance**

### **II.7.1. Evaluation du profil transcriptomique et d'expression des GSTes en Afrique**

#### **II.7.1.1. Analyse transcriptionnelle à l'échelle du génome des gènes associés à la résistance au DDT à travers l'Afrique à l'aide du séquençage de l'ARN**

La détection des gènes associés à la résistance au DDT et DDT/perméthrine s'est faite par l'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les moustiques résistants (vivant 24 h après exposition au DDT et à la perméthrine), contrôles (non exposés) et sensibles (FANG) en utilisant la technique du séquençage de l'ARN sur un séquenceur HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA). En effet, la technique de séquençage de l'ARN (*RNA-sequencing*, *RNA-seq*) concerne le séquençage de l'ensemble des transcrits (transcriptome) d'une cellule, cette technique de nouvelle génération possède plusieurs avantages (Wadapurkar and Vyas, 2018):

- elle permet de détecter et de quantifier des transcrits sans connaissance a priori de leurs séquences ;
- elle autorise la quantification des transcrits sans effet de saturation par conséquent, il n'y a pas de limites de détection quantitative ;
- elle présente moins de bruit de fond que les puces à ADN utilisées précédemment.

#### **Méthodes**

L'analyse du profil transcriptionnel d'*An. funestus* a été réalisée en utilisant les données brutes de transcriptomique à base de RNAseq précédemment générées par l'équipe du Prof

Wondji mais non encore analysées (C. Wondji ; Communication personnelle). Ces données RNAseq ont été générées en utilisant des moustiques de quatre régions africaines : le Centre (Mibellon/Cameroun), l'Ouest (Obuasi/Ghana), le Sud (Chikwawa/Malawi) et l'Est (Tororo/Ouganda). L'ARN total a été extrait de 3 pools de 10 moustiques femelles résistants au DDT, non exposés (contrôle) et de la souche sensible de laboratoire (FANG) à l'aide du kit d'extraction de l'ARN Arcturus PicoPure (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. De même, l'ARN a également été extrait de 10 moustiques résistants à la perméthrine dans l'optique d'étudier les gènes dont l'expression différentielle serait liée à la résistance croisée aux insecticides DDT et perméthrine. La préparation des bibliothèques de séquences, le séquençage, le traitement initial et le contrôle de la qualité ont été effectués par le centre de recherche génomique de l'université de Liverpool (Center for Genomic Research, University of Liverpool, Royaume-Uni). Brièvement, la quantité et la qualité de chaque pool ont été évaluées à l'aide d'un Bio-analyseur et qPCR en utilisant le kit de quantification de bibliothèque Kapa Illumina (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), sur un Light Cycler LC480II (Roche, Bâle, Suisse), selon les instructions des fabricants. Le pool de bibliothèques a été séquençé avec un HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) à 2x125 pb. Les séquences ont été obtenues sous forme de fichier FastQ et alignées à la séquence de référence du génome entier d'*An. funestus* *AfunF3.1*. Consulté le 7 avril 2020 ([https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/DS\\_1a787d4361#pmids](https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/DS_1a787d4361#pmids)). L'analyse de l'expression différentielle des gènes liés à la résistance au DDT et la résistance croisée DDT-perméthrine a été réalisée suivant les modèles décrits par Livak et Weedall (Livak and Schmittgen, 2001; Weedall *et al.*, 2019) en utilisant les logiciels edgeR et Strand NGS (Strand Life Sciences, version 3.0, Hebbal, Bangalore, Inde).

#### **II.6.1.2. Evaluation du profil d'expression des gènes GSTes chez *An. funestus* dans quelques pays d'Afrique en utilisant la PCR quantitative à temps réel**

Le profil d'expression des GSTes en Afrique a été évalué à l'aide de la technique de PCR quantitative en utilisant l'agent intercalaire *Syrb green*. En effet, les ARN des moustiques résistants (vivant après 1h d'exposition) au DDT, à la perméthrine, du groupe contrôle (non exposé) et ceux de la souche sensible (FANG) ont été extraits en utilisant le kit d'extraction de l'ARN Arcturus PicoPure (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). L'extraction de l'ARN s'est faite en 3 pools de 10 moustiques pour chaque groupe testé. L'ADNc de chaque répliquât a été synthétisé à l'aide du kit Super-Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les instructions du fabricant. La technique de PCR quantitative à temps réel a été réalisée à partir

des ADNc synthétisés pour mesurer le niveau d'expression des GSTes chez *An. funestus* en comparant le niveau d'expression des GSTes entre les moustiques résistants et ceux non exposés par rapport à la souche sensible. Pour ce faire 10 ng d'ADNc de chaque échantillon ont été utilisés pour réaliser la qPCR en utilisant le kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (Agilent, Santa Clara, CA, USA) et les amorces spécifiques à chaque GSTes (Annexe 2b) sur un programme d'amplification faisant intervenir une phase de dénaturation de l'ADNc à 95°C durant 3 min, suivi de 40 cycles de 10 s à 95°C et 10 s à 60°C et d'une dernière étape de 1 min à 95°C, 30 s à 55°C et 30 s à 95°C. L'expression relative des gènes testés a été calculée suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta CTd}$  décrite par Livak, en comparant le niveau d'expression des GSTes chez les moustiques résistants à la perméthrine et au DDT et chez les moustiques non exposés après normalisation avec le niveau d'expression des gènes de ménage RPS7 (AFUN007153) et actin5C (AFUN006819).

## **II.7.2. Analyse de la diversité génétique des GSTes chez les moustiques sensibles ou résistants dans quelques populations d'*An. funestus* au Cameroun**

### **II.6.7.1. Sélection des moustiques hyper-résistants et hyper-sensibles**

Une évaluation de la corrélation du polymorphisme des GSTes et la résistance à la perméthrine ont été menées en amplifiant individuellement les GSTes de l'ADN génomique des moustiques résistants et sensibles de Mibellon et en réalisant leur séquençage direct. Pour sélectionner les moustiques résistants et sensibles, les moustiques *An. funestus* ont été exposés à la perméthrine 0,75 % pendant 90 min et 30 min en suivant le protocole de l'OMS 2016, puis les ADN génomiques des moustiques hyper-sensibles (mort après 30 min d'exposition), des moustiques hyper-résistants (vivants après 90 min d'exposition) et des moustiques non exposés ont été extraits individuellement par la technique de Livak.

### **II.7.2.2. Amplification des GSTes et séquençage des produits de PCR**

Les GSTes ont été amplifiés des solutions ADN extraites individuellement des moustiques hyper-sensibles, hyper-résistants et non exposés à l'aide du kit d'amplification Kapa Tag (KAPA Biosystems, Qiagen, Valencia, CA, USA) en utilisant les amorces de GSTes consignées en annexe 2c. Le milieu réactionnel était composé de 1 µl d'ADN génomique (10 ng/µl), 1,5 µl de tampon A à 10 ×, 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0,04 unité de Kappa Taq polymérase et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µl. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 s à 94°C, 30 s à 45°C, 40 s à 72°C) suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Après migration

électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 % contenant 1 µl de Midori Green, 10 µl de chaque produit d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit ExoSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, New England Biolabs, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les amplicons (10 reliquats pour chaque groupe) ainsi purifiés ont été dilués à une concentration finale d'environ 150 ng/µl, et la séquence d'ADN de chaque échantillon a été déterminée par le séquenceur automatique en Angleterre (ABI 3130 XL Genetic Analyser, Applied Biosystems). L'analyse des séquences obtenue a permis d'étudier la diversité génétique entre les moustiques résistants, sensibles et non exposés.

### **II.7.2.3. Etude de la diversité génétique : estimation des paramètres de la variabilité génétique**

Les séquences brutes des GSTes issues du séquenceur ont été visualisées et corrigées manuellement lorsque c'était nécessaire, après une vérification du chromatogramme en utilisant le logiciel BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999). L'alignement des séquences a par la suite été réalisé grâce à l'outil *ClustalW Multiple Alignment* intégré dans BioEdit (Thompson *et al.*, 1994). Pour chaque groupe d'étude (hyper résistant PA ; hypersensible PD ; et non exposé Fo), le nombre de sites polymorphes ou variables (s), les indices de diversité haplotypique (h et dh) et nucléotidique ( $\pi$ ), le nombre moyen de différences nucléotidiques par séquence (k), les paramètres  $D_T$  (Tajima, 1989) et F (Fu and Li, 1993) permettant d'estimer la stabilité démographique de la population ont été calculés grâce au logiciel DnaSP v5.10.01 (Librado and Rozas, 2009).

### **II.7.2.4. Etude de la diversité haplotypique et analyse de la phylogénie**

Les distances génétiques entre les haplotypes ont été estimées grâce au logiciel MEGA v7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016). Ce logiciel a également servi à la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Cho, 2012). Les intervalles de confiance des associations entre haplotypes ont été calculés en utilisant la méthode « bootstraps » avec 500 répliques (Felsenstein, 1985). Les logiciels d'estimation des cladogrammes TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000) et tcsBU (Clement *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2015) ont permis d'élaborer le réseau d'haplotypes.

## **II.7.3. Recherche des potentiels marqueurs de résistance des GSTes**

### **II.7.3.1. Amplification et purification des allèles de GSTes**

Les séquences codantes complètes des allèles GSTes d'*An. funestus* ont été amplifiées à partir des ADNc du Cameroun, du Bénin, de l'Ouganda, du Malawi, et de la souche sensible

de laboratoire FANG, en utilisant les amorces spécifiques des GSTes (Tableau 2). L'amplification a été réalisée à l'aide du Kit Phusion Taq (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) dans un thermocycle (GeneTouch Bioer) en utilisant deux paires d'amorces spécifiques à chaque GSTes. Le milieu réactionnel de PCR était composé de 3 µl de tampon HF Phusion 5X (avec 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> dans la réaction finale), 0,12 µl de mélange dNTP (85,7 M), 0,51 µl de chaque amorces sens et antisens (0,34 M), 0,15 µl de Phusion High-Fidelity DNA Polymérase (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), 10,71 µl de dH<sub>2</sub>O et 1 µl d'ADNc ont été ajoutés. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur en utilisant les conditions suivantes : un cycle à 95°C pendant 5 minutes ; 35 cycles de 94°C pendant 20 s (dénaturation), 57°C pendant 30 s (fixation des amorces) et extension à 72°C pendant 90 s ; et un cycle à 72°C pendant 5 minutes (élongation finale). La révélation des produits d'amplification des GSTes s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %. Pour ce qui est de la préparation du gel d'agarose, 1,5 g de poudre d'agarose ont été introduits dans 100 ml de tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) (tampon) et le mélange a été porté à ébullition dans un four à micro-ondes pendant environ 2 minutes puis, 1 µl de Midori Green (Bulldog Bio Inc., Hampshire UK) y a été ajouté et la solution a été coulée dans un moule d'électrophorèse muni d'un peigne pour former des puits pour déposer les échantillons. Après refroidissement complet et formation du gel, ce dernier, a été transféré dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE où 3 µl de produit d'amplification mélangé à 1 µl de tampon de charge ont été déposés dans les différents puits. Le marqueur de poids moléculaire (100 pb) a été introduit aux extrémités pour estimer la taille des différentes bandes. L'électrophorèse s'est déroulée sous une tension de 150 volts à 300 mA pendant environ 35 minutes. A la fin de l'électrophorèse, le gel a été porté dans un trans-illuminateur à lumière Ultraviolette et les GSTes ont été identifiés à environ 800 paires de base (pb). Les amplicons de GSTes issus de la PCR ont été purifiés à l'aide du Kit QIAquick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) selon les instructions du fabricant et conservé à -20°C.

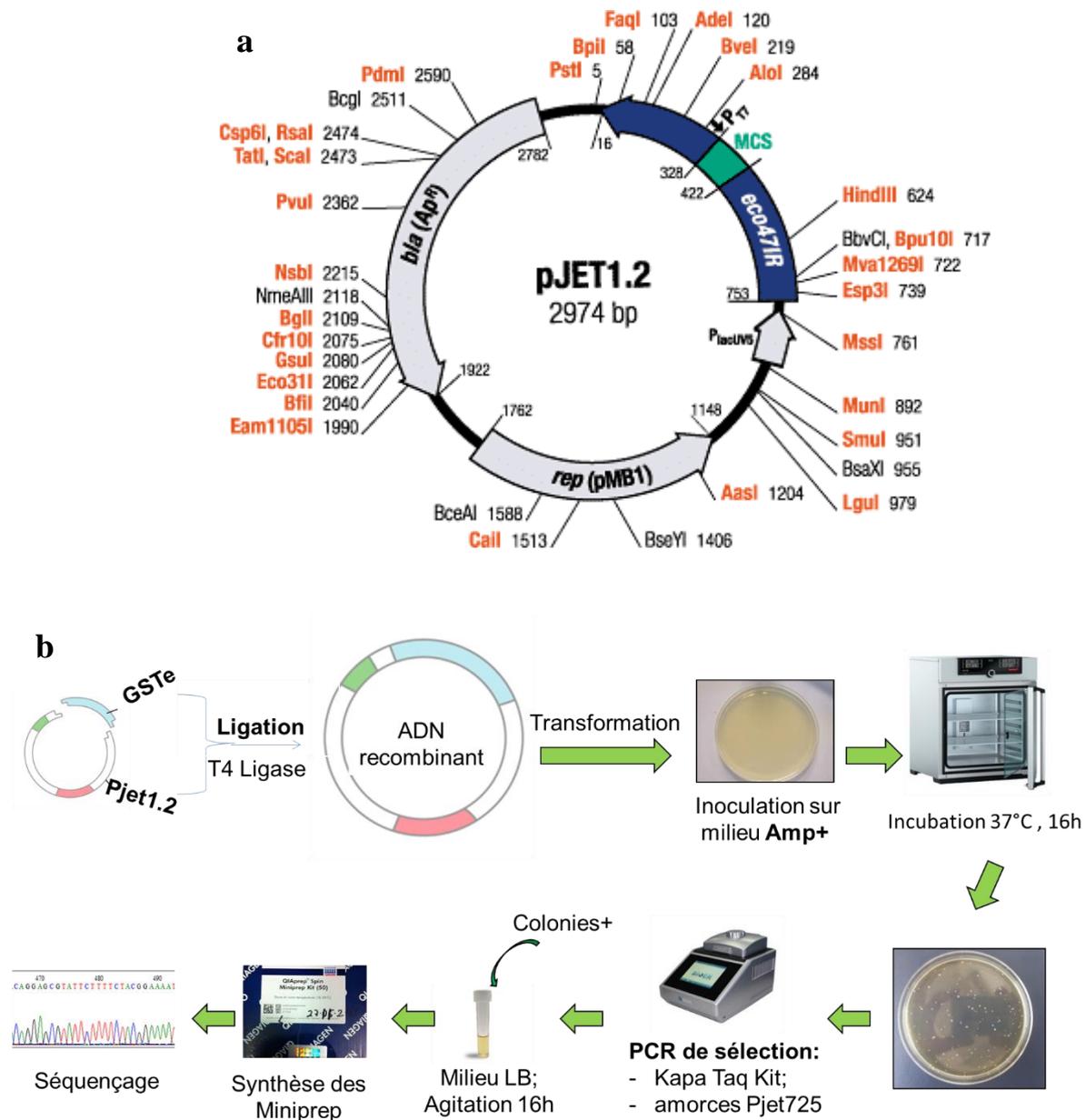
**Tableau II** : Liste des amorces utilisées pour l'étude de la diversité génétique des GSTes

Gènes	Noms des amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (bp)
GSTe1	GSTe1 Sens	GCGCTTCATTACGGAACTGG	916
	GSTe1 Antisens	AAAATCAGCGATAGTCATTTGC	
GSTe2	GSTe2 Sens	GTTTGAAGCAGTTGCCATACTACGAGG	850
	GSTe2 Antisens	TCAAGCTTTAGCATTTTCCTCCTTTTGGC	
GSTe3	GSTe3 Sens	CCAACCGTTTTGGCATATCT	785
	GSTe3 Antisens	TTTCTCACTGAGTACTTTGCCTTTT	
GSTe4	GSTe4 Sens	ATTGCGATTCTATGCGGAAC	844
	GSTe4 Antisens	GCTTCGGATAGTTGGCTTCA	
GSTe5	GSTe5 Sens	ACGAGCAGCTTAACCAGGAA	857
	GSTe5 Antisens	CCGTGTCTGCTTTTCTGTGA	
GSTe6	GSTe6 Sens	GGAGGTGACTGTTCGTGGAT	1033
	GSTe6 Antisens	TCCGTCCTCGAAGGTAGGTA	
GSTe7	GSTe7 Sens	GGTACCGCTGGACGAGACTA	728
	GSTe7 Antisens	TTAGATTGGAGATTCTATCCCTTG	
GSTe8	GSTe8 Sens	TACCGATCGATGCCGAAC	768
	GSTe8 Antisens	TATTTTGCGCAACTTTTCCA	

### II.7.3.2. Clonage des GSTes dans le vecteur Pjet 1.2

Les amplicons purifiés des GSTes ont été clonés dans le vecteur de clonage pJET1.2 (Figure 25a) en utilisant le kit de clonage CloneJET™ (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) en suivant les recommandations du fabricant. Brièvement pour la ligation des GSTes dans le pJET, 5 µl de produits purifiés de PCR ont été mis en contact avec 5 µl du tampon de réaction, 0,5 µl de ligase T4, et de 0,5 µl de vecteur pJET blunt. Ce mélange réactionnel a été incubé pendant 1 h à température ambiante. Les produits de ligation obtenues pJET- GSTe1, pJET- GSTe3, pJET- GSTe4, pJET- GSTe5, pJET- GSTe6, pJET- GSTe7 et pJET- GSTe8 ont par la suite été transformés dans la cellule bactérienne *E. coli* DH $\alpha$ . Pour y parvenir, 5 µl (~5-10 ng) de chaque produit de ligation ont été ajoutés dans 50 µl de cellules compétentes DH $\alpha$  (*Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$ , Invitrogen*) et incubés sur la glace pendant 30 minutes. Dans le but de libérer le plasmide recombinant, la lyse des cellules s'est faite par choc thermique à 42°C pendant 45 s, puis le mélange a immédiatement été refroidi sur de la glace pendant 5 min. Par la suite, 500 µl de milieu LB ont été ajoutés dans chaque tube suivi d'une agitation de 1700 g pendant 1 heure à 37°C. Après, 50 µl à 100 µl de produit de transformation ont été étalés

sur des plaques d'agarose contenant 100 mg/ml d'ampicilline et laissés pousser pendant 16 h à 37°C (Figure 25b).



**Figure 25 :** Recherche des variations alléliques des GSTes.

a) Vecteur de clonage Pjet 1.2; b) Procédure de clonage des GSTes dans le vecteur d'expression Pjet1.2.

### II.7.3.3. Isolement des colonies positives, synthèse et séquençage des plasmides recombinants

Dans le but de sélectionner les colonies positives possédant l'ADN recombinant pJET-GSTes les colonies ont été mises en suspension séparément dans 20 µl de H<sub>2</sub>O et une PCR de criblage a été effectuée en utilisant l'ADN polymérase Kappa Taq (Qiagen, Valencia, CA, USA)

et les amorces Pjet 7.25 sens (CCGAAAAGTGCCACCTGAACGTCTAA) et antisens (TCCTGTCTCAGTTTCCTGAAGCTTGCTC). En effet pour cette PCR, 1 µl de colonie a été mélangé à 5 µl de tampon A (10X), 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,12 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl de chacune d'amorces sens et antisens, 0,12 µl de KAPA Taq Polymerase et 10,71 µl d'eau pour un volume final de 14 µl. Cette PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : un cycle à 95°C pendant 3 minutes ; 25 cycles chacun de dénaturation initiale (94°C pendant 30 s), d'hybridation (57- 60°C pendant 30 s) et d'extension (72°C pendant 90 s) ; un cycle d'extension finale de 90 s à 72°C. Les produits de PCR ont été exécutés sur un gel d'agarose à 1,5 % coloré avec du Midori green pour confirmer la taille des produits. Pour la synthèse des minipreps (solution d'ADN recombinant purifiée), 4 µl de colonies positives ont été cultivées dans 5 ml de milieu LB enrichi à l'ampicilline (100 mg/ml) à 37°C pendant 16 heures, sous agitation à 1600 g. Puis, les plasmides ont été isolés en utilisant le Kit QIAprep® Spin Miniprep de QIAGEN selon le protocole du fabricant. La quantité et la qualité des ADN recombinants ont été déterminées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND1000 de Thermo Fisher. Les plasmides isolés ont été séquencés sur les deux brins en utilisant les amorces du vecteur pJET 725 par la technique de Sanger à l'aide d'un séquenceur (ABI 3130 Genetic Analyseur, Applied Biosystems). L'analyse des séquences s'est faite par étude des variations alléliques dans les sites d'études en comparaison au niveau d'expression. Le chromatogramme d'une portion des GSTes tel que visualisée à partir du logiciel BioEdit est représenté en annexe (Annexe 4).

## **II.8. Caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus***

### **II.8.1. Caractérisation structurelle des GSTes et prédiction de l'affinité avec les insecticides**

#### **II.8.1.1. Prédiction de la structure 3D des allèles de GSTes sélectionnés *in silico***

La modélisation des allèles des gènes *GSTe3* (D26-GSTe3, G26-GSTe3), *GSTe4* (H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4) et *GSTe6* (E/S-GSTe6 et G/T-GSTe6) a été réalisée à l'aide du logiciel Modeler version 9.25 (Mod9.25). La modélisation est simplement une approche informatique pour la prédiction de la structure 3D des protéines. Elle implique la construction d'un modèle à résolution atomique de la protéine "cible" (requête) à partir de sa séquence d'acides aminés en utilisant la structure expérimentale en 3D d'une protéine homologue apparentée appelée référence. Le succès de la modélisation est dû au fait que la structure 3D des protéines de la même famille est plus conservée que leurs séquences primaires (Lesk and Chothia, 1980) et les protéines qui partagent une faible similarité de séquence possèdent souvent des structures

similaires (Fiser and Sali, 2003). La procédure de modélisation des GSTes par homologie s'est faite en quatre étapes successives : la sélection de la protéine modèle, l'alignement de la protéine cible et de la protéine modèle, la construction du modèle et son évaluation en utilisant les scripts du logiciel Modeller9.25.

#### **a) La sélection du modèle**

Le programme protéine BLAST (BLASTp) (Altschul *et al.*, 1990) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a été utilisé pour rechercher la meilleure structure de modèle disponible dans la banque de données de protéines (PDB) (Berman *et al.*, 2002). Un alignement des séquences des protéines des GSTes clonées dans la section étude du polymorphisme dans la base de données de NCBI a permis de trouver les meilleurs modèles pour la structure de chaque GSTe testé sur la base du pourcentage de similarité.

- Pour les allèles de *GSTe3* (D26-GSTe3, G26-GSTe3) et *GSTe4* (H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4) de plus grandes similarités (respectivement 53,23 % et 56,22 %) ont été obtenues avec la protéine 5FT3 (PDB : 5FT3) d'*Aedes aegypti*, moustique vecteur de la dengue ;
- Pour les allèles de *GSTe6* (E/S-GSTe6, G/T-GSTe6) une plus grande similarité (47.83 %) a été obtenue avec la protéine 4GSN (PDB : 4GSN) d'*An. gambiae*.

#### **b) Alignement modèle-GSTes à l'aide du script « *Aligned.py* »**

Afin de maximiser le score d'alignement entre le modèle et les séquences de D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4, E/S-GSTe6, G/T-GSTe6 à modeler, un alignement par paire de séquences protéiques sur format FASTA a été effectué en utilisant le script d'alignement de modeler (Notredame *et al.*, 2000). En effet, un alignement des séquences a été généré en identifiant la structure modèle à l'aide d'une matrice BLAST et de substitution des scores pour chaque paire alignée de résidus moins les pénalités attribuées aux lacunes (Pierrri *et al.*, 2010). Pour minimiser les erreurs, les résidus présents dans le modèle et absents dans la requête ont été supprimés, car le désalignement d'un seul résidu peut entraîner une erreur d'environ 4,0 Å dans le modèle final généré (Fiser and Sali, 2003).

#### **c) Construction du modèle à l'aide du script « *build model.py* »**

*MODELLER* est un programme informatique autonome qui modélise les structures 3D des protéines et leurs assemblages par satisfaction de contraintes spatiales (Šali and Blundell, 1993). Les fichiers d'alignement des séquences de GSTes à modéliser avec des structures apparentées 5FT3 et 4GSN ont été utilisés par le modélisateur pour calculer automatiquement

un modèle avec tous les atomes non-hydrogène. Les entrées du programme sont des contraintes sur la structure spatiale des séquences d'acides aminés et des ligands à modéliser et le produit de modélisation est une structure 3D des GSTes. Les structures tridimensionnelles des protéines ont été modélées en utilisant le script « *build model* » du logiciel *Modeller* version 9.25. (<https://salilab.org/modeller/>). En effet, ce logiciel utilise son module SALIGN3D pour effectuer des alignements de requêtes modèles et extraire des contraintes spatiales à partir de deux sources : les contraintes dérivées d'homologies sur les distances et les angles dièdres dans la séquence cible extraite de son alignement avec la structure matrice et les contraintes stéréochimiques telles que la longueur de liaison et les préférences d'angle de liaison sont obtenues à partir du champ de force de la mécanique moléculaire (MacKerell Jr *et al.*, 1998). Les préférences statistiques des angles dièdres de la chaîne principale et des distances atomiques non liées sont calculées en comparant les séquences de chaque allèle des GSTes au modèle. Le module de boucle du logiciel, modélise également toutes les boucles des GSTes par une approche d'optimisation énergétique (Fiser and Do, 2000). Par la suite, le logiciel affine les modèles en réglant automatiquement les alignements et les chaînes latérales, puis assouplit la colonne vertébrale.

**d) Validation du meilleur modèle à l'aide des script « *compare.py* » et « *evaluate\_model.py* »**

Plusieurs modèles sont calculés pour une même cible, le "meilleur" modèle 3D de chaque allèle des GSTes (D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4, E/S-GSTe6 et G/T-GSTe6) a été sélectionné grâce aux scripts « *compare* » et « *evaluate\_model.py* » de *modeller* 9.25. En effet, le script « *compare* » agit en comparant le score PROSAIL Z des modèles et les structures du modèle. Le score PROSAIL Z (fonction de notation) d'un modèle est une mesure de compatibilité entre ses séquences et la structure. En effet, le score Z du modèle généré doit être comparable à celui du modèle, il s'agit d'une évaluation interne pour déterminer si le modèle satisfait ou non aux contraintes spatiales imposées. Par contre, le script "evaluate\_model.py" évalue un modèle d'entrée avec le potentiel DOPE ici, le modèle avec la valeur la plus faible du score d'évaluation DOPE a été choisi comme meilleur modèle. Ce score est utilisé pour classer les modèles calculés à partir du même alignement (Sippl, 1993a, b).

### **II.8.1.2. Prédiction de l'affinité avec les insecticides par l'arrimage moléculaire**

L'arrimage moléculaire est la génération de multiples conformations d'un ligand. La sélection de l'orientation de ce ligand est basée sur la position de la conformation la plus appropriée dans la cible moléculaire pour former un complexe stable. Ceci en examinant et en

modélisant les différentes interactions moléculaires possibles entre le ligand et la macromolécule cible. Ces étapes peuvent être répétées itérativement jusqu'à ce qu'un résultat satisfaisant soit obtenu.

#### **a) Préparation des Ligands (insecticides)**

Les jeux de données virtuels des insecticides DDT (ZINC01530011), perméthrine (ZINC01850374), Deltaméthrine (ZINC01997854) utilisés comme ligands pour l'arrimage moléculaire ont été récupérés au format MOL2 dans la bibliothèque de la base de données ZINC (<https://zinc.docking.org/>) (Irwin and Shoichet, 2005).

#### **b) Préparation des récepteurs GSTes**

Sachant que les GSTes sont des enzymes dimériques, l'ajout du glutathion sur son site de fixation est une étape essentielle pour la prédiction de l'interaction protéine-ligand. L'ajout du glutathion sur la structure des GSTes a été fait en utilisant le logiciel *Molegro Molecular Viewer* 2.5 (MMV) de CLC bio (<http://www.clcbio.com/>). Par la suite les récepteurs D26-GSTe3-GSH, G26-GSTe3-GSH, H/E-GSTe4-GSH, Y/A-GSTe4-GSH, E/S-GSTe6-GSH, G/T-GSTe6-GSH et les ligands ont été préparés au format PDB pour la prédiction de l'affinité protéine-ligand.

#### **c) Arrimage moléculaire entre GSTes et insecticides**

La prédiction de l'affinité entre les GSTes (D26-GSTe3-GSH, G26-GSTe3-GSH, H/E-GSTe4-GSH, Y/A-GSTe4-GSH, E/S-GSTe6-GSH et G/T-GSTe6-GSH) et les insecticides (DDT, perméthrine, deltaméthrine) a été réalisée par la technique d'arrimage moléculaire à l'aide du logiciel *Molegro virtual docker*. L'arrimage moléculaire est essentiellement une procédure d'échantillonnage conformationnel dans laquelle plusieurs interactions sont explorées pour tenter de prédire la meilleur affinité protéine-ligand (Wang et al., 2003). Elle est basée sur le principe selon lequel une meilleur liaison protéine-ligand nécessite un faible niveau d'énergie au cours de la réaction (Warren *et al.*, 2006). Les conformations finales sont généralement sélectionnées en fonction de leurs scores et/ou de la productivité des poses (Leach *et al.*, 2006). L'hypothèse acceptée est que les scores énergétiques inférieurs représentent de meilleures liaisons protéine-ligand par rapport aux valeurs énergétiques plus élevées. Un certain nombre d'approches pour le choix des fonctions de notation ont été signalées et peuvent être approximativement regroupées en trois approches : les méthodes de champ de force (Goodsell *et al.*, 1996), les fonctions de notation empiriques (Wang *et al.*, 2007) et les potentiels basés sur la connaissance (Gohlke *et al.*, 2000).

Le logiciel *Molegro Virtual Docker* (MVD) est un programme automatisé de fixation des ligands et des récepteurs qui utilise un algorithme génétique pour effectuer l'arrimage moléculaire des protéines (Jones et al., 1997). *Molegro* utilise une stratégie évolutive pour explorer la variabilité conformationnelle d'un ligand flexible tout en échantillonnant simultanément les modes de liaison disponibles du ligand dans un site actif de protéine partiellement flexible. Les motifs de liaison hydrogène ont été codés dans l'algorithme de *Molegro* afin de rechercher efficacement les espaces des modes de liaison disponibles. En outre, une simple fonction de notation est utilisée pour classer les modes de liaison générés. Chaque pose potentielle est considérée comme un chromosome et se voit attribuer un score spécifique. Le chromosome contient des informations sur la cartographie d'un atome de liaison H du ligand sur des atomes de liaison H des protéines (complémentaires), la cartographie de points hydrophobes du ligand sur un point hydrophobe de la protéine et la conformation autour des liaisons flexibles du ligand et des groupes -OH de la protéine. Ici, la fonction de fitness ChemScore a été choisie, car elle fait ressortir l'affinité de liaison entre la protéine et le ligand (Eldridge *et al.*, 1997). La fonction a été dérivée empiriquement à partir d'un ensemble de 82 complexes protéine-ligand pour lesquels des affinités de liaison mesurées étaient disponibles (Baxter *et al.*, 1998). Le ChemScore estime le changement total d'énergie libre lorsque le ligand se lie à son récepteur respectif. Le site actif de la protéine a été défini comme une cavité de liaison (sphère) de 20Å de rayon centrée sur l'atome de soufre (S) du glutathion. 50 poses protéine-ligand ont été générées pour chaque insecticide et classées en fonction de l'énergie nécessaire pour la réaction. Les solutions avec les scores les plus élevés et ayant des orientations plus productrices ont été sélectionnées pour une analyse plus approfondie. La visualisation et la préparation des figures d'arrimage moléculaire ont été réalisées à l'aide du logiciel PyMOL 1.7 (Schrödinger, Inc).

## **II.8.2. Validation fonctionnelle du rôle des GSTs epsilon dans la résistance aux insecticides**

### **II.8.2.1. Réduction du niveau d'expression des GSTes par la technique de l'ARN interférence**

#### **II.8.2.1.1. Principe du mécanisme d'ARN interférence**

La validation de l'impact de la surexpression d'un gène sur la résistance par la technique de ARN interférence passe par les étapes de synthèse de l'ARN double brin, d'administration de l'ARNdb aux moustiques, de vérification de l'effet *knockdown* et d'évaluation de l'impact de la réduction de l'expression des gènes *knockdown in vivo* sur le profil de résistance de ces derniers à travers l'exposition des moustiques injectés aux insecticides.

### a) Synthèse des ARN double brin

Les ARN double brins spécifiques aux GSTes ont été synthétisés pour être utilisés dans des expériences de knockdown génique (ARNi). Chaque amorce oligonucléotidique de GSTe a été conçue en utilisant l'ADNc spécifique des gènes correspondants téléchargés à partir de *Vector Base* (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>, consulté le 8 décembre 2016). L'ARN polymérase T7 de la séquence promotrice, TAATACGACTCACTATAGGGAGA, a été ajouté à la fin de chaque amorce (annexe 2d). Des fragments spécifiques de GSTe2, 3, 4, 5, 6, 7 et GSTe8 étaient amplifiés par PCR à partir de clones plasmidiques à l'aide du kit KAPA Taq (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA). L'ARN double brin (ARNdb) a été synthétisé par transcription *in vitro* à l'aide du kit MEGAscript® T7 (Ambion Inc., Austin, TX, USA) et purifié avec les colonnes MEGAclear de Ambion. Les produits purifiés ont été concentrés par précipitation à l'éthanol et l'ARNdb a été remis en suspension dans de l'eau exempte de nucléase et stocké à -20 °C. L'évaluation de la qualité du double brin d'ARN synthétisé s'est faite par électrophorèse en migrant 3 µL de produits dilués d'ARNdb dans 1,5 % de gel d'agarose dans un tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) et par séquençage.

### b) Injection des moustiques

La validation du rôle des GSTes dans le phénomène de résistance aux insecticides grâce à la technique d'interférence par ARN a été effectuée sur la première génération des spécimens d'*An. funestus* de Mibellon/Cameroun. Les ARN double brin synthétisés dbGSTe2, dbGSTe3, dbGSTe4, dbGSTe5, dbGSTe6, dbGSTe7 et dbGSTe8 ont été injectés aux moustiques âgés de 2 à 3 jours à l'aide d'un nano injecteur (Nanoinject II ; Drummond, Burton, OH, USA) selon le Protocole décrit par Blandin et collaborateurs en 2016 (Blandin *et al.*, 2002). En effet, 69 nl d'ARN double sont injectées dans l'hémolymphe du moustique endormi par du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) au niveau du spiracle du thorax, afin d'inhiber l'expression des GSTes spécifique à chaque ARN double brin. Après injection, les moustiques sont nourris à l'eau sucrée et remis en condition optimisée d'élevage, à 26°C et 80 % d'humidité pendant 4 jours le temps de permettre que l'effet *knockdown* des gènes GSTes ciblés soit effectif avant leurs expositions aux insecticides. Pour s'affranchir des biais expérimentaux, un même volume d'ARN double brin du gène GFP (Green fluorescence protein) exprimé chez la méduse a été injecté aux moustiques utilisés comme contrôle dans l'optique de nous rassurer que la mortalité obtenue ne soit pas due au processus d'injection.

### **c) Exposition des moustiques aux insecticides après inhibition de l'expression des GSTes**

Les tests de sensibilités aux insecticides ont été effectués selon le protocole décrit par l'OMS (OMS, 2016a) sur les moustiques injectés pour évaluer l'effet de la réduction de l'expression des GSTes sur la résistance aux insecticides testés. En effet, quatre jours après injection, quatre reliquats de 25 moustiques injectés par chaque dbGSTes ont été transférés dans les tubes tests et exposés à la perméthrine (0,75 %), la deltaméthrine (0,05 %) et au DDT (4 %) pendant 1 h. Par la suite, les moustiques ont été transférés dans les tubes d'observation et les mortalités ont été relevées 24 h après exposition. Les moustiques injectés aux dsGFP et ceux non injectés ont été utilisés comme contrôles et ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales que ceux injectés aux dsGSTes.

### **d) Validation de l'effet knockdown de l'expression des GSTes chez les moustiques injectés par qRT-PCR**

La vérification de la réduction du niveau d'expression des GSTes chez les moustiques ayant reçu l'ARN double brin a été réalisée par la technique de PCR quantitative à temps réel utilisant l'agent intercalaire Syrb green. En effet, 4 jours après injection du dbGSTes les ARN des moustiques injectés et ceux n'ayant pas reçu de dbGSTes ont été extraits et leurs cDNA synthétisés. Par la suite, le niveau d'expression des GSTes a été déterminé à l'aide des amorces de PCR en utilisant le protocole précédemment décrit (section II.5.1.2). La validation de la réduction du niveau d'expression des GSTes chez les moustiques injectés a été faite en comparant le niveau d'expression des GSTes chez les moustiques injectés comparés à ceux des moustiques non-injectés après normalisation avec le niveau d'expression des gènes de ménage RPS7 (AFUN007153) et actin5C (AFUN006819).

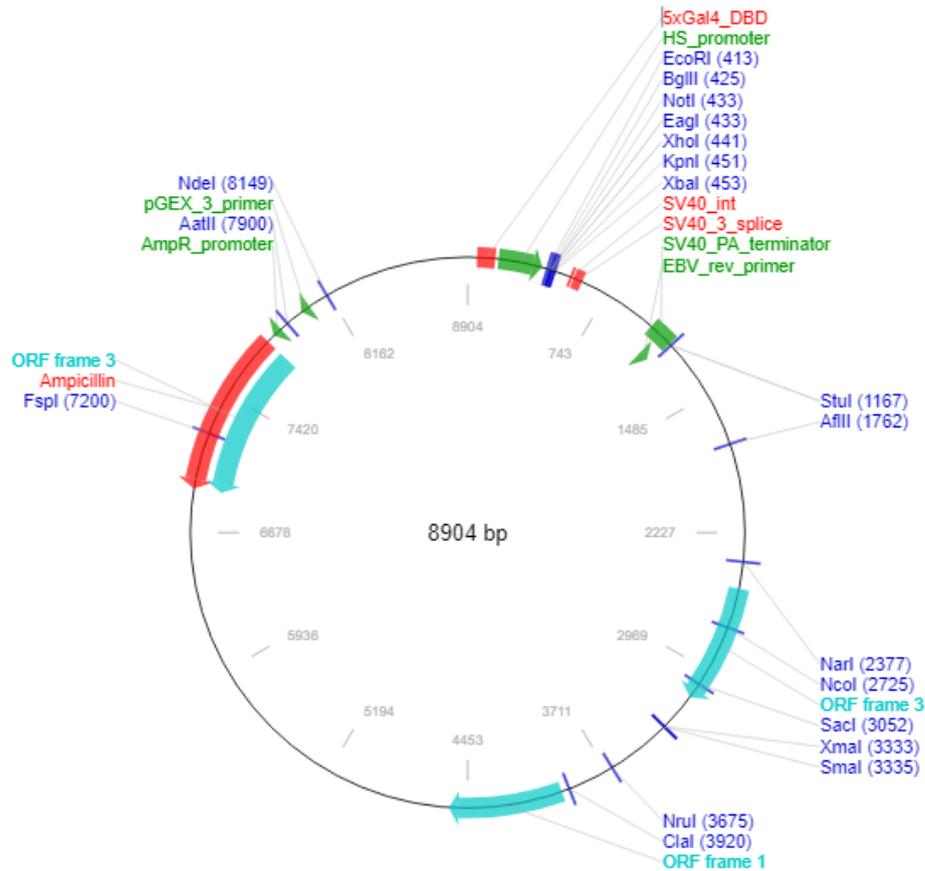
## **II.8.2.2 Expression transgénique des gènes d'intérêts chez la drosophile en utilisant le system GAL4-ACTIN II**

Après l'étude du polymorphisme des acides aminés des GSTes les allèles D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4 et Y/A-GSTe4 et GSTe6 ont été sélectionnés et exprimés chez *Drosophila melanogaster* dans le but d'évaluer l'impact de leur surexpression et de la présence des variations alléliques sur la résistance aux insecticides.

### **II.8.2.2.1. Construction des drosophiles transgéniques possédant les GSTes d'*An. funestus***

Les plasmides contenant les allèles D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4 et GSTe6 ont été digérés par les enzymes de restriction XbaI et BglI à l'aide du kit *Fast digest*

enzyme de NEB-cutter (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) afin d'extraire les allèles d'intérêts dans le vecteur Pjet 1.2 précédemment clonés dans la partie recherche des marqueurs (section II.5.3). Puis ces allèles candidats de GSTes ont été clonés dans le vecteur d'expression de la drosophile pUASattB (Figure 26 ; provenant de Dr J Bischof, de l'université de Zurich) préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le milieu réactionnel constitué de 12 µl de produit purifié des allèles de GSTes, 2 µl du vecteur pUASattB, 1 µl de tampon de ligation et 1 µl de ligase T4 du kit thermofisher et de 4 µl d'eau distillée a été incubé 1 h à température ambiante. Les produits de ligation ont été transformés dans la cellule bactérienne *E. colis* JM119 (Promega, Madison, Wi, US) et cultivés sur milieu Agar solide enrichit à l'ampicilline pendant 16 h à 37°C. A la suite d'une PCR de sélection les plasmides recombinants obtenus pUAS:D26-GSTe3, pUAS::G26-GSTe3, pUAS::H/E-GSTe4, pUAS::Y/A-GSTe4 et pUAS:: GSTe6 ont été purifiés à l'aide du kit de midiprep de Qiagen selon les instructions du fabricant. Les midiprep pUAS::D26-GSTe3, pUAS::G26-GSTe3, pUAS::H/E-GSTe4, pUAS::Y/A-GSTe4 et pUAS:: GSTe6 ont été séquencés pour se rassurer de l'effectivité de la ligation des allèles des GSTes au vecteur pUAS avant son injection aux drosophiles. Les Minipreps contenant les ADN recombinants ont été injectés dans la lignée germinale de *D. melanogaster* portant le site de fixation attP40 sur le chromosome 2 ( $y^1w^{67c23}; P$  (CaryP) attP40,1;2) selon le protocole décrit par Markstein (Markstein *et al.*, 2008). Les drosophiles transgéniques UAS::D26-GSTe3, UAS::G26-GSTe3, UAS::H/E-GSTe4, UAS::Y/A-GSTe4 et UAS:: GSTe6 ont été générées et équilibrées au département de génétique de l'université de Cambridge (*fly genetic department of Cambridge University*). Les drosophiles contrôles ont reçu une injection du vecteur ne comprenant aucun gène.

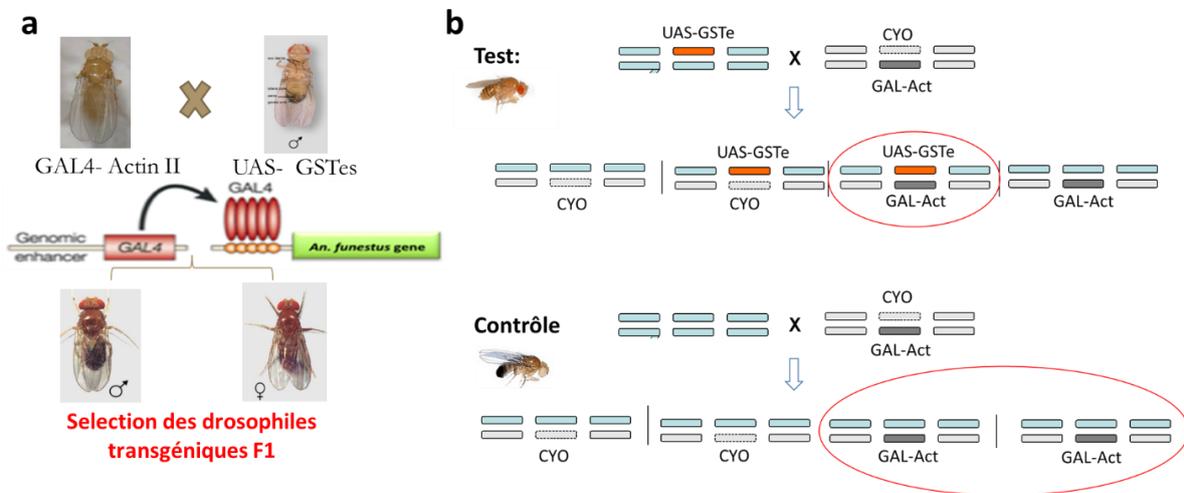


**Figure 26 :** Vecteur d'expression des drosophiles pUAST.  
 (source : <https://www.addgene.org/vector-database/4473/>)

### II.8.2.2.2. Activation de l'expression des GSTes et validation de la surexpression des GSTes chez les drosophiles transgéniques

L'activation de la transcription des gènes clonés chez les drosophiles s'est faite après croisement de la lignée UAS-GSTes avec la lignée GAL4-ActinII (Figure 27). A l'issue de ce croisement la première génération ayant le phénotype yeux orange et ailles lisses a été sélectionnée pour les tests, car cette dernière est celle qui exprime les GSTes. En effet, lors du croisement de la lignée UAS-GSTes avec la lignée GAL4-ActinII, le GAL4 ira se fixer sur le UAS et ceci va activer la traduction des gènes d'intérêts chez les drosophiles. Pour confirmer l'expression des GSTes chez les drosophiles transgéniques et l'absence de l'expression des GSTes chez les drosophiles contrôles, l'ARN total a été extrait de trois pools de cinq Drosophiles issus de la première génération du croisement UAS-GSTes et GAL4-ActinII et la synthèse d'ADNc a été réalisée. La validation du niveau d'expression des transgènes *GSTe3*, *GSTe4* et *GSTe6* s'est faite par la PCR quantitative à temps réel utilisant l'agent intercalaire Sybr Green sur les ADNc synthétisés à l'aide des amorces spécifiques de *GSTe3*, *GSTe4* et *GSTe6* donc les séquences sont consignées en annexe 2b. Le niveau d'expression comparatif

des GSTes entre les drosophiles expérimentales et contrôles a été effectué avec normalisation à l'aide du gène de ménage RPL11.

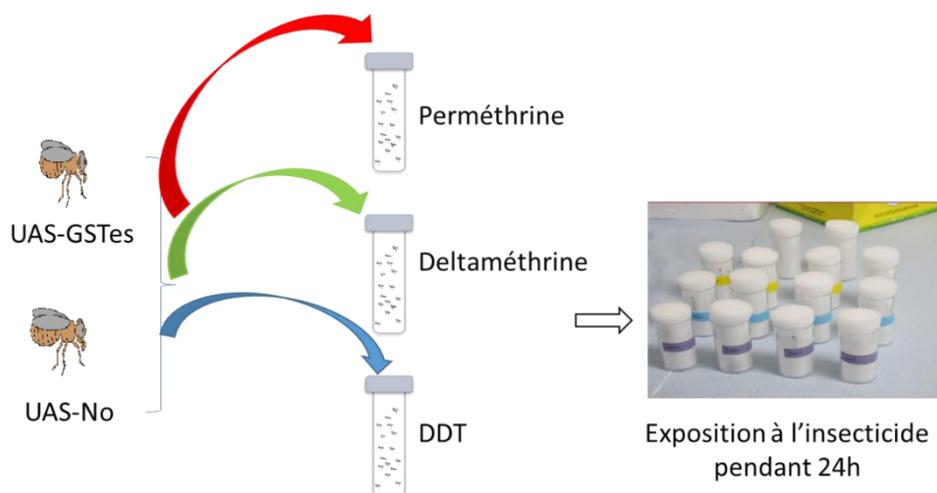


**Figure 27** : Activation de la transcription des GSTes chez les drosophiles suite au croisement de la lignée UAS-GTés avec la lignée Gal4-Actin.

a) schéma du principe d'activation du système GAL4/UAS adapté aux drosophiles melanogaster ; b) Criblages génétiques des drosophiles exprimant les GSTes qui donnent des phénotypes spécifiques lorsqu'ils sont exprimés dans un tissu particulier. (Source : Daniel St Johnston. *Nature Reviews Genetics*, 2002).

### II.8.2.2.3. Exposition des drosophiles transgéniques aux insecticides

En vue d'évaluer l'impact de la surexpression des GSTes sur la résistance aux insecticides indépendamment des autres gènes de détoxification du moustique, les femelles de première génération exprimant D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4 et GSTe6 ont été sélectionnées comme groupes expérimentaux pour l'exposition aux insecticides (Figure 28). Les drosophiles ne portant pas de transgènes de GSTes mais ayant reçu le même vecteur pUAS ont été utilisées comme témoins. De manière pratique, 5 reliquats de 20 à 25 drosophiles transgéniques femelles âgées de 2 à 5 jours du groupe expérimental et du groupe témoin ont été exposées au DDT (4%), à la perméthrine (2%) et à la deltaméthrine (0,15 %) et les mortalités ont été enregistrées après 1h, 2h, 3h, 6h, 12h et 24h à une température de 25-27°C et une humidité relative de 70-75%. Pour ce qui est de l'analyse des données, une comparaison du taux de mortalité entre les groupes expérimentaux et les groupes témoins a été faite pour évaluer l'impact de la surexpression des GSTes et des variations alléliques observées sur la résistance aux insecticides testés. Le test de *t-student* a été utilisé pour faire l'analyse statistique en comparant les différences de mortalité entre les drosophiles exprimant les différents allèles de GSTes et le groupe témoin.



**Figure 28** : Protocole d'exposition des drosophiles transgéniques à la perméthrine, à la deltaméthrine et au DDT (Riveron *et al.*, 2014).

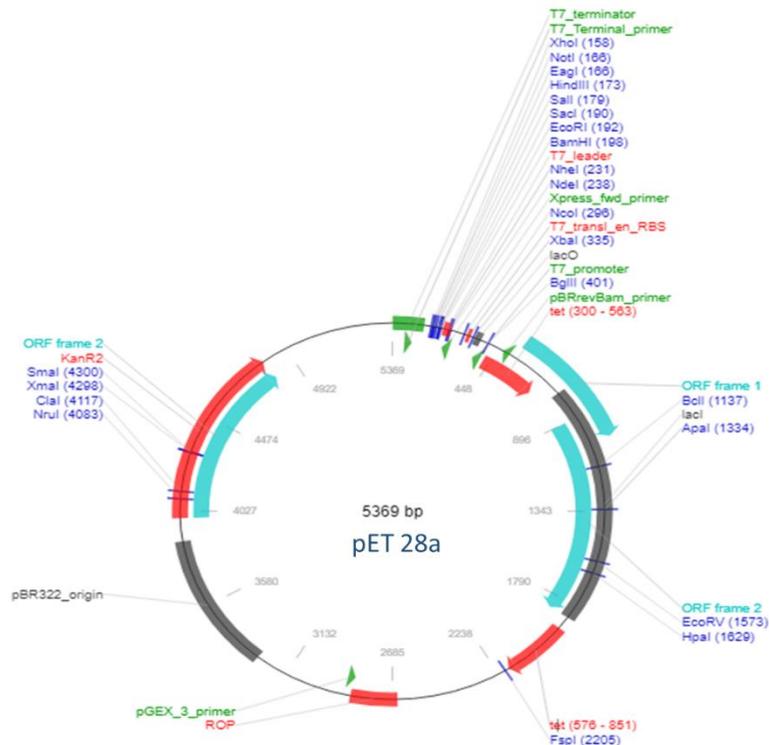
### II.8.2.3. Expression hétérologue des protéines et détermination de l'activité métabolique des GSTes

#### II.8.2.3.1. Expression hétérologue et purification des protéines recombinantes

##### a) Clonage des GSTes dans le vecteur d'expression : pET28a

Les allèles de GSTes sélectionnés ont été extraits du vecteur pJET précédemment clonés avec les enzymes de restriction XhoI et NdeI. Le vecteur d'expression des GSTes chez les moustiques pET28a (Figure 29) a été digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Par la suite, ces allèles de GSTes ont été clonés dans le vecteur pET28a entre les sites de restrictions enzymatiques NdeI et XhoI. En effet, en présence de 3 ml de tampon de digestion, 10 µl des plasmides (pJET::D26-GSTe3, pJET::G26-GSTe3, pJET::H/E-GSTe4, pJET::Y/A-GSTe4, pJET::E/S-GSTe6, pJET::G/T-GSTe6, pJET::GSTe1 et pET28a::GSTe7) et 10 µl du vecteur ont été mis en contact avec 1 µl de chaque enzyme de restriction et le milieu réactionnel a été complété à 20 µl en ajoutant de l'eau distillée. Les mélanges ont été incubés à 25°C pendant 30 minutes. Après incubation les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 2 % pendant une migration de 45 min avec un voltage de 120 W. Les allèles de GSTes et le vecteur pET28a ont été extraits du gel et purifiés à l'aide du kit d'extraction du gel (PCR gel extraction kit de Qiagen). Par la suite les allèles obtenus ont été ligués dans le vecteur pET28a à l'aide du Kit de clonage de thermofisher, transformés dans la cellule bactérienne *Escherichia coli* BL21 (DE 3) (Novagen, Madison, WI, US) et cultivés dans un milieu sélectif comprenant la Kalamycine comme antibiotique. Les ADN recombinants obtenus après une PCR de sélection et les plasmides suivant ont été construits et purifiés à l'aide du kit de synthèse des minipreps : pET28a::D26-GSTe3, pET28a::G26-GSTe3, pET28a::H/E-GSTe4,

pET28a::Y/A-GSTe4, pET28a::E/S-GSTe6, pET28a::G/T-GSTe6, pET28a::GSTe1 et pET28a::GSTe7. Les plasmides obtenus ont été séquencés et analysés dans le but de se rassurer que les allèles ont été insérés dans le vecteur dans la bonne orientation et aussi de la qualité des plasmides obtenus avant la synthèse des protéines.



**Figure 29 :** Vecteur d'expression des protéines pET 28a.  
(Source : <https://www.addgene.org/vector-database/2565>)

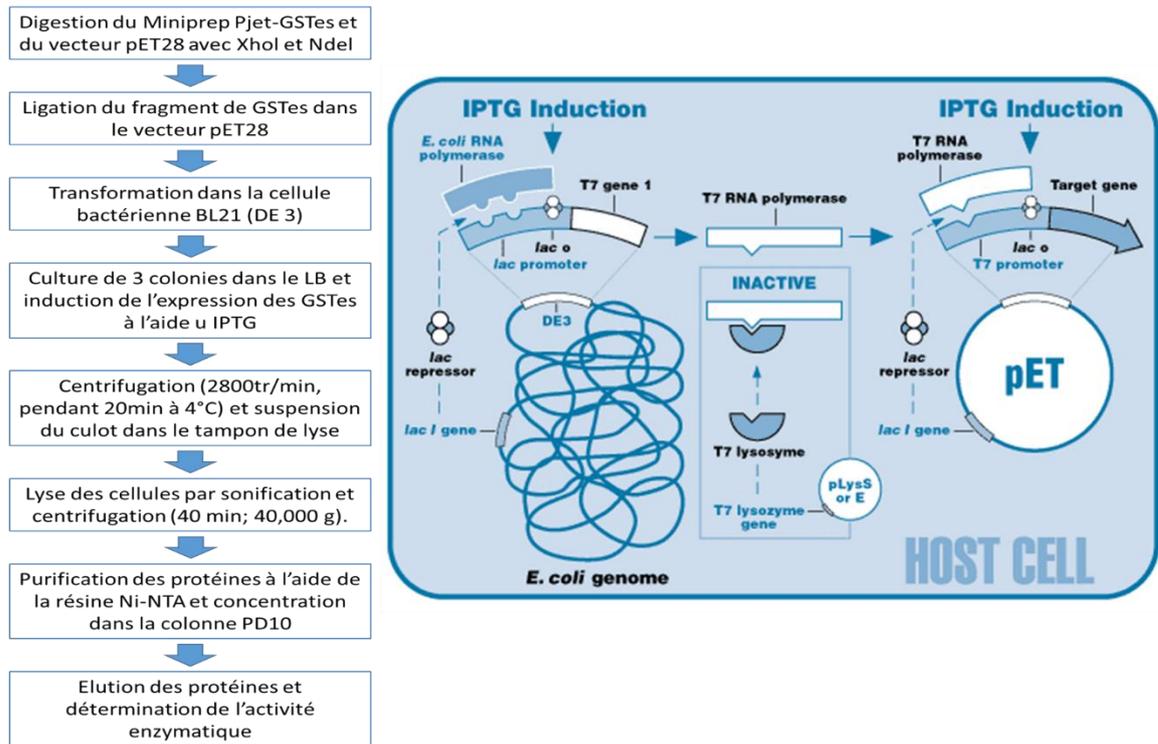
### b) Induction de l'expression hétérologue des protéines d'intérêts

L'induction de la synthèse des protéines s'est faite à l'aide de l'isopropyl-β-D-thiogalactoside. Pour y parvenir, 2 µl de plasmides recombinants (GSTes-Pet28a) ont été transformés dans la cellule bactérienne *Escherichia coli* BL21 et pré-cultivés dans le milieu agar liquide enrichi de kalamycine (50 ng/µl) à 378 g, 37°C pendant environ 10 h. Par la suite, 5 ml de la pré-culture ont été inoculés dans 400 ml de milieu agar liquide contenant la kalamycine (50 µg/ml) plus le chlorenfenicol (35 µg/ml) et incubés à 37°C pendant environ 3 h. Lorsque la densité optique à 600 nm était comprise entre 0,6 et 0,8 ; 1 ml isopropyl-β-D-thiogalactoside 0,3 mM a été ajouté à la culture pour induire l'expression des GSTes et le mélange réactionnel a été agité à une vitesse de 300 g pendant 24 h à 16°C. Après 24 h d'induction de l'expression des protéines, le mélange réactionnel a été transféré dans des boîtes à centrifugation dans la glace et les cellules ont été extraites par centrifugation à 4000 g, pendant

20 min à 4°C et à 12250 JLA. Après centrifugation, le culot comprenant les cellules a été conservé à -80°C.

### **c) Purifications des protéines de GSTes synthétisées**

Les cellules contenant les protéines des GSTes obtenues après centrifugation ont été suspendues dans le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 500 mM, imidazole 20 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 5 mM et les cellules ont été détruites par sonification pendant 10 minutes suivie d'une centrifugation (40 min, 40000 g). Le surnageant a été filtré et purifié à l'aide de la résine Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA, US) selon les instructions du fabricant. En effet, 3 ml de Ni-NTA et 3 ml d'éthanol 100 % ont été ajoutés au surnageant et le mélange a été centrifugé (5 min, 5000 g). Puis, 7 ml de tampon de lyse ont été ajoutés au culot puis le mélange a été centrifugé (5 min, 5000 g, 4°C) et le surnageant a été introduit dans la résine Ni-NTA. La purification des GSTes s'est faite dans une chambre froide à 4°C. La résine a été lavée par ajout de 10 ml de tampon de lavage dans la résine et les protéines ont été obtenues en introduisant 1 ml de tampon d'élution. Dans le but d'éliminer l'imidazole sur les protéines, la colonne PD10 Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences Limited, London, UK) a été utilisée. En effet, les protéines ont été introduites dans la colonne et 2,5 ml de tampon d'équilibre ont été ajoutés (Figure 30). Les protéines des GSTes synthétisées ont été concentrées à l'aide du concentrateur de protéines de 10 kDa Amicon (YM-10 ; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). La concentration finale des protéines obtenues a été déterminée par spectrophotométrie à 280nm et ces protéines ont été conservées à -80°C.



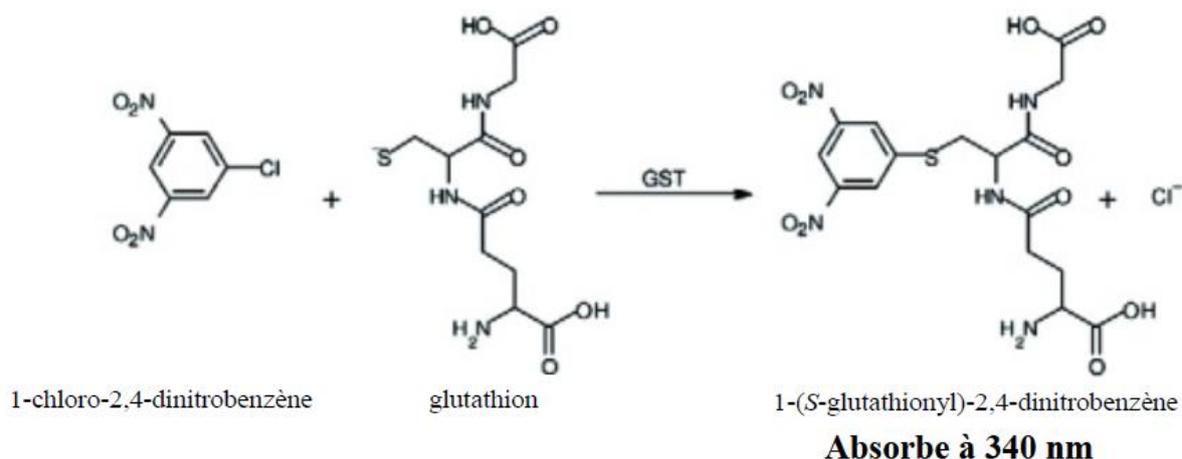
**Figure 30 :** Expression hétérologue et purification des GSTes sous le contrôle du promoteur T7.

### II.8.2.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique des GSTes *in vitro*

#### a) Evaluation de l'activité de conjugaison du CNDB par les protéines synthétisées

##### ✚ Principe

Les glutathion s-transférases catalysent la réaction de conjugaison du 1 chloro-2,4-dinitrobenzene en présence du glutathion réduit. En effet, les GSTs catalysent la réaction de conjugaison du glutathion en impliquant un substrat électrophile qui subit une attaque nucléophile de la part d'un glutathion activé sous forme d'anion thiolate. Le produit est donc glutathionylé. On peut parler d'activité glutathion transférase. Le test classique permettant de mettre en évidence cette réaction par spectrophotométrie consiste à conjuguer le glutathion sur du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) qui a la particularité d'absorber à une longueur d'onde de 340 nm une fois conjugué (Habig *et al.*, 1976) (Figure 31).



**Figure 31** : Réaction de conjugaison du chlorodinitrobenzène (CDNB) par les GSTs

**Mode opératoire :**

L'activité de conjugaison du CNDB par les protéines de GSTes synthétisées a été mesurée par spectrophotométrie à 340 nm dans un mélange réactionnel de 200 µL constitué de : 5 µL de GSTes, 191 µL de tampon phosphate 0,1 M contenant 1 M EDTA, 2 µL de GSH 200 mM et 2 µL de CDNB 100 mM (Tableau III). L'activité a été mesurée toutes les 20 sec pendant 10 min. La conjugaison spontanée du contrôle (GSH et du CDNB dans un milieu ne contenant pas les GSTes) est mesurée et les valeurs sont soustraites aux activités mesurées pour les groupes expérimentaux. L'expérience a été faite en tripliquet pour chaque traitement.

**Tableau III** : Composition du milieu réactionnel du test de conjugaison du CNDB

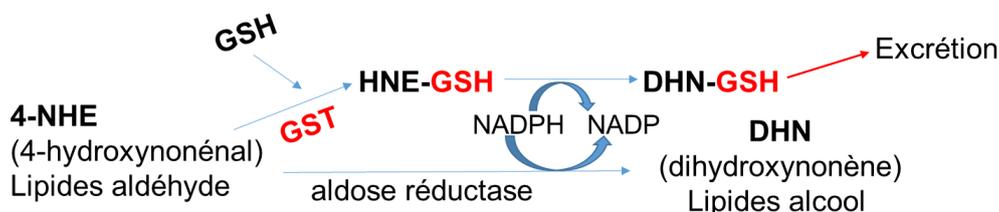
Milieu réactionnel	Contrôle	Expérimental
<b>Tampon phosphate 0,1M + EDTA</b>	196µl	191µl
<b>200mM GSH</b>	2µl	2µl
<b>GSTes</b>	/	5µl
<b>100mM CNDB</b>	2µl	2µl
<b>Volume final</b>	200µl	200µl

**b) Evaluation de l'activité de conjugaison du 4-hydroxynenal par les protéines synthétisées**

**Principe :**

Pendant un stress oxydant, de nombreuses espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites, parmi lesquelles se trouvent des peroxydes. Les GSTs peuvent agir sur certains hydroperoxydes de lipides ou d'acides gras, créés lors d'un stress oxydant (Hurst 1998 ; Yang 2002 ; Prabhu 2004). C'est le cas par exemple du 4-hydroxynonanal (HNE), impliqué dans la

signalisation cellulaire et dont la concentration intracellulaire peut être régulée par les GST par une action de conjugaison avant d'être transporté dans un autre compartiment cellulaire ou en dehors de la cellule (Hiratsuka 2000). En effet, en présence des GSTs, le glutathion réduit s'attache sur le 4-hydroxynenal pour former un lipide alcools, le glutathionyl dihydroxynonène qui est excrété de l'organisme comme l'illustre la figure 32.



**Figure 32** : Réaction de conjugaison du 4-hydroxynenal (4-NHE) par les GSTs

#### Mode opératoire

L'évaluation de l'activité de conjugaison du 4-NHE par les GSTes synthétisées s'est faite par spectrophotométrie à une D.O de 224 nm. Le milieu réactionnel était constitué de 5 µl de GSTes, 191 µl de tampon phosphate 0,1 M contenant 1 M EDTA et 2 µl de GSH 200 mM et après ajout de 2 µl du 4-NHE 80 Mm, le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 30°C avant la lecture des longueurs d'ondes (Tableau IV). L'activité a été mesurée toutes les 20 sec pendant 10 min. La conjugaison spontanée du contrôle (GSH et du 4-NHE dans un milieu ne contenant pas les GSTes) est mesurée et les valeurs sont soustraites aux activités mesurées pour les groupes expérimentaux. L'expérience a été faite en tripliquet pour chaque traitement.

**Tableau IV** : Composition du milieu réactionnel du test de conjugaison du 4-NHE

Milieu réactionnel	Contrôle	Expérimental
Tampon phosphate 0,1M + EDTA	196µl	191µl
200mM GSH	2µl	2µl
GSTes	/	5µl
80mM 4-NHE	2µl	2µl
Volume final	200µl	200µl

#### c) Evaluation de l'activité métabolique des GSTes vis-à-vis de l'insecticide

Dans le but de déterminer l'habileté des protéines synthétisées à métaboliser le DDT, la perméthrine et la deltaméthrine, celles-ci ont été mises en contact avec les insecticides et les produits du métabolisme ont été identifiés par chromatographie haute performance liquide

(Figure 33). En effet, dans des tubes Eppendorf, 18  $\mu\text{l}$  de protéines de GSTes ont été mis en contact avec 2,5  $\mu\text{l}$  de glutathion réduit en présence de 169,5  $\mu\text{l}$  de phosphate de potassium 0,1 M à pH 6,5. Chez le groupe contrôle le GSH a été substitué par le tampon phosphate de potassium. Le mélange a été centrifugé avec une vitesse de 1700 g pendant 3 min à 37°C. Le test s'est fait en tripliquet. Puis 10  $\mu\text{l}$  d'insecticide (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DDT, 0.025 mg/ml perméthrine ou 0.03 mg/ml deltaméthrine) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé pendant 1 h à 37°C avec une vitesse d'agitation de 1700 g pour permettre que la réaction puisse se dérouler entre l'insecticide et les protéines de GSTes (Tableau V). Pour mettre fin à la réaction, 500  $\mu\text{l}$  de méthanol ont immédiatement été ajoutés au terme de 1 h d'incubation. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés à 1700 g pendant 20 min à température ambiante et 200  $\mu\text{l}$  du surnageant résultant ont été transférés dans des flacons de HPLC. Les quantités de produits de métabolisme formés (DDE) et de substrats (DDT, perméthrine et deltaméthrine) restants dans le milieu réactionnel ont été déterminées pour chaque échantillon par la technique de HPLC en phase inverse à une longueur d'onde de 232 nm (*Chromeleon, Dionex, Sunnyvale, CA, US*). Brièvement, 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon ont été injectés dans une colonne de 250 mm (*Acclaim 120, Dionex, Sunnyvale, CA, US*) à 23°C. La séparation du DDT et du DDE a été réalisée en utilisant une phase mobile isocratique de 92 % de méthanol et 8 % d'eau avec un débit de 1 ml/min.

**Tableau V:** Composition du milieu réactionnel de la détermination de l'activité métabolique des protéines recombinantes

Milieu réactionnel	Contrôle	Expérimental
Tampon phosphate 0.1M + EDTA	196 $\mu\text{l}$	191 $\mu\text{l}$
200mM GSH	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
GSTes	/	5 $\mu\text{l}$
Insecticide	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
Volume final	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$



**Figure 33 :** HPLC utilisé pour détection des métabolites présents dans le milieu réactionnel après le contact entre l'insecticide et les protéines synthétisées en présence du glutathion réduit. (Source : Kouamo, 2020).

## **II.9. Evaluer l'impact des variations alléliques de GSTe2 sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique au Cameroun**

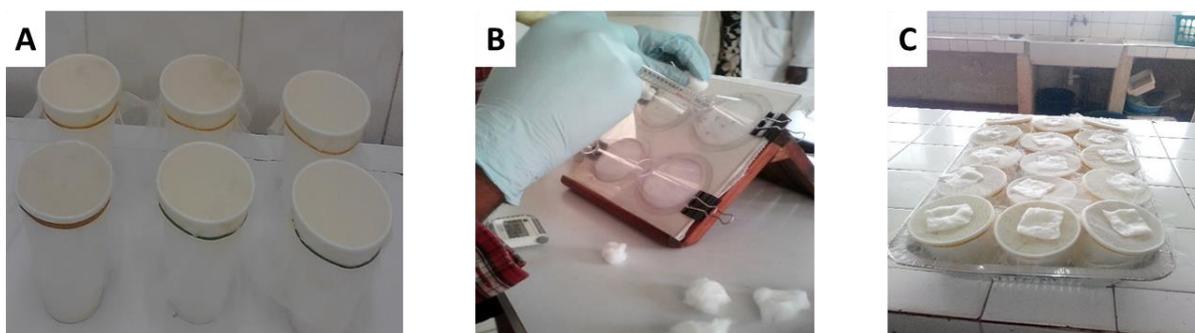
### **II.9.1. Evaluation de l'efficacité des moustiquaires par la technique des tests en cône**

L'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide utilisées au Cameroun et recommandées par l'OMS a été faite par la technique des tests en cône de l'OMS (OMS, 2016), sur la première génération des échantillons d'*An. funestus* de Mibellon. Les moustiques de la souche sensible de référence aux insecticides « souche FANG » ont été également utilisés comme contrôle. Le test a été réalisé avec des moustiquaires standards contenant uniquement des pyréthriinoïdes (PermaNet® 2.0 et Olyset) et des moustiquaires de seconde génération qui contiennent en plus de l'insecticide, le synergiste PBO (Permanet 3.0 et Olyset plus) (Tableau VI).

En effet, à l'aide d'un aspirateur à bouche, 10 femelles âgées de 3 à 5 jours non gorgées sont mises au contact de la moustiquaire pendant 3 min sous les cônes en plastique standard de l'OMS (Figure 34). Après cette période d'exposition, les moustiques sont transférés dans les gobelets couverts de tuiles de moustiquaires non imprégnées et après 60 min l'on dénombre ceux qui sont assommés (knock-down) puis on laisse séjourner 24 h : période pendant laquelle ils sont nourris avec une solution de sucrose à 10 % en condition standard d'insectarium. Le test est fait avec cinq reliquats de 10 moustiques chacun. A la fin du test, les pourcentages de mortalité dans les gobelets expérimentaux et contrôles ont été calculés. Si la mortalité chez les

contrôles est inférieure à 5 %, le test est validé par contre, si la mortalité de ces derniers est supérieure à 20 %, l'expérience n'est pas valable, elle est annulée et reprise. Néanmoins, si la mortalité du contrôle est comprise entre 5 % et 20 %, la mortalité du groupe expérimentale devra être corrigée par la formule d'Abott (1925) comme suit :

$$\text{mortalité corrigée} = \frac{\% \text{ mortalité observée} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}} \times 100$$



**Figure 34 :** Procédure des tests en cône pour évaluer l'efficacité des moustiquaires. (A) Conditionnement des moustiquaires, (B) trois minutes d'exposition, (C) 24 h d'observation.

**Tableau VI :** Description de la composition des MILDA testées

MILDA	Description	Fabricant
Non traitée	100 % polyester sans insecticide	Marché local
Olyset	$8,6 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (2 %) de perméthrine incorporés dans le polyéthylène	Sumitomo Chemical
Olyset Plus	$8,6 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (2 %) de perméthrine et $4,3 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (2 %) de Piperonyl butoxide (PBO) incorporés dans le polyéthylène	Sumitomo Chemical
PermaNet 2.0	100 % polyéthylène coté avec 1,8 g/kg de deltaméthrine	Vestergaard Frandsen
PermaNet 3.0	Combinaison de 2,8 g/kg de deltaméthrine enduite sur polyester avec bordure renforcée et deltaméthrine (4,0 g/kg) et PBO (25 g/kg)	Vestergaard Frandsen

## II.9.2. Génotypage du locus GSte2 pour détecter la mutation L119F

Pour étudier l'association entre la présence de la mutation L119F-GSte2 et l'habilité des moustiques à survivre en présence des insecticides, les moustiques issus des tests ont été génotypés à l'aide d'un test de diagnostic *Allele Specific-PCR* (AS-PCR) nouvellement conçu (Tchouakui *et al.*, 2018). En effet, deux paires d'amorces sont nécessaires pour la méthode AS-PCR (deux amorces externes et deux amorces internes). Des amorces spécifiques ont été conçues manuellement pour pouvoir discriminer les deux allèles de la mutation L119F et un changement a été fait sur le 3<sup>e</sup> nucléotide à partir de l'extrémité 3' de chaque amorce interne pour renforcer la spécificité (Tableau VII, Annexe 1). Le milieu réactionnel contenait : 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10× (*Buffer A*, Qiagen), 0,75 µl de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), 0,12 µM de dNTPs, 0,51 µl de chaque amorce, 0,12 µl de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µl. Après une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, 30 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C, 1 minute à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C dans un thermocycleur (*GeneTouch Bioer*). Les produits amplifiés ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % contenant 1 µl de *Midori Green* (intercalant de l'ADN double brin) suivant la procédure précédemment décrite (identification des espèces du groupe *Anopheles funestus*).

**Tableau VII :** Liste des séquences d'amorces utilisées pour le génotypage

Amorces	Séquence (5' - 3')
Gste2F	ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT
Gste2 R	TCAAGCTTTAGCATTTTCCTCCTT
L119F-Res	CGGGAATGTCCGATTTTCCGTAGAAAA
L119-F-Sus	CATTTCTTATTCTCATTTACAGGAGCGTATC

## II.10. Exploitation et analyses des données

De manière générale, les données ont été saisies et analysées dans le logiciel Excel version 2016, les graphes ont été construits à l'aide du logiciel GrapPad V7.0. Les diagrammes de venn ont été générés à l'aide du logiciel Rstudio. Le seuil de signification pour toutes les analyses était de  $\alpha=0,05$ .

### **II.10.1. Test de résistance aux insecticides et de bio-efficacité des moustiquaires**

La variable mesurée est la mortalité qui correspond au nombre de moustiques morts au bout de 24 heures après exposition à l'insecticide ou à la moustiquaire imprégnée. Les taux de mortalité (en pourcentage) entre différents groupes ont été comparés à l'aide du test de Chi carré de comparaison des proportions et ont été interprétés suivant les recommandations de l'OMS (OMS, 2016) définis de la manière suivante :

- Taux de mortalité compris entre 98-100 % : population sensible ;
- Taux de mortalité compris entre 90-97 % : résistance probable de la population ;
- Taux de mortalité inférieur à 90 % : population résistante.

### **II.10.2. Analyse des séquences et cartographie des polymorphismes**

Le traitement des séquences et la détection des sites polymorphes ont été réalisés à l'aide des logiciels BioEdit version 7.2.3.0 (Hall, 1999) et CLC Sequence Viewer 6.8 (<http://www.clcbio.com/>). DnaSP 5.10.01 (Librado et Rozas, 2009) a été utilisé pour analyser les paramètres de la diversité génétique telles que la diversité des nucléotides et celle des haplotypes. Des arbres phylogénétiques voisins-joignants de tous les haplotypes d'allèles des GSTes ont été construits à l'aide du logiciel MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Après des analyses de séquences, l'haplotype prédominant de chaque pays a été sélectionné pour une analyse plus approfondie. Les séquences d'acides aminés ont été générées *in silico* à l'aide du module d'analyse de nucléotides CLC Sequence Viewer et utilisées pour des analyses supplémentaires et l'identification de mutations.

### **II.10.3. Caractérisation structurelle des GSTes *in silico***

La modélisation de la structure 3D de GSTes a été réalisée à l'aide du logiciel Modeler version 9.25 et le cofacteur (GSH) a été attaché sur les GSTes grâce au logiciel Pymol2. La vérification de la qualité des structures 3D modélisées s'est faite en ligne sur le programme ERRAT. L'assemblage et la compréhension des réseaux d'interactions entre les protéines et les ligands ont été effectués par la technique d'arrimage moléculaire à l'aide du logiciel Molegro virtual docker. Un logiciel conçu pour prédire comment les petites molécules se lient à un récepteur de structure 3D. Le résultat de cette interaction a été visualisé sur PyMol 2.0 qui est un logiciel de visualisation des structures chimiques en 3D.

#### II.10.4. Analyse des données de l'étude de l'impact des variations alléliques des GSTe2 sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique

- **La fréquence génotypique** a été calculée en faisant le rapport du nombre d'individus présentant le génotype concerné (susceptible : **SS**, résistant : **RR** et hétérozygote : **RS**) sur le nombre total d'*An. funestus* s.s. testé. Elle est exprimée en pourcentage.
- **La fréquence allélique** a été calculée en utilisant la formule :

$$\text{Fréquence allélique} = \frac{2(X) + 1(Y)}{2N}$$

Où X est le nombre d'individus de génotype homozygote pour l'allèle concerné, Y le nombre d'individus hétérozygotes et N le nombre total d'individus examinés.

Les fréquences génotypiques et alléliques ont été comparées à l'aide des tests de  $\chi^2$  et z respectivement, au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

La *distribution des génotypes indépendants et combinés* au sein des sous-populations d'*An. funestus* s.s. résistantes et celles des sensibles à l'exposition aux insecticides et aux MILDA a été évaluée à l'aide du test de  $\chi^2$ . En outre le degré d'association entre la présence de la mutation L119F-GSTE2 et la capacité des moustiques à survivre en présence des insecticides a été estimé par le calcul du rapport de cote entre les résistants et les sensibles. Le test exact de Fisher a été utilisé pour évaluer le seuil de signification.

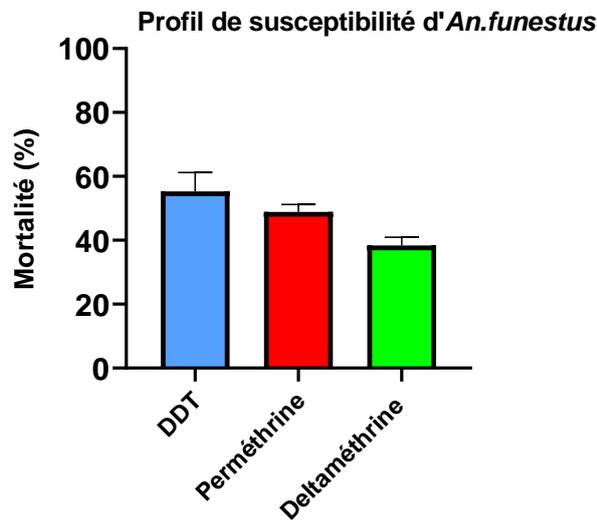
## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III. 1. Profil d'expression des GSTes chez *Anopheles funestus* dans quelques pays d'Afrique et potentiels marqueurs de résistance

#### III.1.1. Résultats partiels 1

##### III.1.1.1. Profil de susceptibilité d'*An. funestus* au Cameroun vis-à-vis des pyréthriinoïdes et du DDT

Des taux de mortalité inférieurs à 90 % ont été obtenus pour tous les insecticides testés, montrant que l'échantillon d'*An. funestus* de Mibellon a déjà développé la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes de types I et II. De même, il ressort de cette étude que l'échantillon d'*An. funestus* de Mibellon est plus résistant à la deltaméthrine ( $38,34 \pm 2,52$  %) par rapport au DDT ( $55,28 \pm 5,95$  %) et à la perméthrine ( $48,88 \pm 2,31$  %) (Figure 35).



**Figure 35** : Profil de susceptibilité d'*An. funestus* au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine.

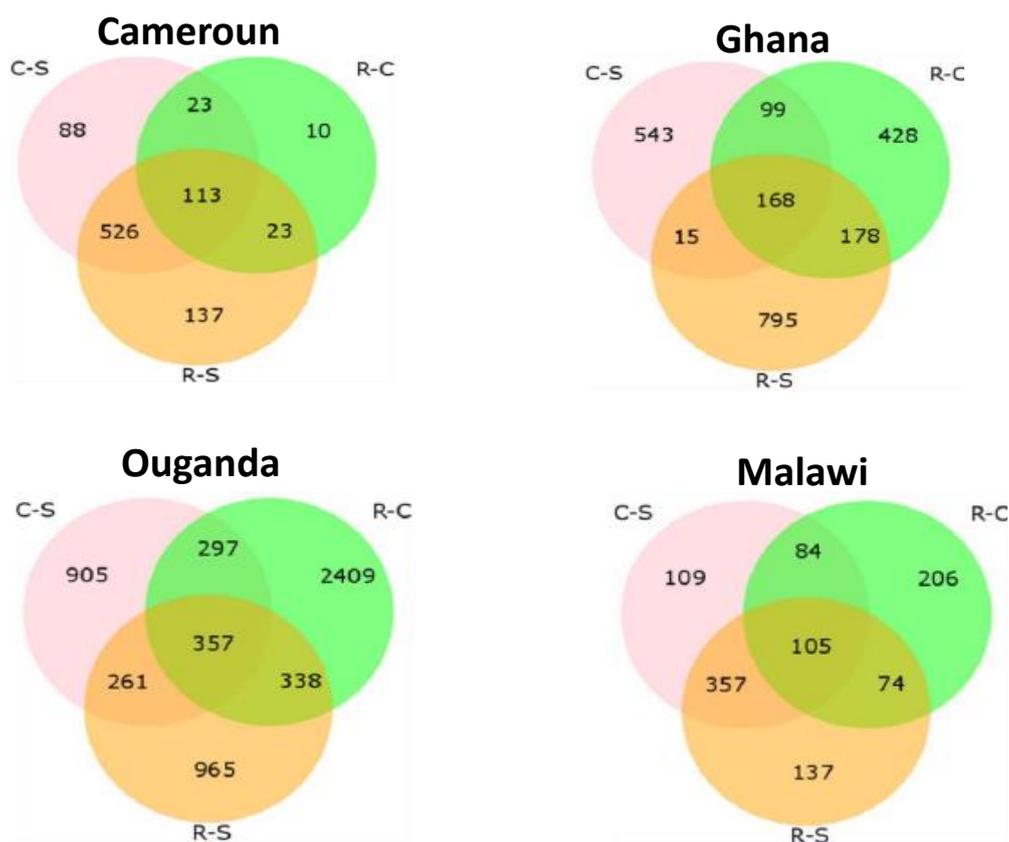
(Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type ; DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane)

##### III.1.1.2. Profil transcriptomique comparatif de la résistance au DDT et d'expression des GSTes chez *An. funestus*

###### III.1.1.2.1. Profil transcriptomique comparatif de la résistance au DDT en utilisant la méthode de séquençage de l'ARN (RNAseq)

Le séquençage des ARN des moustiques résistants au DDT (R), non-exposés (C) et des moustiques de la souche sensible de laboratoire FANG (S) a permis d'évaluer les gènes dont l'expression est associée à la résistance au DDT à travers le continent africain plus

particulièrement dans la région australe (Malawi), à l'est (Ouganda), à l'ouest (Ghana) et en Afrique centrale (Cameroun). La priorité a d'abord été donnée aux gènes surexprimés dans les comparaisons des moustiques résistants au DDT (R) et les moustiques témoins (C, moustiques non exposés) car cette comparaison permet de ressortir les gènes dont l'expression est induite par l'exposition des moustiques au DDT et ayant le même background génétique. Une attention a également été accordée aux gènes qui étaient surexprimés communément dans la comparaison entre les moustiques résistants (R) et les moustiques sensibles de laboratoire FANG (S) et la comparaison entre moustiques contrôle (C) et des moustiques sensibles (S) car ce sont ces gènes qui sont exprimés constitutivement dans les populations naturelles de moustiques. Le nombre de gènes différentiellement exprimés dans chacune des quatre populations et la souche sensible FANG ont été consignés dans Figure 36. Les données brutes de la séquence de l'ARN ont été archivées et peuvent être consultées en suivant le lien suivant : <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB24351>.



**Figure 36 :** Diagramme de Venn qui ressort le nombre de gènes significativement ( $P < 0,05$ ) surexprimés dans chaque population (R-C (résistant vs contrôle) : gènes dont l'expression est induite suite à l'exposition au DDT ; C-S (contrôle vs sensible) : gènes dont l'expression est constitutive dans la population ; R-S (résistant vs sensible) : gènes dont l'expression est induite suite à l'exposition au DDT et ceux naturellement surexprimés dans la population de l'étude).

### III. 1.1.2.1.1. Gènes différemment exprimés chez l'échantillon d'*An. funestus* au Cameroun

Les principales familles de gènes de détoxification dont la surexpression est liée à la résistance au DDT au Cameroun sont constituées des cytochromes P450, les glutathion s-transférases et les carboxylestérases. En comparant les moustiques résistants, non-exposés et sensibles, il a été constaté que le cytochrome P450 *CYP325A* était le plus surexprimé, suivi du *CYP6P9b*, *CYP6P5* et *CYP315A1*. Pour les GSTs, les gènes de la famille epsilon et delta sont globalement surexprimés en comparant les moustiques résistants (R-S) ou non exposés à la souche sensible (C-S). Les GSTes les plus surexprimés étaient *GSTe2*, *GSTe1*, *GSTe3* et *GSTe6*. Plusieurs autres familles de gènes exhibent aussi des gènes surexprimés incluant des carboxylestérases (*COEunkn* (AFUN002514) et *COEBE3C* (AFUN016311)), glutathion peroxydase (AFUN022201), transporteur de cassette de liaison à l'ATP (AFUN019220), UDP-glucuronosyltransférase (AFUN011266) et de la sulfotransférase (AFUN016207) (*SULT1B*) (Tableau VIII).

**Tableau VIII** : Gènes de détoxification surexprimés au Cameroun chez *An. funestus* entre les différentes comparaisons

ID des Gènes	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN002514	2,8934693		3,4858232	Carboxylesterase, COEunkn
AFUN019220		3,755253	4,1573305	Transporteur ABC, famille A
AFUN015966		15,648611	19,80706	Cytochrome P450, CYP325A
AFUN015889		2,4889274	3,1110048	Cytochrome P450, CYP6P9b
AFUN015888		5,4777937	8,212809	Cytochrome P450, CYP6P5
AFUN005715		2,3714201	2,252707	Cytochrome P450, CYP315A1
AFUN011266		2,67154	2,5182736	UDP-glucuronosyltransferase 3A1
AFUN022201		10,439024	9,539281	Glutathion peroxydase
AFUN015807		2,3210542	2,5459306	Glutathion s-transférase, GSTe1
AFUN015808		2,4095497	2,4903498	Glutathion s-transférase, GSTe3
AFUN015839		2,004527	2,098784	Glutathion s-transférase, GSTD3
AFUN016008		3,0603988	3,182327	Glutathion s-transférase, GSTe6
AFUN007291		2,4175029	2,2559748	Glutathion s-transférase, GSTT2
AFUN015809		3,4979115	4,4708834	Glutathion s-transférase, GSTe2

AFUN016207	2,297438	2,2629843	Sulfotransférase cytosolique 1B
AFUN008941	2,1940587		Transporteur ABC, famille C
AFUN016311	2,155015		Carboxylesterase, COEBE3C
AFUN002978	2,058842		Cytochrome P450, CYP314A1
AFUN001383	1,6504059		Cytochrome P450, CYP9J5
AFUN002602		2,0370903	Cytochrome b-561
AFUN006858		2,3245227	Cytochrome P450, CYP306A1

P < 0,05 et facteur de changement (FC) > 1,5 (R-C°) et FC > 2 (C-S et R-S).

### III.1.1.2.1.2. Gènes différemment exprimés chez l'échantillon d'*An. funestus* du Ghana

Plusieurs cytochromes P450s ont été surexprimés au Ghana en comparant le profil d'expression entre les moustiques résistants, contrôles et sensibles. Les plus prédominants étaient : *CYP6P4a* (AFUN020895), *CYP325B/C*, *CYP4H26*, *CYP6M4*, *CYP4C36*, *CYP9K1*, *CYP9J5*, *CYP6P9b*, *CYP6P9a*, *CYP6P5* et *CYP4H17* (Tableau IX). Chez *An. funestus* du Ghana les glutathion s-transférases epsilon *GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5*, *GSTE6* et *GSTe7* se sont avérés être surexprimés chez les moustiques contrôles et DDT-résistants. Il a été également observé une surexpression de la sulfotransférase *SULT1*, de la protéine salivaire *D7* (AFUN016458), de l'UDP-glucuronosyltransférase (AFUN011266), de la carboxylestérase (AFUN016367) et du transporteur à ATP (AFUN019220).

**Tableau IX** : Gènes de détoxification surexprimés au Ghana chez *An. funestus* entre les différentes comparaisons

ID des gènes	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN015830	1,5176085	2,6203227	3,976624	Cytochrome P450, CYP325C
AFUN015894	1,7204243	4,830863	8,311134	Cytochrome P450, CYP4H26
AFUN019348	2,2147367	5,578066	12,353948	Cytochrome P450, CYP325B
AFUN015767	1,5001847	2,0304153	3,0459979	Glutathion s-transférase, GSTD11
AFUN019220		3,5253153	3,8225787	Transporteur ABC, famille A
AFUN002796		2,9251132	2,0283942	Transporteur ABC
AFUN016367		2,291519	2,4250317	Carboxylesterase, COEJHE4E
AFUN019401		2,4856389	2,5770857	Cytochrome P450, CYP6M4

AFUN004316		4,7323303	7,0621023	Cytochrome P450, CYP4H17
AFUN006135		2,4041867	2,1305745	Cytochrome P450, CYP4C36
AFUN007549		2,8564737	2,3530338	Cytochrome P450, CYP9K1
AFUN020895		41,131523	30,434338	Cytochrome P450, CYP6P4a
AFUN019365		17,181461	13,95981	Cytochrome P450, CYP6P4b
AFUN001383		3,2154377	3,093064	Cytochrome P450, CYP9J5
AFUN015792		3,5820096	5,169663	Cytochrome P450, CYP6P9a
AFUN015889		6,209893	6,1071906	Cytochrome P450, CYP6P9b
AFUN015888		7,485999	6,140407	Cytochrome P450, CYP6P5
AFUN006858		2,186648	2,5465918	Cytochrome P450, CYP306A1
AFUN015795		2,3312643	2,0709553	Cytochrome P450, CYP6M3
AFUN005715		2,0942264	2,0190682	Cytochrome P450, CYP315A1
AFUN019567		6,2830515	6,3453665	Cytochrome P450, CYP4H18
AFUN016456		2,2823555	2,137907	Protéine salivaire D7
AFUN011266		2,815869	3,8286955	UDP-glucuronosyltransférase 3A1
AFUN015807		3,92929	4,207333	Glutathion s-transférase, GSTe1
AFUN015808		2,9914625	2,6008918	Glutathion s-transférase, GSTe3
AFUN015810		3,4769716	2,789998	Glutathion s-transférase, GSTe4
AFUN015811		2,9477298	2,0025258	Glutathion s-transférase, GSTe5
AFUN015839		4,0754375	3,4843476	Glutathion s-transférase, GSTD3
AFUN015840		3,6762526	4,7960463	Glutathion s-transférase, GSTD10
AFUN016008		3,3691344	3,113351	Glutathion s-transférase, GSTe6
AFUN001774		2,3985367	2,0373375	Glutathion s-transférase, GSTe7
AFUN015809		9,269093	7,5253835	Glutathion s-transférase, GSTe2
AFUN008239		2,6680195	2,1065671	Sulfotransférase
AFUN016207		2,6827705	2,3955698	Sulfotransférase
AFUN010696	2,5507598		3,926304	Cytochrome b5
AFUN015963	1,5521032		2,153224	Cytochrome P450, CYP6R1
AFUN016458	2,4133177		3,0593035	Protéine salivaire D7
AFUN008338	2,4747007		3,1143987	Sulfotransférase 1C4

AFUN008852	2,1302986	Glycosyltransférase
AFUN008941	2,0767095	Transporteur ABC, famille C
AFUN021098	2,351223	Cytochrome P450, CYP4H19
AFUN015909	2,0092266	Cytochrome P450, CYP305A3
AFUN015776	2,0201716	Cytochrome P450, CYP12F1
AFUN001382	2,1402965	Cytochrome P450, CYP9J5
AFUN019845	2,144599	Glucosyl/glucuronosyl transférases
AFUN016010	2,0161536	Glutathion s-transférase, GSTD1
AFUN008819	2,0289357	Glutathion s-transférase, GSTMS3
AFUN008941	2,0767095	Transporteur ABC, famille C
AFUN021098	2,351223	Cytochrome P450, CYP4H19
AFUN015909	2,0092266	Cytochrome P450, CYP305A3
AFUN015776	2,0201716	Cytochrome P450, CYP12F1
AFUN001382	2,1402965	Cytochrome P450, CYP9J5
AFUN019845	2,144599	UDP-glucuronosyltransférase 2C1
AFUN016010	2,0161536	Glutathion s-transférase, GSTD1
AFUN008819	2,0289357	Glutathion s-transférase, GSTMS3

P < 0,05 et facteur de changement (FC) > 1,5 (R-C°) et FC > 2 (C-S et R-S).

### III.1.1.2.1.3. Gènes différemment exprimés chez l'échantillon d'*An. funestus* du Malawi

Les cytochromes P450 *6P9a* et *6P9b* ont été les gènes les plus surexprimés au Malawi en comparant le niveau d'expression des gènes chez les moustiques résistants et ceux sensibles (Tableau X). A côté de ces deux gènes, nous avons également noté la surexpression de plusieurs autres cytochromes P450 tels que les *CYP325J1*, *CYP6M4*, *CYP6P2*, *CYP9K1*, *CYP314A1*, *CYP6N1* et le cytochrome b5. Concernant les GSTs, le niveau d'expression a été plus élevé pour la famille des GSTs delta (*GsTdl* et *GSTdII*) suivie de la classe epsilon avec notamment *GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe5* et *GSTe6*. Nous avons également remarqué la surexpression modérée de GST thêta (*GSTtI*) chez les moustiques résistants. Tout comme en Afrique centrale et de l'ouest, il a été observé une surexpression de la carboxylestérase (AFUN016265), de la sulfotransférase (AFUN016207) et du transporteur d'ATP (AFUN019220).

**Tableau X** : Gènes de détoxification surexprimés au Malawi chez *An. funestus* entre les différentes comparaisons

<b>ID des gènes</b>	<b>R-C</b>	<b>C-S</b>	<b>R-S</b>	<b>Description</b>
AFUN019523	1,507577	4,439413	6,692756	Cytochrome P450, CYP325J1
AFUN015889	2,5220747	16,651278	41,99576	Cytochrome P450, CYP6P9b
AFUN019220		3,1381407	2,659554	Transporteur ABC, famille A
AFUN016265		3,7209604	4,703569	Carboxylester hydrolase
AFUN019401		2,8624895	2,7167373	Cytochrome P450, CYP6M4
AFUN015801		2,299937	2,2996929	Cytochrome P450, CYP6P2
AFUN020895		6,031834	6,101497	Cytochrome P450, CYP6P4
AFUN015792		53,420876	49,825886	Cytochrome P450, CYP6P9a
AFUN002978		2,048785	2,5891387	Cytochrome P450, CYP314A1
AFUN010918		2,2058907	2,3527682	Cytochrome P450, CYP6N1
AFUN011266		2,2034643	3,0369558	UDP-glucuronosyltransférase 3A1
AFUN015839		5,0719476	3,63867	Glutathion s-transférase, GSTD3
AFUN016008		2,8427892	3,0745156	Glutathion s-transférase, GSTE6
AFUN016207		2,7247274	2,1642609	Sulfotransférase
AFUN015907		2,2404246		Cytochrome P450, CYP305A3
AFUN015785		2,1118221		Cytochrome P450, CYP6AA2
AFUN015807		2,5705426		Glutathion S-transférase, GSTe1
AFUN004322			2,2281806	Cytochrome b5
AFUN006135			2,3192496	Cytochrome P450, CYP4C36
AFUN007549			2,2119997	Cytochrome P450, CYP9K1
AFUN016010			2,1173494	Glutathion s-transférase, GSTD1
AFUN015767			2,0815623	Glutathion s-transférase, GSTD11
AFUN015811			2,2649431	Glutathion s-transférase, GSTe5
AFUN015809			2,1379018	Glutathion s-transférase, GSTe2
AFUN007291			2,0031114	Glutathion s-transférase, GSTT2
AFUN008239			2,3338351	Sulfotransférase
AFUN016367	1,8275834			Carboxylesterase, COEJHE4E
AFUN016209	1,5197136			Sulfotransférase

P < 0,05 et facteur de changement (FC) > 1,5 (R-C) et FC > 2 (C-S et R-S).

#### III.1.1.2.1.4. Gènes différemment exprimés chez l'échantillon d'*An. funestus* d'Ouganda

En Ouganda, les cytochromes P450s *CYP4C26*, *CYP6P5*, *CYP6P4a*, *CYP306A1*, *CYP305A3* et *CYP315A1* sont les plus surexprimés chez les moustiques résistants aux DDT. Certains gènes de la famille des GSTs sont significativement plus exprimés en comparant le niveau d'expression entre les résistants et les contrôles à savoir *GSTD1*, *GSTD3* et *GSTe6*. Cependant, il a été observé que le niveau d'expression des GSTs epsilon est plus bas en Ouganda comparé aux Cameroun et au Ghana. De même, plusieurs autres familles de gènes ont également été surexprimées au Ghana à savoir : les carboxylesterases, les sulfotransférases, le NADHP, et les transporteurs d'ATP (Tableau XI).

**Tableau XI** : Gènes de détoxification surexprimés chez *An. funestus* en Ouganda entre les différentes comparaisons

ID des gènes	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN019220		2,9239964	2,9306972	Transporteur ABC, famille A
AFUN000421		2,0856595	2,4146874	Carboxylesterase, COEBE4C
AFUN015777		3,8722458	3,1892729	Cytochrome P450, CYP4C26
AFUN015888		3,0184207	3,1936443	Cytochrome P450, CYP6P5
AFUN015839		2,9561374	2,1264198	Glutathion s-transférase, GSTD3
AFUN016008		3,5037928	2,787403	Glutathion s-transférase, GSTe6
AFUN016207		2,6702209	2,6851285	Sulfotransférase
AFUN002796		2,711219		Transporteur ABC, famille G
AFUN019365		2,3760457		Cytochrome P450, CYP6P4
AFUN006858		2,0747128		Cytochrome P450, CYP306A1
AFUN011518		2,2290916		Cytochrome c oxydase
AFUN015735	2,302202			Cytochrome P450, CYP49A1
AFUN007537	1,6417327			Transporteur ABC, ABCF3
AFUN019517	1,9148197			Cytochrome P450, CYP325J1
AFUN019708	1,8381125			Sulfotransférase 2
AFUN019950	1,8083609			Carboxylesterase, COE2580
AFUN020232	1,5087312			Metalloproteinase
AFUN020202	1,7750088			NADPH oxydase 5
AFUN015907			2,350208	Cytochrome P450, CYP305A3
AFUN005715			2,1279395	Cytochrome P450, CYP315A1
AFUN016010			2,034498	Glutathion s-transférase, GSTD1

P < 0,05 et facteur de changement (FC) > 1,5 (R-C) et FC > 2 (C-S et R-S).

De manière générale, l'étude du niveau d'expression des gènes associés à la résistance au DDT dans quatre pays d'Afrique en comparant les moustiques résistants, aux moustiques sensibles et non exposés a révélé que la famille epsilon des GSTs est surexprimée dans le

continent. De plus, il a été observé que le niveau d'expression des GSTs varie à travers le continent et trois classes sont majoritairement exprimées à savoir les GSTs epsilon, delta et thêta. Pour ce qui est du niveau d'expression des GSTes à travers l'Afrique il a été observé qu'à l'exception de GSTe8, tous les autres 7 gènes du cluster de GST epsilon d'*An. funestus* sont surexprimés chez les moustiques résistants au DDT.

#### **III.1.1.2.1.5. Gènes différemment exprimés à travers l'Afrique en comparant les moustiques résistants au DDT vs perméthrine**

Dans le but d'avoir les gènes dont le niveau d'expression est lié à la résistance croisée entre le DDT et la perméthrine, nous avons fait une analyse comparative du niveau d'expression des gènes entre les moustiques résistants au DDT et ceux résistants à la perméthrine pour chaque localité de l'étude. De cette investigation, il ressort que :

##### **Au Cameroun**

Le cytochrome P450 *CYP325A* (FC : 1,56) est le gène de détoxication le plus surexprimé chez les moustiques résistants à la perméthrine comparé au DDT. Il a également été noté la surexpression des sous-unités ribosomales (AFUN017765) (FC : 24), de la phospholipase A2 (AFUN022209) (FC : 1,7), et de la protéine salivaire D7(AFUN016457) (FC : 1,6) (Annexe 3a).

##### **Au Ghana**

De cette analyse, il ressort qu'aucun gène de détoxication de la famille des cytochromes P450, des glutathion s-transférases et des carboxylestérases n'a été significativement surexprimé lors de la comparaison du niveau d'expression chez les moustiques résistants au DDT et ceux résistants à la perméthrine. Cependant, certains gènes n'ayant pas un rôle de détoxication ont été surexprimés à savoir : les protéines lymphatiques P27K(AFUN021325) (FC 1,5), les protéines HSP90 (AFUN019847) (FC : 1,62) et les facteurs d'initiation de la transcription (AFUN019720) TAF13 (FC 1,56). En outre, le cytochrome *CYP4H19* a été régulé à la baisse lors de la résistance au DDT. Les gènes dont l'expression est significativement différente entre les moustiques résistants à la perméthrine et ceux au DDT au Ghana sont consignés à l'annexe 3b.

##### **En Ouganda**

Les moustiques résistants à la perméthrine ont exhibé une surexpression de carboxylestérases (AFUN016265) (FC 1,77), des protéinases à serine (AFUN016153) (FC

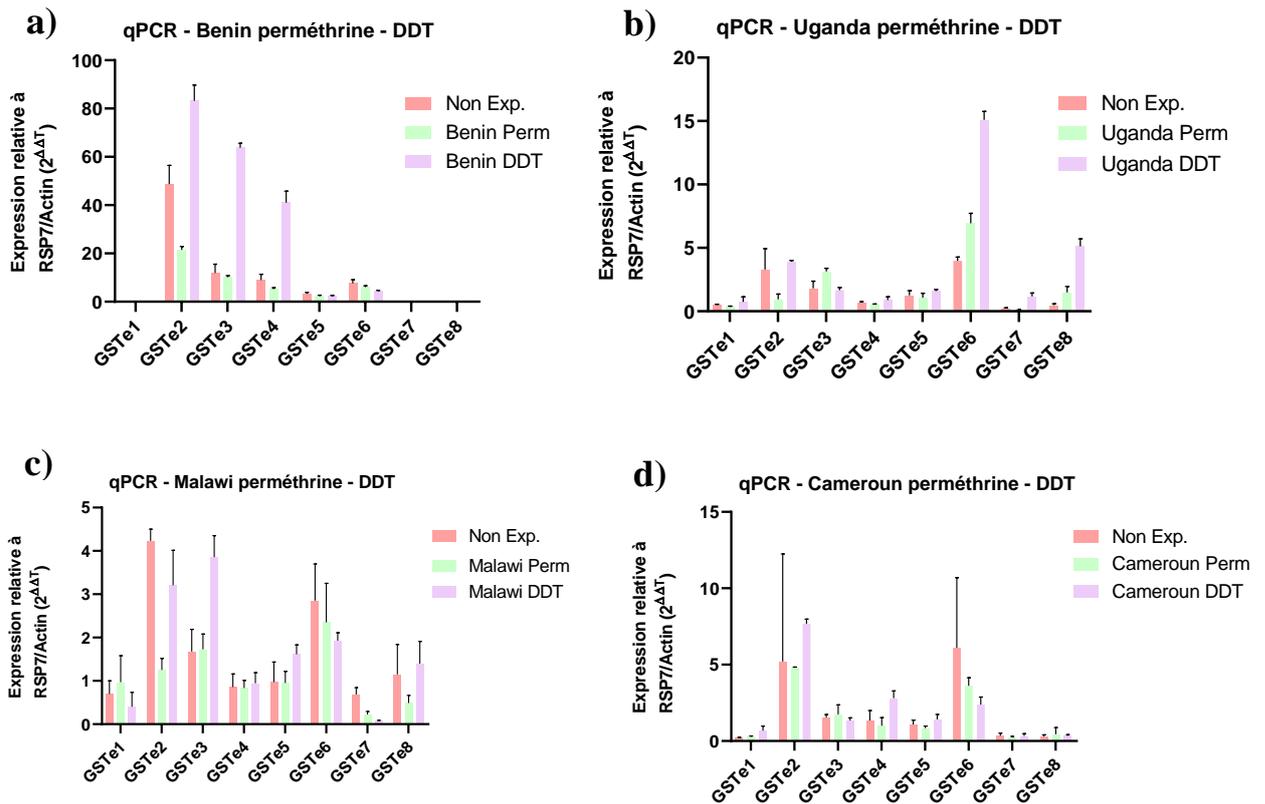
2,87) et des sous-unités ribosomales AFUN017404 et AFUN017328 (avec des FC 47,04 et 3,20). Par contre les moustiques résistants au DDT lorsque comparés aux moustiques résistants à la perméthrine, ont présenté une plus grande expression des gènes de détoxification tel que : les cytochromes P450 (*CYP325J1*, *CYP325Z1*, *CYP6Z4*), l'UDP-glucuronosyltransférase (AFUN000679) (FC-1,75) et les protéines du choc thermique B2 (AFUN019513) (FC : 4,58) (Annexe 3c).

#### **Au Malawi**

En comparant le niveau d'expression des gènes chez les moustiques DDT-résistants vs perméthrine-résistants chez les populations d'*An. funestus* au Malawi (Annexe 3d), il a été observé une surexpression des gènes de détoxifications tel que *CYP6P9b* (FC: 1,9), *GSTU3* (FC: 1,67), glutathion peroxydase (AFUN022201) (FC: 1,8) et les protéinases en serine (AFUN022250) (FC: 5,9). Par contre les moustiques résistants au DDT lorsque comparés à ceux résistants à la perméthrine, ont présentés une plus grande expression des gènes tels que carboxylestérases *COEBE2C* (AFUN016052) (FC-3,21), *CYP4H25* (FC-1,74), *GSTD11* (FC-1,80) et *GSTU2* (FC-1,64).

#### **III.1.1.2.2. Profil d'expression des GSTs epsilons dans quatre pays d'Afrique**

La validation du profil d'expression du cluster des GSTes à travers le continent africain a été réalisée par PCR en temps réel, en comparant le niveau d'expression des GSTes entre les moustiques sensibles (FANG), les moustiques non exposés (contrôle), les moustiques résistants à la perméthrine et ceux résistants au DDT après 24 h d'exposition. Au Bénin, le niveau d'expression de *GSTe2*, *GSTe3* et *GSTe4* était significativement plus élevé chez les moustiques résistants au DDT par rapport au groupe non exposés et aux moustiques résistants à la perméthrine (Figure 37). En Ouganda, toutes les GSTes ont été exprimées, mais à un niveau comparativement identique, le plus surexprimé étant *GSTe6*, suivi de *GSTe8*. Comme observé avec les échantillons du Bénin, ces deux gènes étaient davantage exprimés chez les moustiques ayant survécu à l'exposition au DDT. Au Malawi, il a été observé par ordre croissant que les GSTes les plus exprimées étaient *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe6*, *GSTe5* et *GSTe8*. Cependant, à l'exception du gène *GSTe6*, qui a été plus surexprimé chez les moustiques résistants à la perméthrine, le niveau d'expression des autres GSTes était plus élevé chez les moustiques résistants au DDT. Pour le Cameroun, *GSTe2*, *GSTe4* et *GSTe3* étaient plus surexprimées chez les femelles DDT-résistantes. Dans l'ensemble, ces résultats ont montré que les GST sont plus surexprimées chez les moustiques résistants au DDT par rapport aux moustiques résistants à la perméthrine et aux moustiques non exposés.



**Figure 37** : Profil d'expression des GSTes.

a) Au Benin ; b) En Ouganda ; c) Au Malawi ; d) Au Cameroun.

### III.1.1.3. Diversité génétique du cluster des GSTes au Cameroun

#### III.1.1.3.1. Analyse de la diversité de *GSTe1*

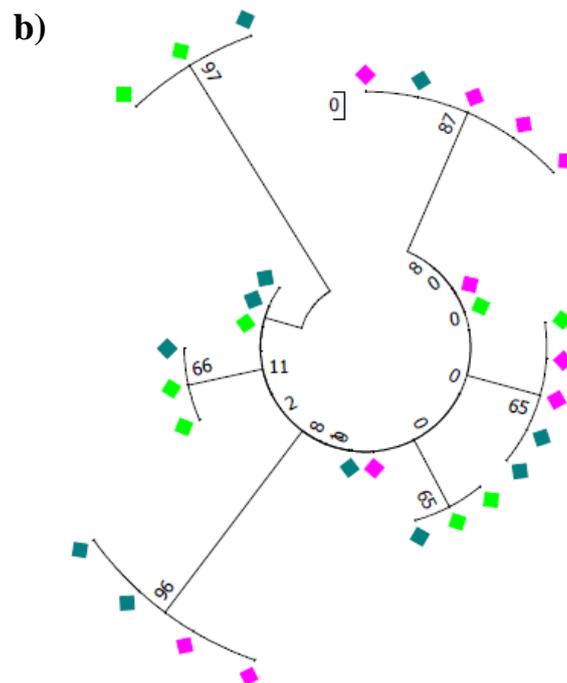
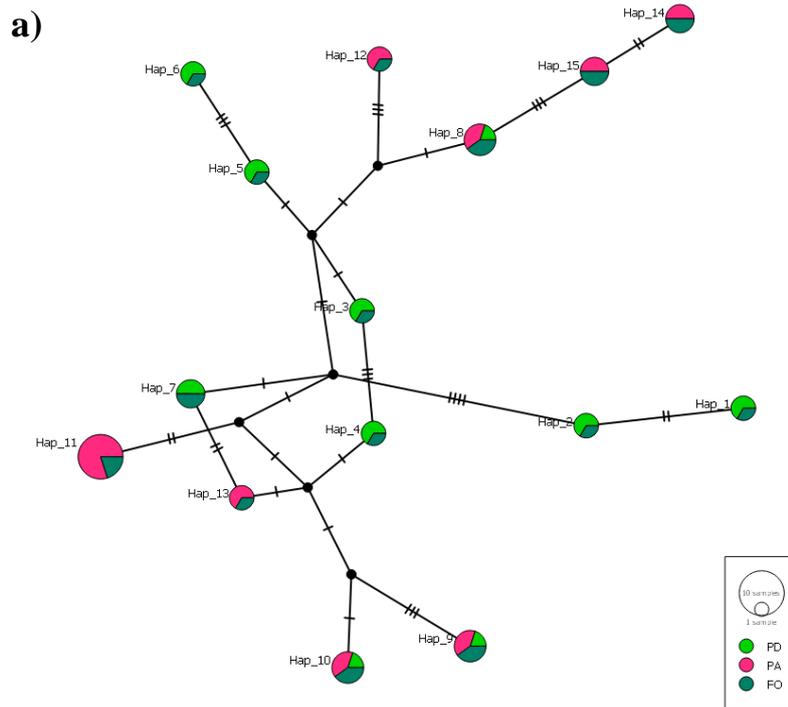
Sur un total de 58 séquences de *GSTe1* analysées provenant de l'ADN des moustiques non exposés de terrain (F0), hyper résistants (PA) et hyper-sensibles à la perméthrine (PD), 17 sites variables ont été obtenues sur une longueur de 800 paires de bases incluant les insertions, les délétions et les changements de nucléotides. L'estimation des indices de diversité haplotypique ( $hd : 0,93$ ) et nucléotidique ( $\pi : 0,008$ ) a révélé une très grande diversité génétique de *GSTe1* chez les groupes de moustiques étudiés au Cameroun. De même, il a été obtenu des valeurs positives pour l'indice D de Tajima et l'indice  $F^*$  de Fu montrant ainsi qu'il n'y a pas de sélection liée à la résistance à la perméthrine pour les mutations enregistrées (Tableau XII). De l'étude de la diversité haplotypique entre les moustiques sensibles et les moustiques résistants, 15 haplotypes ont été formés et aucun allèle n'est spécifique à un seul phénotype étudié. L'haplotype majoritaire Hap\_11 est partagé entre les moustiques hyper-résistants et le contrôle, suivi des haplotypes Hap\_8 et Hap\_9 présents chez les trois phénotypes étudiés montrant ainsi qu'il n'a pas de sélection liée au profil de résistance (Figure 38a). De même, l'arbre phylogénétique montre que les mutations observées sont partagées entre les

populations et il n'existe pas de ségrégation nette entre les séquences des moustiques hyper résistants et les moustiques hypersensibles comparés aux moustiques n'ayant pas été exposés à la perméthrine (Figure 38b).

**Tableau XII** : Diversité génétique de *GSTe1* au Cameroun

<b>GSTe1</b>	<b>N(2n)</b>	<b>S</b>	<b>h (Hd)</b>	<b>Syn</b>	<b>NSyn</b>	<b><math>\pi</math> (k)</b>	<b>D</b>	<b>F*</b>
Non-exposés (F0)	22	20	15 (0,97)	9	10	0,008 (6,4)	- 0,21 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>ns</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	16	16	8 (0,93)	5	7	0,006 (5,2)	0,3 <sup>ns</sup>	1,52 <sup>*</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	20	17	7 (0,81)	7	6	0,07 (5,8)	0,8 <sup>ns</sup>	1,54 <sup>*</sup>
Total	58	25	15 (0,93)	9	10	0,008 (6,1)	0,45 <sup>ns</sup>	1,79 <sup>*</sup>

N : nombre de séquences analysées ; S : nombre de sites polymorphes ; h : nombre d'haplotypes ; hd : diversité haplotypique ; syn : mutation synonyme (non-fonctionnelle), nsyn : mutation synonyme (fonctionnelle) ;  $\pi$  : diversité nucléotidique, D : indice de Tajima ; F\* : indice de Fu.



**Figure 38** : Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de *GSTe1* chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

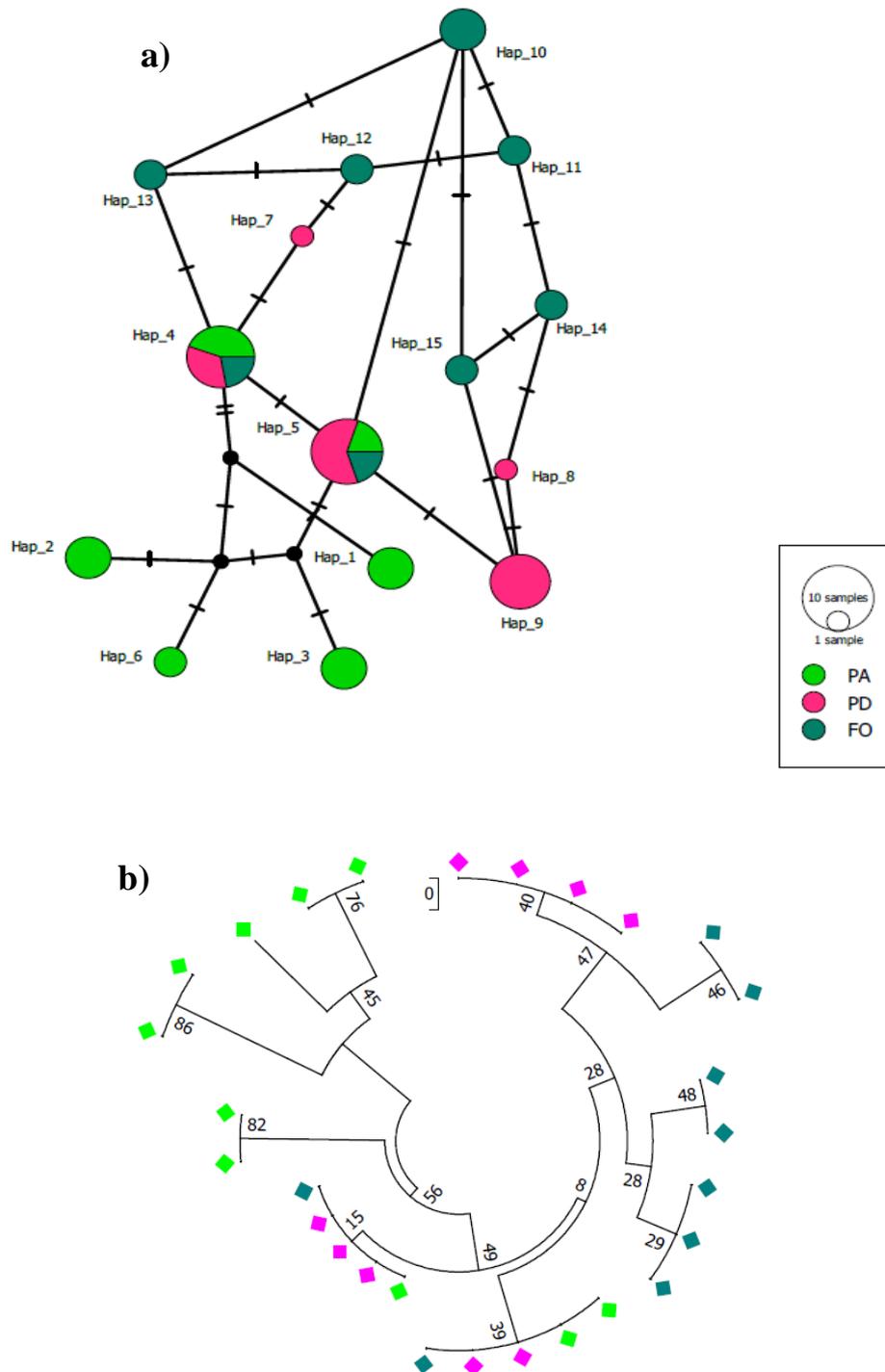
a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe1* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (F0) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper-résistants à la perméthrine (PA)).

### III.1.1.3.2. Analyse de la diversité génétique de *GSTe3*

Dans le but d'étudier la diversité génétique liée à la résistance à la perméthrine pour le gène *GSTe3* chez *An. funestus* de Mibellon, 56 séquences ont été analysées, 9 sites se sont avérés variables et 15 haplotypes ont été identifiés en comparant les moustiques résistants, susceptibles et non exposés (Tableau XIII). Il a été observé une faible diversité génétique pour *GSTe3* avec une diversité nucléotidique de 0,003 montrant ainsi une sélection des allèles mutés pour chaque phénotype étudié. L'étude de la stabilité démographique par l'indice D de Tajima et l'indice F\* de Fu a révélé l'absence d'une expansion démographique des allèles de résistance de *GSTe3* dans la population d'étude. En dépit du fait que les haplotypes majoritaires Hap\_5 et hap\_4 sont partagés dans tous les phénotypes étudiés à des fréquences différentes, il a été observé des haplotypes Hap\_1, Hap\_2, Hap\_3 et Hap\_6 uniquement présents chez les moustiques hyper résistants et absents chez les moustiques hypersensibles et les moustiques contrôle, montrant ainsi que ces derniers pourraient jouer un rôle dans la capacité de ces moustiques résistants à survivre à la perméthrine (Figure 39a). Cependant, les haplotypes de *GSTe3* des moustiques hypersensibles se rapprochent plus de ceux des moustiques non-exposés. De même, les haplotypes Hap\_7 et Hap-8, sont présents uniquement chez les *GSTe3* des moustiques sensibles tout comme les haplotypes Hap\_10, Hap\_11, Hap-12, Hap\_13, Hap\_14 et Hap\_15 appartiennent qu'aux moustiques non-exposés. L'arbre phylogénétique de vraisemblance maximale montre qu'il existe une séparation nette entre certains allèles de *GSTe3* des moustiques hyper résistants comparés à ceux des moustiques sensibles qui sont plus proches de ceux des moustiques non exposés (Figure 39b). De ces observations, il ressort que les haplotypes Hap\_1, Hap\_2, Hap\_3 et Hap\_6 seraient sélectionnés lors de l'exposition des moustiques à la perméthrine.

**Tableau XIII** : Diversité génétique de *GSTe3* au Cameroun

<b>GSTe3</b>	N(2n)	S	h (Hd)	Syn	NSyn	$\pi$ (k)	D	F*
Non-exposé (F0)	18	4	8 (0,91)	7	5	0,002 (1,6)	1,31 <sup>ns</sup>	1,12 <sup>ns</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	18	3	5 (0,45)	8	4	0,001 (1,1)	0,71 <sup>ns</sup>	1,02 <sup>ns</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	20	6	7 (0,81)	11	5	0,004 (2,7)	2,01 <sup>*</sup>	1,24 <sup>ns</sup>
Total	56	9	15 (0,91)	15	10	0,003 (2,6)	0,87 <sup>ns</sup>	1,34



**Figure 39 :** Diversité génétique de *GSTe3* liés au profil de résistance chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

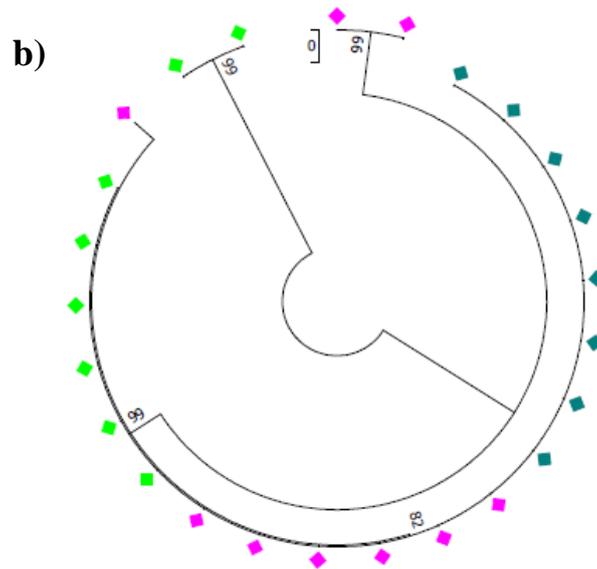
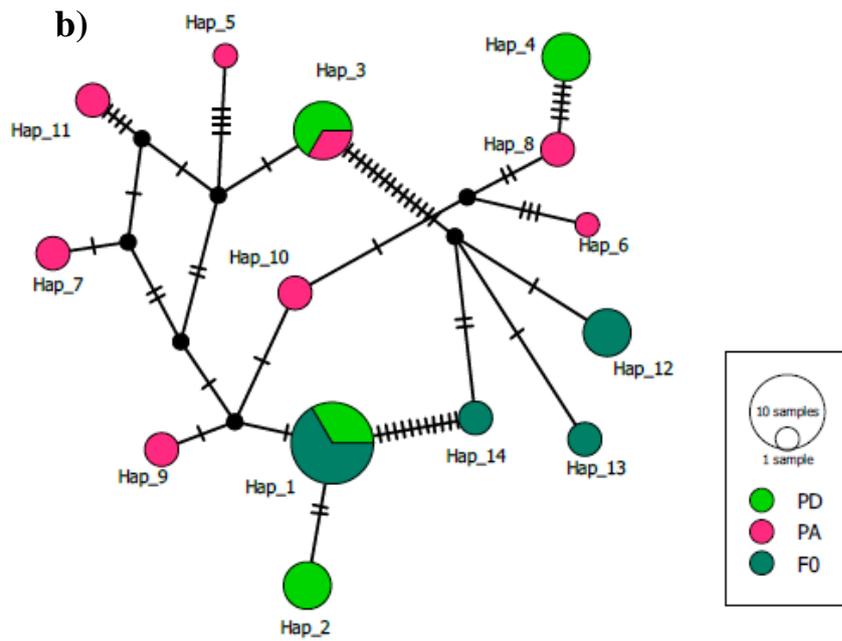
a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe3* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (FO) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

### III.1.1.3.3. Analyse de la diversité de *GSTe4*

Sur les 46 séquences analysées, 25 sites polymorphiques ont été observés et 14 haplotypes ont été identifiés pour *GSTe4* repartis comme le montre le tableau XIV ci-contre. Une faible diversité nucléotidique a été observée montrant ainsi que les mutations observées sont fixes dans les différents groupes de moustiques testés. Un total de 13 mutations non-synonymes pouvant conduire à une variation d'acide aminé sur la séquence de *GSTe4* et par conséquent une altération de sa fonction a été identifié ainsi que 9 mutations non-fonctionnelles. Cependant, les valeurs positives de  $F^*$  obtenues indiquent un excès de mutation à fréquence intermédiaire. Toutefois, toutes les valeurs de  $D$  et de  $F^*$  obtenues étaient en général statistiquement non significatives, ce qui peut supposer que les changements observés dans ce gène peuvent être dus au hasard. L'haplotype majoritaire Hap\_1 est partagé entre les moustiques sensibles (10%) et les moustiques contrôles suivi de l'Hap\_3 qui est partagé entre les susceptibles et les résistants (Figure 40a). Les haplotypes Hap\_5, Hap\_6, Hap\_7, Hap\_8, Hap\_9, Hap\_10 et Hap\_11, sont uniquement présents chez les moustiques hyper résistants montrant que ces derniers sont probablement sélectionnés lors de l'exposition à la perméthrine. Par contre, seuls deux haplotypes sont uniquement présents chez les moustiques sensibles à savoir Hap\_2 et Hap\_4. De même, les haplotypes Hap\_12, Hap\_13 et Hap\_14 sont présents de manière constitutive chez *An. funestus* non exposés. L'analyse de l'arbre phylogénétique (Figure 40b) montre que les séquences de *GSTe4* des moustiques hypersensibles sont plus proches de celles du contrôle comparé aux séquences des moustiques hyper résistants.

**Tableau XIV** : Diversité génétique de *GSTe4* au Cameroun

<b>GSTe4</b>	N(2n)	S	h (Hd)	Syn	NSyn	$\pi$ (k)	D	$F^*$
Non exposé (F0)	16	20	4 (0,70)	5	5	0,014 (10,1)	2,76 <sup>*</sup>	1,56 <sup>*</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	16	15	4 (0,80)	4	8	0,009 (6,4)	1,61 <sup>ns</sup>	1,50 <sup>*</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	14	16	8 (0,93)	8	3	0,008 (5,99)	0,23 <sup>ns</sup>	0,78 <sup>ns</sup>
Total	46	34	14 (0,89)	9	13	0,014 (9,56)	0,68 <sup>ns</sup>	1,40 <sup>ns</sup>



**Figure 40 :** Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de *GSTe4* chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

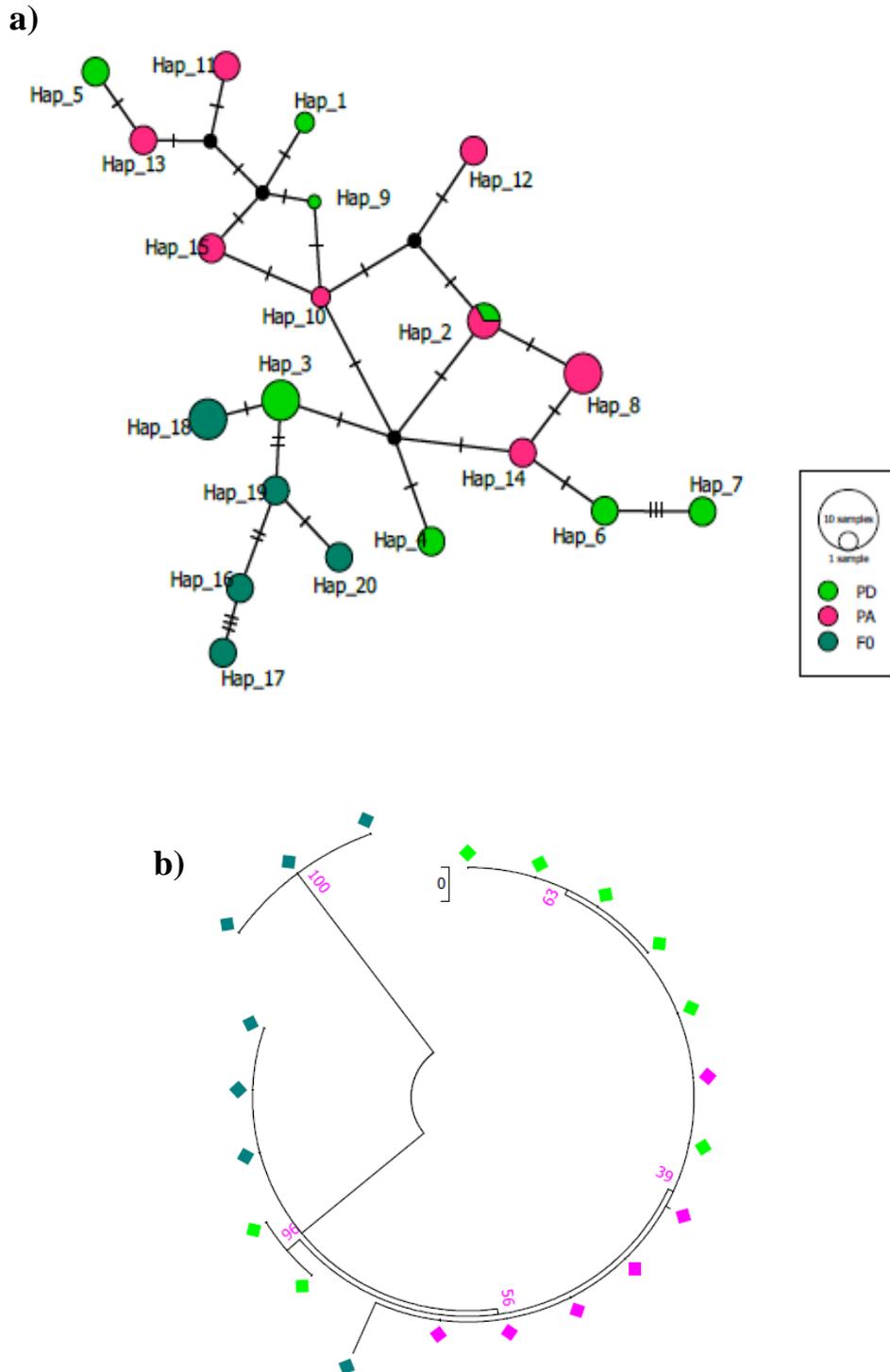
a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe4* par maximum de probabilité avec le modèle de Kimura. (Moustiques non-exposés (F0) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

### III.1.1.3.4. Analyse de la diversité de *GSTe5*

Chez *GSTe5*, il a été enregistré une grande diversité génétique sur les 44 séquences analysées. Un total de 20 haplotypes a été découvert et seul un haplotype Hap\_2 est partagé entre les moustiques résistants et les moustiques susceptibles, le reste étant spécifique à chaque groupe de moustique analysé (Tableau XV ; Figure 41a). Les diversités nucléotidiques et haplotypiques obtenues révèlent que les mutations sont fixes ainsi qu'une contraction des variations dans chaque groupe de séquences. Ces observations montrent une sélection des haplotypes Hap\_8, Hap\_10, Hap\_11, Hap\_12, Hap\_13 et Hap\_15 chez les moustiques résistants à la perméthrine, et des haplotypes Hap\_1, Hap\_3, Hap\_4, Hap\_5, Hap\_6, Hap\_7 et Hap\_9 chez les moustiques sensibles à la perméthrine. De même, il ressort de l'analyse de la vraisemblance maximale entre les moustiques hyper résistants, les moustiques hypersensibles et les moustiques contrôles qu'il existe une distance entre leurs séquences de *GSTe5* (Figure 41b).

**Tableau XV** : Diversité génétique de *GSTe5* au Cameroun

<b>GSTe5</b>	N(2n)	S	h (Hd)	Syn	NSyn	$\pi$ (k)	D	F*
Non exposé (F0)	12	8	5 (0,84)	2	6	0,005 (3,5)	1,30 <sup>ns</sup>	1,38 <sup>*</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	14	11	7 (0,89)	6	3	0,005 (4,4)	0,45 <sup>ns</sup>	1,05 <sup>ns</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	18	7	9 (0,922)	3	4	0,004 (3,1)	1,8 <sup>ns</sup>	1,30 <sup>*</sup>
Total	44	13	20 (0,96)	11	10	0,006 (4,3)	1,09 <sup>ns</sup>	1,53 <sup>ns</sup>



**Figure 41:** Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de *GSTe5* chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe5* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (F0) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

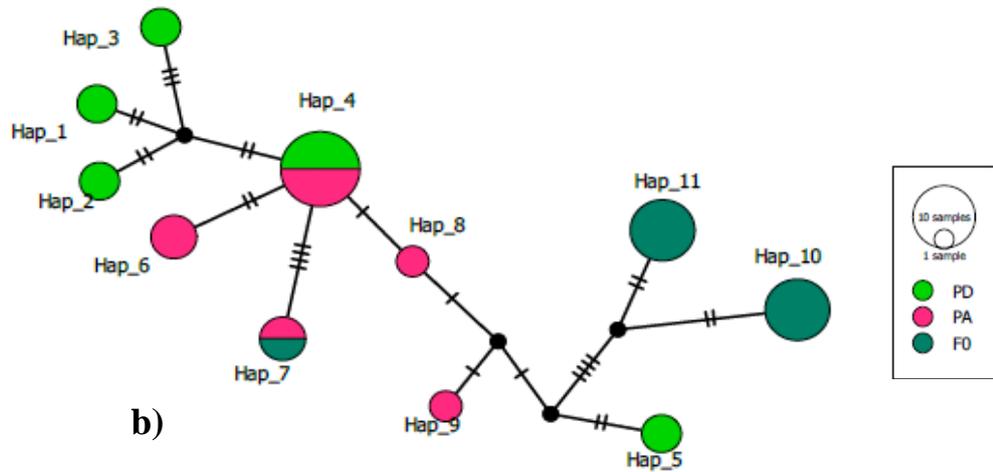
### III.1.1.3.5. Analyse de la diversité de *GSTe6*

Sur les 50 séquences analysées, 25 sites polymorphiques ont été observés et 11 haplotypes ont été identifiés pour *GSTe6* repartis comme le montre le tableau 13 ci-contre. Une faible diversité nucléotidique a été observée montrant ainsi que les mutations observées sont fixes dans les différents groupes de moustiques testés. Un total de 5 mutations non-synonymes pouvant conduire à une variation d'acide aminé sur la séquence des *GSTe6* et par conséquent sa fonction a été identifié ainsi que 9 mutations non-fonctionnelles (Tableau XVI). Une valeur négative de l'indice D de Tajima a été obtenue dans le groupe des moustiques résistants à la perméthrine suggérant une expansion démographique des allèles de résistance du gène *GSTe6* chez *An. funestus* au Cameroun. L'haplotype majoritaire Hap\_4 est partagé entre les moustiques susceptibles et les moustiques résistants, suivi des haplotypes Hap\_10 et Hap\_11 qui sont spécifiques aux moustiques non-exposés (Figure 42a). Les haplotypes Hap\_1, Hap\_2, Hap\_3 et Hap\_5, sont uniquement présents chez les moustiques hyper résistants montrant que ces derniers sont potentiellement sélectionnés par la résistance à la perméthrine. Par ailleurs, les haplotypes Hap\_6, Hap\_8 et Hap\_9 sont spécifiques aux moustiques sensibles. L'analyse de l'arbre phylogénétique (Figure 42b) montre que les séquences de *GSTe6* des moustiques hypersensibles sont plus proches de celles des moustiques hyper résistants. Comparées aux séquences des moustiques contrôle. De ces observations, il ressort que les variations observées sont associées à la résistance à la perméthrine.

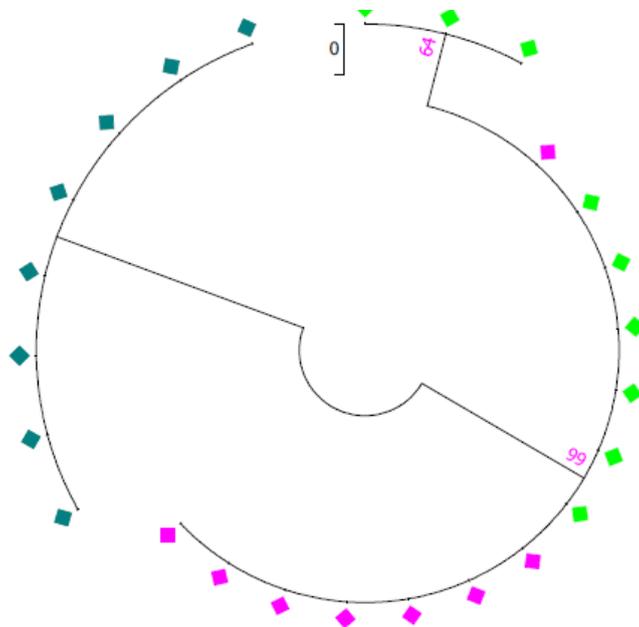
**Tableau XVI** : Diversité génétique de *GSTe6* au Cameroun

<b>GSTe6</b>	N(2n)	S	h (Hd)	Syn	NSyn	$\pi$ (k)	D	F*
Non exposé (F0)	16	4	2 (0,53)	2	1	0,008 (2,13)	2,40 <sup>ns</sup>	1,14 <sup>ns</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	18	12	5 (0,82)	7	4	0,006 (4,47)	1,03 <sup>ns</sup>	1,45*
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	16	9	5 (0,80)	5	3	0,003 (2,60)	-0,15 <sup>ns</sup>	1,38*
Total	50	25	11 (0,88)	9	5	0,009 (6,71)	0,66 <sup>ns</sup>	1,76*

a)



b)



**Figure 42 :** Diversité génétique liés au profil de résistance au sein de *GSTe6* chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe6* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (FO) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

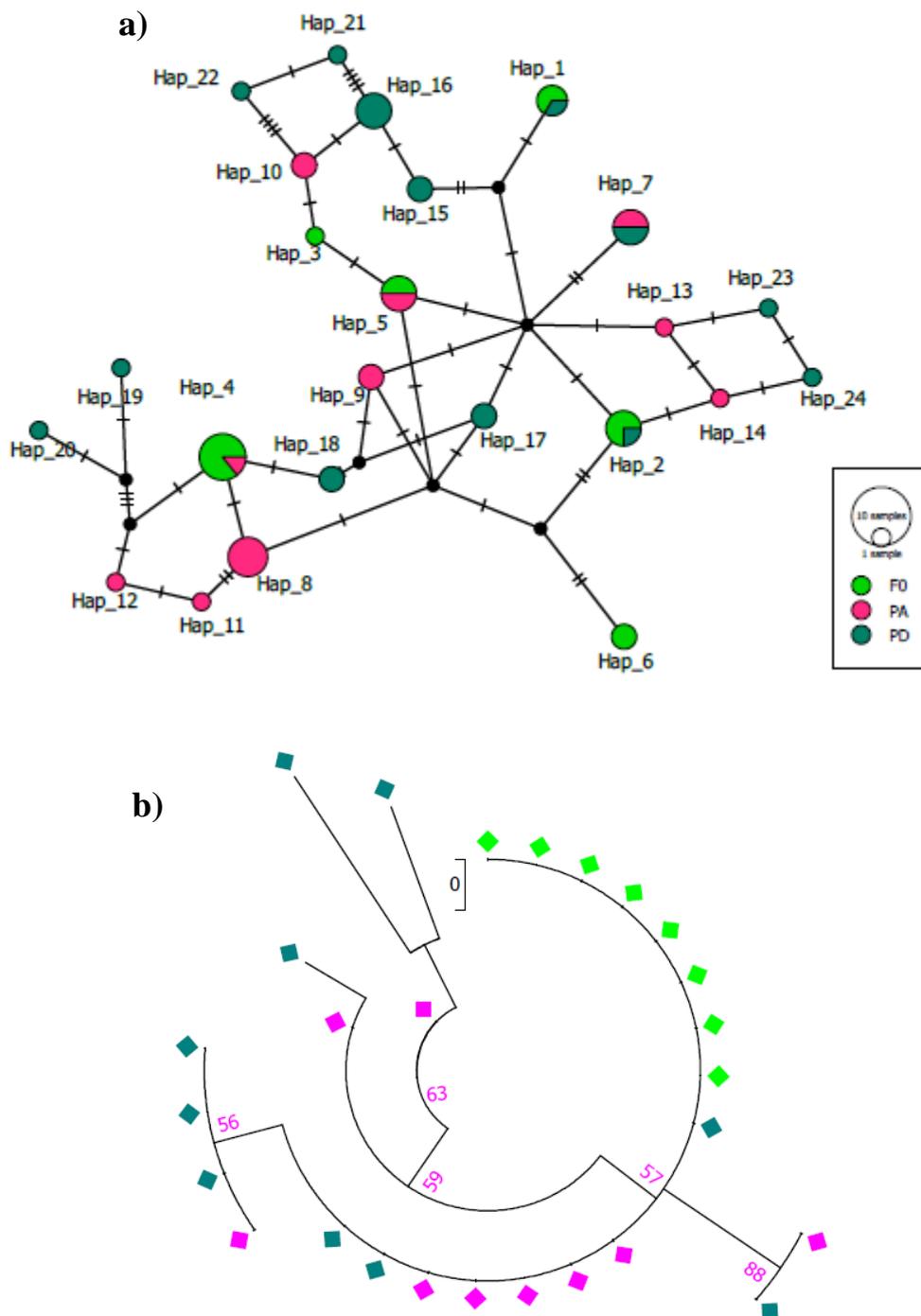
### III.1.1.3.6. Analyse de la diversité de *GSTe7*

Pour étudier la diversité génétique de *GSTe7*, un total de 54 séquences répartis comme indiquer dans le tableau XVII ci-dessous a été analysé. Pour l'analyse totale des séquences des différents groupes testés à savoir les moustiques contrôles, les moustiques résistants et les moustiques sensibles à la perméthrine, une valeur négative du test D de Tajima ( $-0,14^\circ$ ) a été obtenue suggérant ainsi une expansion démographique des allèles de résistance dans la

population d'étude. Cependant, les valeurs positives de  $F^*$  indiquent un excès de mutation à fréquence intermédiaire. Pour ce qui est de l'étude de la diversité haplotypique, 24 haplotypes ont été identifiés en comparant les moustiques hyper résistants, les moustiques hypersensibles et les moustiques non exposés confirmant ainsi que les séquences de *GSTe7* sont très diversifiées. L'haplotype majoritaire Hap\_4 est partagé entre les moustiques hyper résistants et les moustiques non exposés suivis de Hap\_8 qui est uniquement présent chez les moustiques hyper résistants (Figure 43a). De manière générale, il a été observé que plusieurs haplotypes sont partagés entre les différents groupes de moustiques testés : c'est le cas des haplotypes Hap\_1 et Hap\_2 (partagés entre moustiques non exposés et hyper-sensibles) ; de Hap\_7 (partagés entre moustiques hypersensibles et hyper résistants) et des haplotypes Hap\_4 et Hap\_5 (partagés entre moustiques non exposés et hyper résistants). Cependant, il ressort de cette analyse que les haplotypes Hap\_8 et Hap\_9 sont majoritairement sectionnés chez les moustiques ayant survécu à l'exposition à la perméthrine. De l'analyse de l'arbre phylogénétique (Figure 43b), il ressort que les séquences de *GSTe7* des moustiques hyper résistants se rapprochent plus de ceux des moustiques non exposés, montrant ainsi que la population d'*An. funestus* de Mibellon exhiberaient des allèles de résistance à la perméthrine.

**Tableau XVII :** Diversité génétique de *GSTe7* au Cameroun

<b>GSTe7</b>	N(2n)	S	h (Hd)	Syn	NSyn	$\pi$ (k)	D	$F^*$
Non exposé (F0)	16	10	6 (0,82)	5	2	0,004 (3,5)	0,61 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	20	19	13 (0,94)	7	5	0,006 (5,1)	- 0,18 <sup>ns</sup>	1,12 <sup>ns</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	18	11	10 (0,90)	4	6	0,004 (3,24)	0,05 <sup>ns</sup>	1,01 <sup>ns</sup>
Total	54	21	24 (0,95)	12	10	0,005 (4,39)	-0,14 <sup>ns</sup>	1,71 <sup>*</sup>



**Figure 43** : Diversité génétique de *GStE7* liés au profil de résistance chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

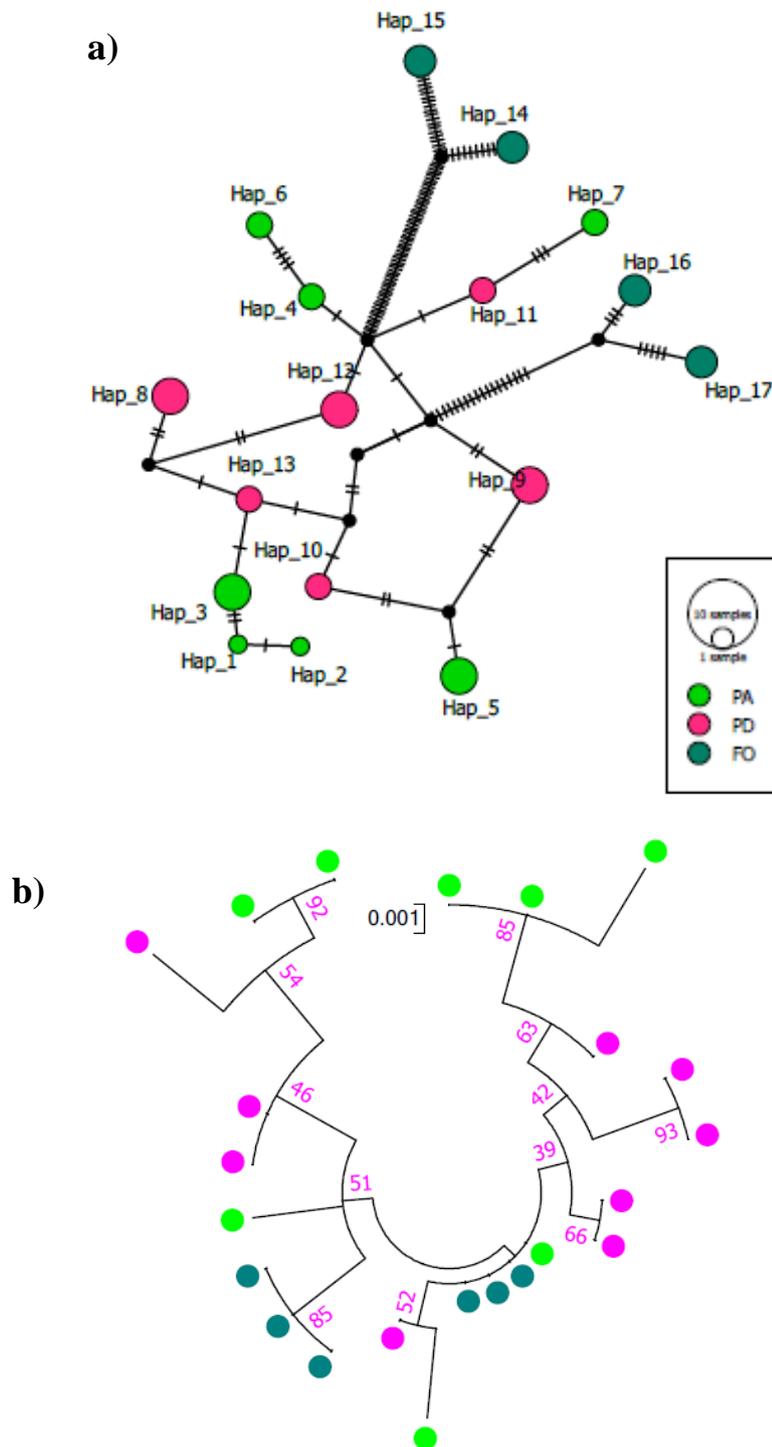
a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GStE7* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (F0) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

### III.1.1.3.7. Analyse de la diversité de *GSTe8*

Pour 46 séquences de *GSTe8* analysées, nous avons obtenu 15 haplotypes dont aucun n'est partagé entre les différents groupes de moustiques étudiés (Tableau XVIII ; Figure 44a). Huit mutations non-fonctionnelles pouvant affecter la composition des protéines de *GSTe8* ont été recensées avec une grande diversité nucléotidique. Les valeurs positives de  $F^*$  obtenues indiquent un excès de mutation à fréquence intermédiaire. Cependant, il a été observé une sélection des haplotypes majoritaires Hap\_3 et Hap\_5 chez les moustiques hyper résistants. De l'arbre phylogénétique, il ressort que les séquences des différents groupes sont rapprochées entre elles (Figure 44b). De même, il a été observé un rapprochement entre les séquences de *GSTe8* des moustiques résistants.

**Tableau XVIII :** Diversité génétique de *GSTe8* au Cameroun

<b>GSTe8</b>	<b>N(2n)</b>	<b>S</b>	<b>h (Hd)</b>	<b>Syn</b>	<b>NSyn</b>	<b><math>\pi</math> (k)</b>	<b>D</b>	<b><math>F^*</math></b>
Non exposé (F0)	12	4	4 (0,81)	2	0	0,003(2,18)	2,76 <sup>*</sup>	1,19 <sup>ns</sup>
Hypersensibles à la perméthrine (PD)	18	11	6 (0,86)	5	4	0,005 (3,76)	0,29 <sup>ns</sup>	1,45 <sup>**</sup>
Hyper résistants à la perméthrine (PA)	16	14	6 (0,87)	7	6	0,008 (5,73)	1,39 <sup>ns</sup>	1,49 <sup>**</sup>
Total	46	17	15 (0,94)	8	5	0,007 (4,56)	0,36 <sup>ns</sup>	1,63 <sup>*</sup>



**Figure 44 :** Diversité génétique de *GSTe8* liés au profil de résistance chez *Anopheles funestus* de Mibellon.

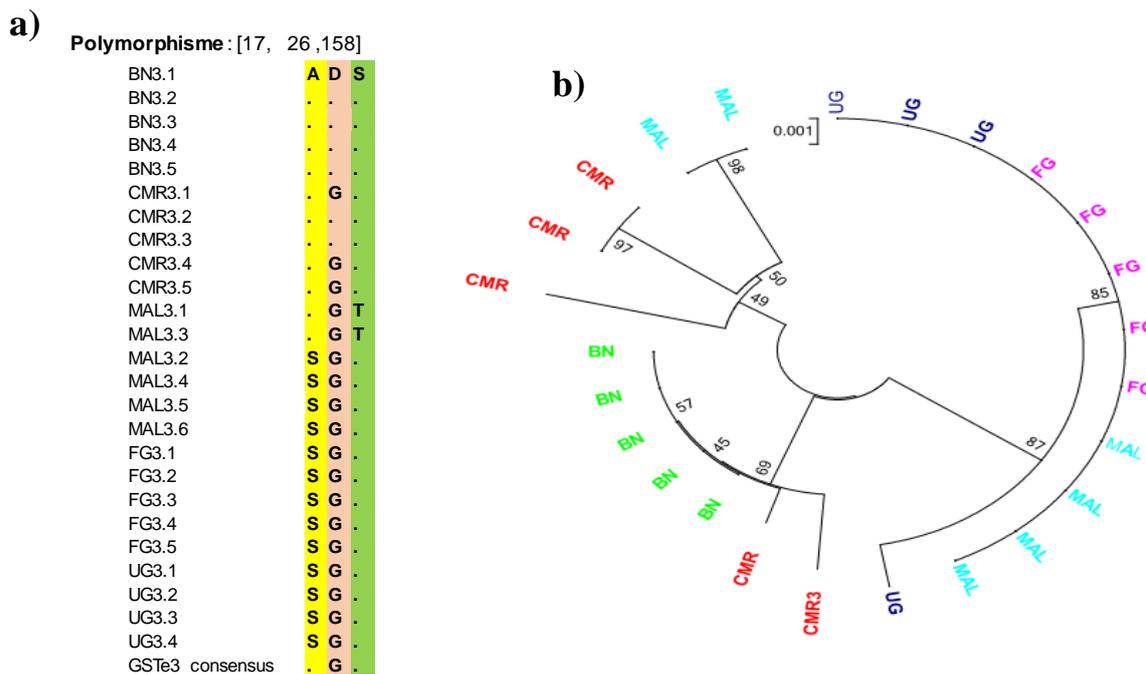
a) Réseau d'haplotypes des séquences en tenant compte du profil de résistance ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe8* par maximum de probabilité avec le modèle de Jukes-Cantor. (Moustiques non-exposés (F0) ; moustiques hypersensibles à la perméthrine (PD) ; moustiques Hyper résistants à la perméthrine (PA)).

### III.1.1.4. Potentiels marqueurs de résistance des GSTes chez *An. funestus*

#### III.1.1.4.1. Analyse comparative du polymorphisme allélique de *GSTe3*

La recherche des variations alléliques de *GSTe3* sur des échantillons d'*An. funestus* en Afrique a permis de ressortir les mutations présentes dans chaque localité comparées aux séquences de la souche sensible FANG. De l'analyse des séquences ADN complémentaires de *GSTe3*, il a été observé trois sites polymorphes tels que décrit sur la Figure 45a ; à savoir :

- la mutation de la Serine par l'Alanine en position 17 sur la séquence de *GSTe3* (S17A-*GSTe3*) du Benin et du Cameroun. Cette mutation est fixe au Benin et au Cameroun. Par contre, l'échantillon du Malawi possède les deux allèles S17 et A17 ;
- la mutation de la Glycine par l'acide Aspartique en position 26 (G26D-*GSTe3*), fixe au Benin et débutante au Cameroun comparé au Malawi et en Ouganda où la mutation n'a pas été observée ;
- la mutation de la Thréonine par la Serine en position 158 (T158S-*GSTe3*), uniquement présente au Malawi.



**Figure 45** :Analyse du polymorphisme de *GSTe3* chez *Anopheles funestus*.

a) Sites polymorphes avec les mutations des acides aminés ; b) Arbre phylogénétique de *GSTe3*.

(*CMR* = Cameroun ; *BN* = Benin ; *UG* = Ouganda ; *MAL* = Malawi ; *FG*= FANG)

L'arbre phylogénétique montre un rapprochement entre les séquences du Benin et du Cameroun. Cependant, les séquences du Malawi et d'Ouganda se rapprochent des séquences de la souche sensible de laboratoire FANG (Figure 45b). Ces observations ont guidé le choix

de la variation allélique G26D-GSTe3 présente au Cameroun/Benin et absente au Malawi/Ouganda pour la caractérisation fonctionnelle dans l'optique de ressortir l'impact de la présence de cette mutation dans la résistance d'*An. funestus* aux insecticides observée au Benin/Cameroun.

#### III.1.1.4.2. Analyse du polymorphisme de *GSTe4*

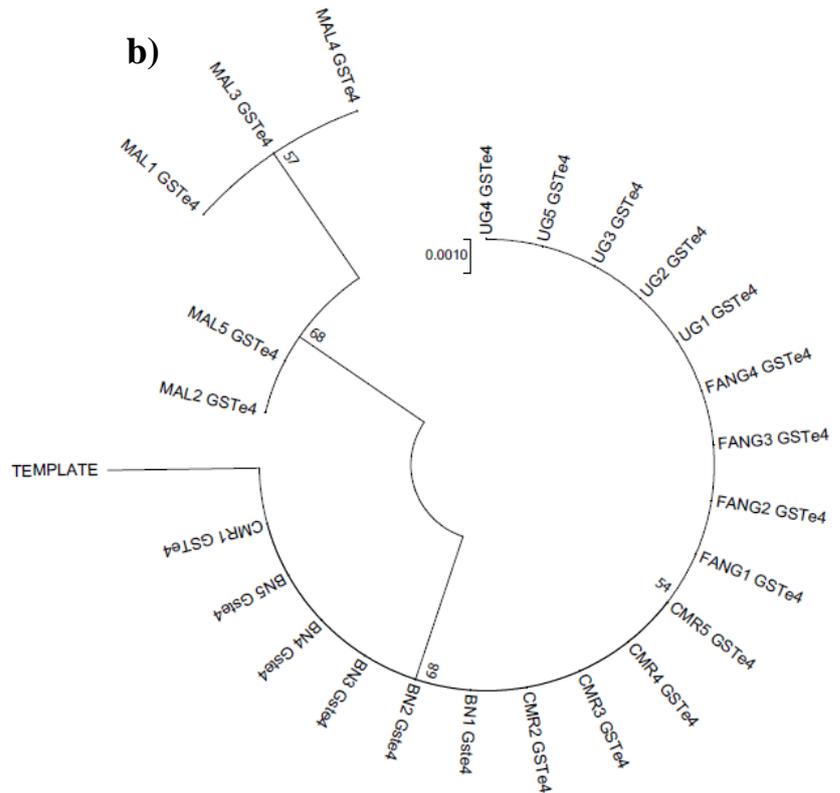
Nous avons constaté que les échantillons d'*An. funestus* du Benin, du Cameroun et de l'Ouganda possèdent les séquences identiques de *GSTe4*. De même, la recherche des changements d'acide aminé dans les séquences de *GSTe4* chez les populations étudiées a permis de ressortir 3 sites polymorphes (Figure 46a) :

- la mutation de la Leucine par la Valine en position 135 (L135V-GSTe4) présente dans toutes les populations d'étude exceptés au Malawi ;
- la mutation de l'Histidine par la Tyrosine en position 181 (H181Y-GSTe4). Cette mutation est fixe au Benin, au Cameroun, en Ouganda et absente au Malawi ;
- le remplacement du Glutamate par la Valine à la position 189 (E189A-GSTe4) fixe au Malawi et absente dans les autres populations d'étude.

L'étude de l'arbre phylogénétique met en exergue une similarité entre les séquences de *GSTe4* provenant du Benin, du Cameroun et de l'Ouganda. Cependant, les séquences du Malawi sont très polymorphes et isolées de celles des autres sites d'étude (Figure 46b). Cette analyse du polymorphisme de *GSTe4* a permis de sélectionner l'allèle Y/A-GSTe4 présent au Cameroun et au Benin et allèle H/E-GSTe4 présent au Malawi pour la validation fonctionnelle du rôle de ces changements d'acides aminés sur la résistance aux insecticides.

**a)**

Polymorphisme : [135, 181, 189]		
BN1 GSTe4	V	Y A
BN2 GSTe4	V	Y A
BN3 GSTe4	V	Y A
BN4 GSTe4	V	Y A
BN5 GSTe4	V	Y A
CMR1 GSTe4	V	Y A
CMR2 GSTe4	V	Y A
CMR3 GSTe4	V	Y A
CMR4 GSTe4	V	Y A
CMR5 GSTe4	V	Y A
MAL1 GSTe4	L	H E
MAL2 GSTe4	V	H E
MAL3 GSTe4	L	H E
MAL4 GSTe4	L	H E
MAL5 GSTe4	V	H E
FANG1 GSTe4	V	Y A
FANG2 GSTe4	V	Y A
FANG3 GSTe4	V	Y A
FANG4 GSTe4	V	Y A
UG1 GSTe4	V	Y A
UG2 GSTe4	V	Y A
UG3 GSTe4	V	Y A
UG4 GSTe4	V	Y A
UG5 GSTe4	V	Y A
GSTe4 consensus	L	Y A



**Figure 46 :** Analyse du polymorphisme de *GSTe4* chez *Anopheles funestus*.

a) Sites polymorphes avec les mutations des acides aminés ; b) Arbre phylogénétique de GSTe4.

(CMR = Cameroun; BN = Benin; UG = Ouganda; MAL = Malawi; FG= FANG)

### III.1.1.4.3. Analyse du polymorphisme de *GSTe6*

La recherche des mutations d'acide aminé sur le gène *GSTe6* en Afrique a révélé la présence de quatre mutations (Figure 47 a) qui pourraient être des potentiels marqueurs moléculaires pour traquer la résistance métabolique chez *An. funestus*.

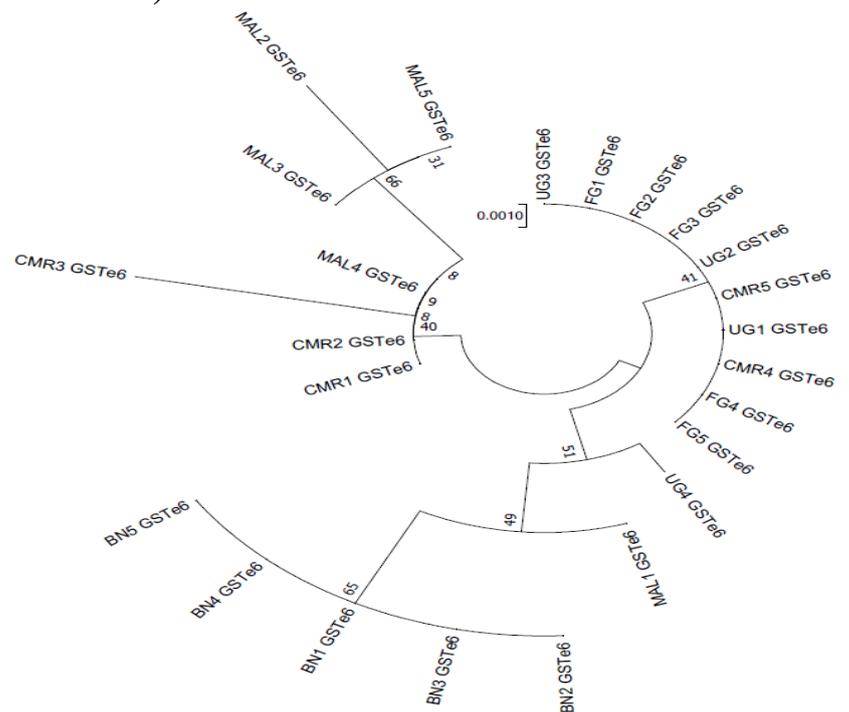
- La mutation de l'Alanine par la Thréonine en position 169 (A169T-GSTe6) sur les séquences de *GSTe6* du Benin ;
- La mutation de la Leucine par la Valine en position 174 (L174V-GSTe4) présente uniquement au Malawi ;
- La mutation de la Thréonine par la Serine en position 201 (T201S-GSTe6) fixe au Benin et débutant au Malawi et en Ouganda. Ce polymorphisme est absent au Cameroun sur les moustiques testés ;
- La mutation de la Glycine par le Glutamate en position 210 (G201E-GSTe6) fixe au Benin, présente au Malawi, mais absente au Cameroun.

De manière générale, telle que le montre l'arbre phylogénétique (Figure 46 b) ci-contre, les séquences du Bénin sont différentes de celles du Cameroun, du Malawi et d'Ouganda qui se rapprochent plus de celles de la souche sensible de Laboratoire FANG. Les allèles du Benin (E/S-GSTe6) et du Cameroun (G/T-GSTe6) avec des mutations respectivement en position 201 et 210, ont été sélectionnés pour la validation fonctionnelle à fin d'investiguer l'impact de leur présence sur la résistance aux insecticides.

**a) Polymorphisme : [169, 174, 201 ,210]**

GSTe6 consensus	T	L	T	E
BN1 GSTe6	A	.	S	.
BN2 GSTe6	A	.	S	.
BN3 GSTe6	A	.	S	.
BN4 GSTe6	A	.	S	.
BN5 GSTe6	A	.	S	.
CMR1 GSTe6	.	.	.	.
CMR2 GSTe6	.	.	.	.
CMR3 GSTe6	.	.	.	.
CMR4 GSTe6	.	.	.	G
CMR5 GSTe6	.	.	.	G
MAL1 GSTe6	.	.	S	.
MAL2 GSTe6	.	V	.	.
MAL3 GSTe6	.	V	.	.
MAL4 GSTe6	.	.	.	.
MAL5 GSTe6	.	V	.	.
UG1 GSTe6	.	.	.	G
UG2 GSTe6	.	.	.	G
UG3 GSTe6	.	.	.	G
UG4 GSTe6	.	.	S	G
FG1 GSTe6	.	.	.	G
FG2 GSTe6	.	.	.	G
FG3 GSTe6	.	.	.	G
FG4 GSTe6	.	.	.	G
FG5 GSTe6	.	.	.	G

**b)**



**Figure 47** :Analyse du polymorphisme de *GSTe6* chez *Anopheles funestus*.

a) Sites polymorphes avec les mutations des acides aminés ; b) Arbre phylogénétique de GSTe6 en l'Afrique.

(CMR = Cameroun ; BN = Benin ; UG = Ouganda ; MAL = Malawi ; FG= FANG)

De manière générale, de cette Analyse du polymorphisme, il ressort que plusieurs mutations sont présentes sur les séquences de GSTes à travers le continent. Il est donc important de valider le rôle fonctionnel que pourraient jouer de tels changements des acides aminés sur la résistance d'*An. funestus* aux insecticides.

### III.1.2. Discussion partielle 1

Le phénomène de résistance des moustiques aux insecticides est une menace pour le succès de la lutte anti-vectorielle (Lindsay *et al.*, 2021). Dans le cadre de cette étude, la détermination du profil de susceptibilité a montré que les populations d'*An. funestus* de Mibellon ont déjà développé une résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes de types I et II avec des taux de mortalité inférieurs à 98 %. Ce niveau de résistance d'*An. funestus* aux insecticides est de plus en plus répandu sur le territoire national (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017; Djouaka *et al.*, 2016; Menze *et al.*, 2016). En effet, le profil de résistance détecté chez les populations d'*An. funestus* de Mibellon corrobore celui d'*An. funestus* de la localité de Gounougou situé au Nord Cameroun où un niveau de résistance similaire au DDT (51 %) et un niveau de résistance plus modéré pour la perméthrine (78,6 %) et la deltaméthrine (68 %) avait été reporté en 2016 (Menze *et al.*, 2016). De même, des études antérieures ont reporté que les populations *An. funestus* de plusieurs zones africaines sont résistants aux insecticides testés à l'exemple de la localité de Kpome au Bénin où une résistance accrue au DDT (5 % de mortalité) avait été observée (Morgan *et al.*, 2010; Riveron *et al.*, 2018).

L'analyse transcriptomique à l'échelle du génome pour détecter les gènes associés à la résistance au DDT à travers l'Afrique a révélé que plusieurs familles de gènes de détoxification sont associées à cette résistance. Outre les cytochromes P450 et les GSTs, d'autres familles de gènes sont impliquées dans la résistance au DDT, notamment les carboxylestérases, sulfotransférases, facteurs de liaison à l'ATP, UDP-glucuronosyltransférases et les métalloprotéines. Cependant, un contraste du profil d'expression des cytochromes P450 et des glutathion s-transférases a été observé dans les différentes régions d'Afrique. Ce contraste du profil d'expression des gènes de détoxification à travers le continent est similaire à ceux des travaux d'analyses transcriptomiques antérieurs qui ont toujours montré une différence significative du niveau d'expression entre les régions africaines. C'est le cas des P450 dupliqués *CYP6P9a* et *CYP6P9b* principalement surexprimés en Afrique australe (Riveron *et al.*, 2013 ; Weedall *et al.*, 2019). De même, des travaux récents effectués sur les populations d'*An. funestus* ont montré que le gène GSTe2 est principalement surexprimé en Afrique de l'Ouest, notamment au Bénin (Riveron *et al.*, 2014), alors que le *CYP9K1* est majoritairement surexprimé en Afrique de l'Est (Hearn *et al.*, 2021). Globalement, pour ce qui est des GSTs, leur niveau d'expression varie à travers le continent et trois classes sont principales surexprimées à savoir : les GST epsilon, GST delta et les GST thêta. Concernant l'expression du cluster epsilon des GSTs, il a été observé que tous les gènes sont régulés à la hausse à travers l'Afrique lorsque l'on compare leur niveau l'expression chez les moustiques résistants au DDT et les moustiques susceptibles,

à l'exception de *GSTe8*. Ces observations corroborent ceux obtenus chez d'autres espèces de moustiques notamment chez le vecteur du paludisme *An. gambiae* (Mitchell *et al.*, 2014) ou chez le vecteur de la dengue *Aedes aegypti* (Bariami *et al.*, 2012).

Pour assurer sa survie vis à vis de l'exposition à un insecticide, le moustique peut exprimer de manière plus abondante des enzymes lui permettant de métaboliser l'insecticide et par conséquent de faciliter son excrétion. D'où la nécessité d'évaluer le profil d'expression des GSTes en comparant le niveau d'expression entre les moustiques résistants et les susceptibles. La validation du profil d'expression des gènes du cluster epsilon de GSTs lié à la résistance au DDT et à la perméthrine à travers le continent par qPCR, a montré que tous les GSTes sont exprimés chez les populations *An. funestus* tétées. Cependant, le niveau d'expression varie d'une zone du continent à une autre et les plus exprimés étant : *GSTe2*, *GSTe3* et *GSTe4* au Bénin ; *GSTe2*, *GSTe4*, *GSTe3* et *GSTe6* au Cameroun ; *GSTe6* et *GSTe8* en Ouganda ; *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe6*, *GSTe5* et *GSTe8* au Malawi. Plusieurs études antérieures avaient lié la surexpression des GSTs à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* (Djègbè *et al.*, 2014; Ortelli *et al.*, 2003), *An. funestus* (Riveron *et al.*, 2014; Tchigossou *et al.*, 2020) et chez *Aedes aegypti* (Lumjuan *et al.*, 2005). De manière générale, le niveau d'expression des GSTes est plus élevé chez les moustiques résistants au DDT comparés aux moustiques résistants à la perméthrine. Cette association entre la surexpression des GSTes et la résistance au DDT pourrait s'expliquer par le fait qu'en présence du glutathion réduit les GSTes sont capables de métaboliser directement le DDT en DDE lui rendant moins toxique, de plus les GSTes jouent un rôle dans le stress oxydatif et par conséquent, son niveau d'expression élevé serait en réponse au stress oxydatif causé par les xénobiotiques. Ces résultats corroborent à ceux de Riveron et collaborateur qui avaient montré que le niveau d'expression de *GSTe2* était élevé chez l'échantillon d'*An. funestus* du Bénin résistant au DDT comparé aux moustiques sensibles (Riveron *et al.*, 2014).

L'analyse de la diversité génétique des *GSTe1*, 3, 4, 5, 6, 7, et *GSTe8* entre moustiques hyper résistants et hypersensibles au Cameroun permet de mieux comprendre et prédire la résistance face à un insecticide, les observations obtenues de cette analyse pourront montrer s'il y a une sélection vis-à-vis d'une variation allélique et si les mutations obtenues sont fixes ou en pleine expansion dans une population afin d'aider les décideurs dans le choix des insecticides utilisés pour la PIV ou pour l'imprégnation des MILDA. Les GSTes des moustiques hyper résistants, hypersensibles et des moustiques non exposés ont été séquencées avec succès afin de déterminer s'il y aurait une sélection liée au profil de résistance. De cette étude, il a été observé une faible diversité génétique pour *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe6* et *GSTe8*. Plusieurs

haplotypes sont uniquement présents chez les moustiques hyper résistants montrant que ces derniers sont sélectionnés lors de l'exposition à la perméthrine. Par contre, certains haplotypes sont présents chez les moustiques résistants et non exposés et absents chez les moustiques sensibles montrant que les mutations observées pourraient être impliquées dans la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus* comme précédemment rapporté chez *An. gambiae* (Mitchell *et al.*, 2014) et *Ae. Aegypti* (Lumjuan *et al.*, 2011). L'analyse de l'arbre phylogénétique montre que les séquences de *GSTe4* des moustiques hypersensibles sont plus proches de celles du contrôle comparé aux séquences des moustiques hyper résistants. Cependant, la comparaison de la diversité des GSTes en fonction du statut de résistance des moustiques a révélé que les moustiques sensibles présentent un nombre élevé de site polymorphe comparé à ceux qui sont résistants. Ceci suggère la faible pression de sélection des GSTes dans notre site d'étude indiquant que le processus de sélection suit son cours. Cette faible pression de sélection contraste avec le cas de l'Afrique de l'Ouest où une résistance due au *GSTe2* a induit une large signature de sélection sur la portion du génome contenant ce gène (Weedall *et al.* 2020). De même, le nombre d'haplotypes, la diversité haplotypique, le nombre de mutations non-fonctionnelles et le nombre de mutations fonctionnelles étaient presque similaires. Les paramètres  $D$  de Tajima (1989),  $F^*$  de Fu & Li (1993) permettant de tester la stabilité démographique des populations, ont été globalement non significatif. De manière générale, l'analyse des arbres phylogénétiques des haplotypes des GSTes d'*An. funestus* s.s. a révélé une association entre certaines mutations et le phénotype des moustiques testés. En effet, la topologie de ces arbres a montré un regroupement des haplotypes en fonction des phénotypes, cependant certains haplotypes sont partagés entre les moustiques sensibles, les résistants et les susceptibles. En outre, le polymorphisme relativement élevé des GSTes est démontré par le nombre élevé d'haplotypes obtenus. La présence des haplotypes dominants dans la plus part de cas et des haplotypes appartenant uniquement aux moustiques résistants indique la sélection probable des mutations qui pourraient jouer un rôle dans la résistance à la perméthrine et au DDT à l'exemple des cas rapportés pour le gène *GSTe2* (Riveron *et al.*, 2014) et les cytochromes P450s *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (Ibrahim *et al.*, 2015).

Les variations alléliques via les mutations des acides aminés sur les séquences des gènes sont des facteurs pouvant conférer la résistance aux insecticides chez les vecteurs. La recherche de ces variations est nécessaire pour la mise sur pied des marqueurs moléculaires pouvant permettre de détecter facilement la résistance dans une population et de prendre les mesures nécessaires pour prévenir l'aggravation cette résistance aux insecticides sur le terrain. Dans le cadre de cette étude, la recherche des mutations d'acides aminés chez les GSTes en Afrique a

permis de détecter les variations alléliques dans chacune des quatre zones d'études pouvant être considéré comme potentiels marqueurs moléculaires de résistance. Pour les gènes *GSTe1*, *GSTe5*, *GSTe7* et *GSTe8* des variations alléliques majeures associées au phénotype n'ont pas été observées. En outre, l'analyse des séquences de *GSTe3*, a relevé la mutation de la glycine par l'acide aspartique en position 26 de *GSTe3* (G26D-GSTe3) fixe au Bénin et débutant au Cameroun comparé au Malawi et en Ouganda où la mutation n'a pas été observée. L'analyse de *GSTe4* a permis de sélectionner l'allèle Y/A-GSTe4 (Y181 ; A189) présent au Cameroun, au Bénin et en Ouganda et l'allèle H/E-GSTe4 (H181, E189) présent au Malawi. Pour ce qui est de *GSTe6*, il a été détecté l'allèle E/S-GSTe6 (S201, E210) fixe au Bénin et l'allèle G/T-GSTe6 (T201 ; G210) présent au Cameroun, en Ouganda et au Malawi. Ces principaux allèles sélectionnés pourraient être des potentiels marqueurs de résistance, car ils sont associés au niveau de résistance des moustiques dans les localités où ils sont présents comparés au profil de susceptibilité d'*An. funestus* dans les pays où ces mutations sont absentes et chez les moustiques de la souche sensible de laboratoire FANG. Une variation allélique similaire due à la mutation de la Leucine par la Phénylalanine en position 119 avait été détectée au niveau du gène *GSTe2* (L119F-GSTe2) d'*An. funestus* au Bénin et au Cameroun (Riveron et al 2014 ; 2017) permettant ainsi de mettre sur pieds le premier marqueur moléculaire pour traquer la résistance métabolique chez les vecteurs du paludisme (Riveron *et al.*, 2014). De même la caractérisation de l'impact de cette mutation sur la résistance a montré que la présence de l'allèle F119-GSTe2 est associée à la résistance au DDT et à la perméthrine et aurait un impact sur les traits de vies du moustique à savoir la fécondité et la longévité (Tchakounte *et al.*, 2019; Tchouakui *et al.*, 2018).

### III.1.3. Conclusion partielle 1

L'étude du profil de susceptibilité d'*An. funestus* de mibellon a révélé que cette population a déjà développé la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT. De même, il a été observé que les GSTes sont surexprimées chez les moustiques résistants à la perméthrine et au DDT. De manière générale, l'analyse de la diversité génétique des GSTes d'*An. funestus* s.s. a révélé une association entre la présence de certaines mutations et le phénotype des moustiques testés. La comparaison des séquences des GSTes des populations d'*An. funestus* de quatre pays d'Afrique a permis de détecter les variations alléliques G26D-GSTe3, Y/A-GSTe4, H/E-GSTe4, E/S-GSTe6 et G/T-GSTe6 qui pourraient être associées au profil de résistance de ces différentes zones d'étude. Cependant, le rôle de la surexpression de ces GSTes ainsi que l'impact de la présence de ces variations alléliques sur la résistance aux insecticides n'avaient

pas encore été caractérisés, d'où la nécessité de réaliser la caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *An. funestus* effectuée dans la deuxième partie du présent travail de recherche.

## **III.2. Caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus***

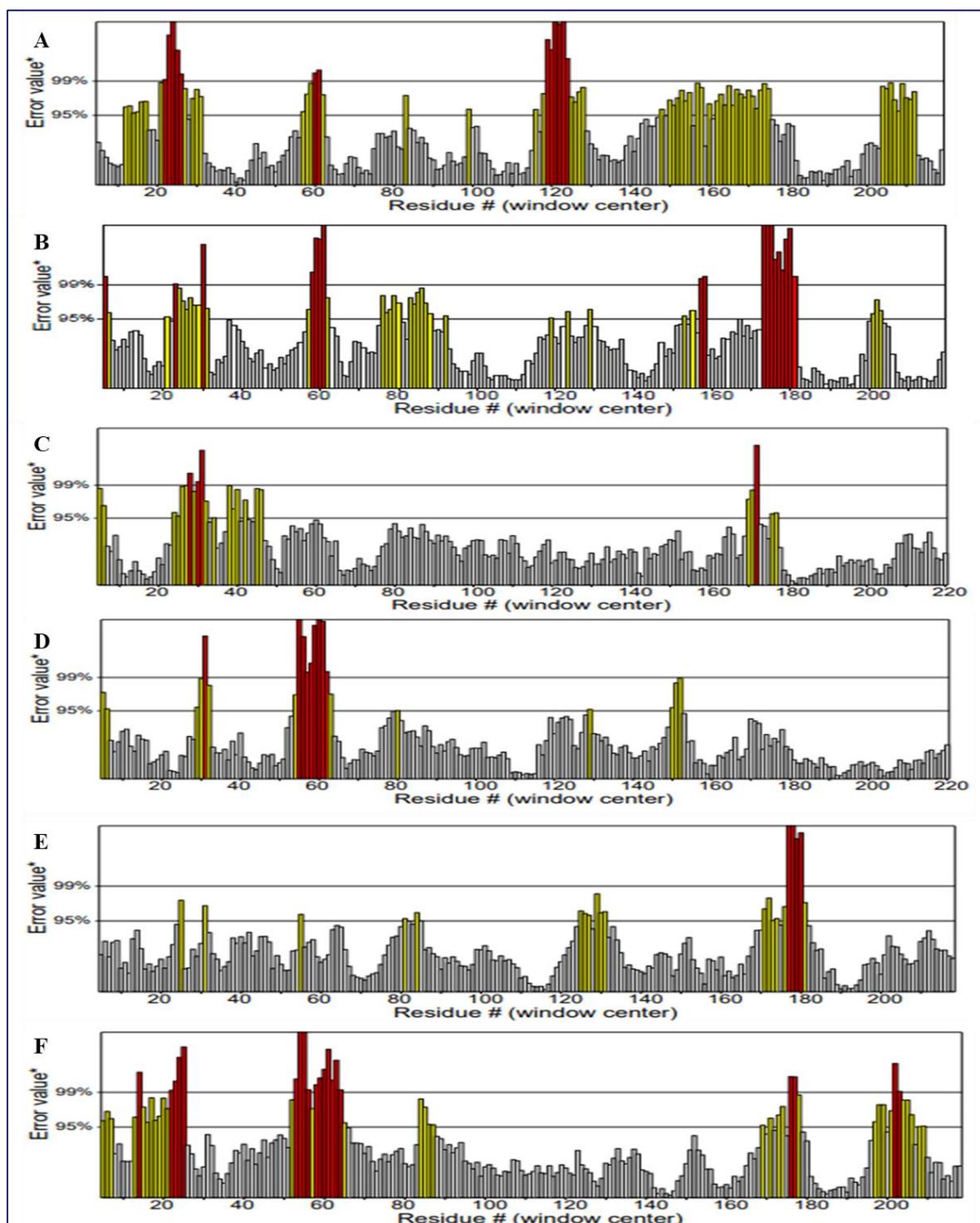
### **III.2.1. Résultats partiels 2**

#### **III.2.1.1. Affinité entre les structures 3D des GSTes générées *in silico* et les insecticides**

Dans le but de prédire l'affinité entre les insecticides et les protéines de GSTe3 (D26-GSTe3 et G26-GSTe3), GSTe4 (H/E-GSTe4 et Y/A-GSTe4) et de GSTe6 (E/S-GSTe6 et G/T-GSTe6) ainsi que l'impact des variations alléliques sur cette affinité, les structures tridimensionnelles (3D) des différents allèles de ces GSTes ont été modélisées *in silico* et le cofacteur glutathion (GSH) a été ajouté à chaque modèle. Par la suite, l'affinité entre ces protéines et les insecticides (DDT, perméthrine et deltaméthrine) a été prédite par la technique d'arrimage moléculaire afin d'avoir la distance en ångström (Å) entre le GSH et les insecticides.

##### **III.2.1.1.1. Vérification de la qualité des structures 3D des GSTes modélisées**

Les structures 3D des GSTes ont été modélisées et la molécule de glutathion a été attachée sur ces protéines. La vérification de la qualité de ces structures grâce au logiciel Errat v2.0 a indiqué que toutes les structures modélisées ont un facteur de qualité global supérieur à 50% (Figure 48), montrant ainsi que les modèles obtenus sont de très bonne qualité. En effet, les facteurs de qualité suivants ont été obtenus : 67,90 % (D26-GSTe3) ; 77,20 % (G26-GSTe3) ; 89,35 % (Y/A-GSTe4) ; 90,27 % (H/E-GSTe4) ; 90,18 % (E/S-GSTe6) et 75,70 % (G/T-GSTe6).



**Figure 48 :** Graphe Errat résultant de l'évaluation de la structure 3D des GSTes.

A) D26-GSTe3 ; B) G26-GSTe3 ; C) Y/A-GSTe4 ; D) H/E-GSTe4 ; E) E/S-GSTe6 et F) G/T-GSTe6.

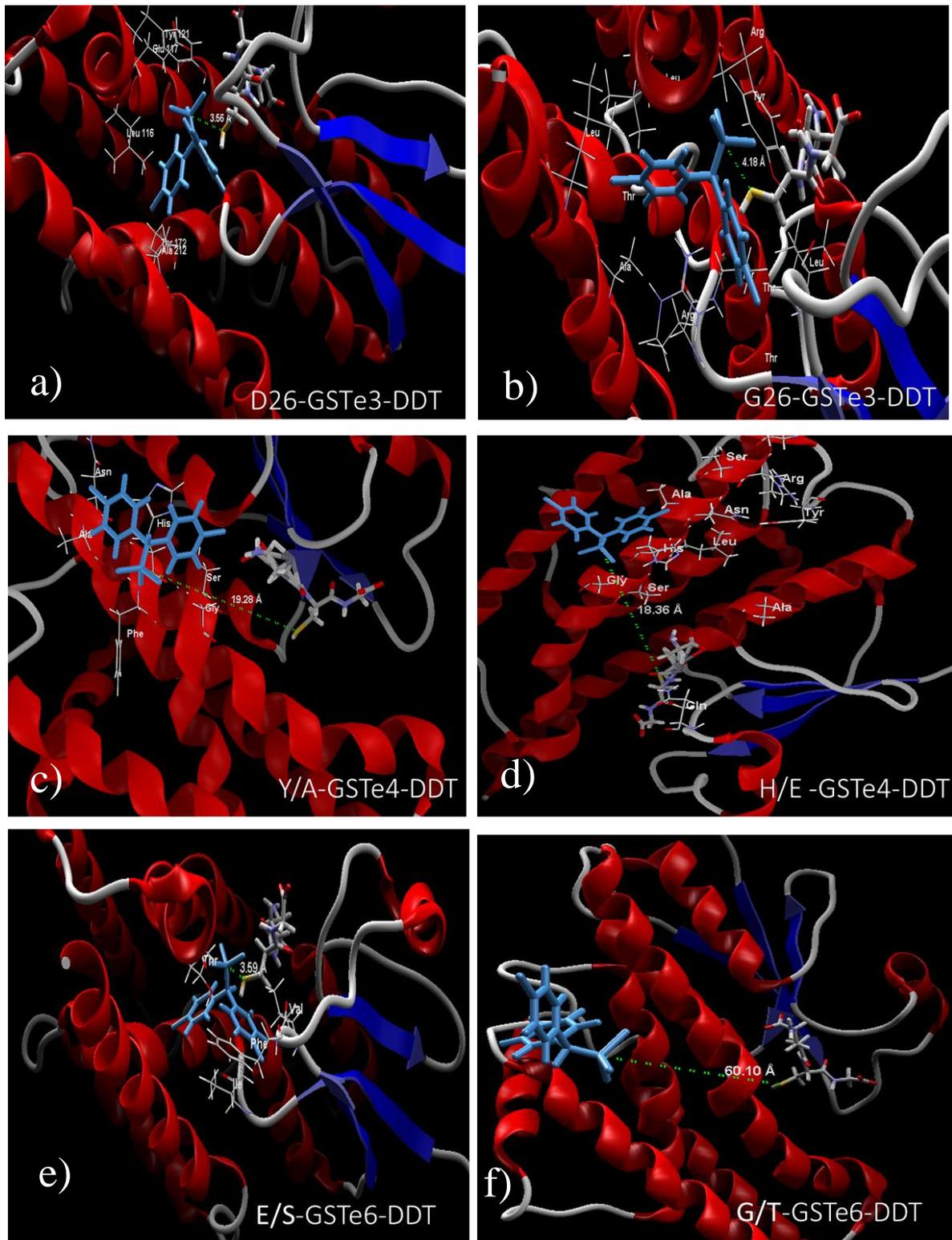
### III.2.1.1.2. Effet des variations alléliques des GSTes sur la surface de la cavité du site actif de leurs structures 3D

La comparaison du volume des cavités de fixation du ligand des structures 3D des allèles mutés et non mutés des GSTes modélisées a été effectuée dans le but de voir si les variations

alléliques observées sur les séquences de ces gènes peuvent affecter cette cavité. De manière générale, il a été observé une augmentation significative de la cavité du site actif pour la structure 3D des protéines des allèles mutés D26-GSTe3 (87,57) ; Y/A-GSTe4 (34,88) et E/S-GSTe6 (55,88) Comparés à celles des allèles non mutés respectifs G26-GSTe3 (37,88) ; H/E-GSTe4 (29,18) et G/T-GSTe6 (19,45). En effet, cette augmentation du volume du site actif pourrait augmenter l'activité métabolique des GSTes en permettant aux insecticides de mieux se fixer sur le glutathion réduit.

### **III.2.1.1.3. Affinité ente les structures 3D des GSTes modelées et le DDT**

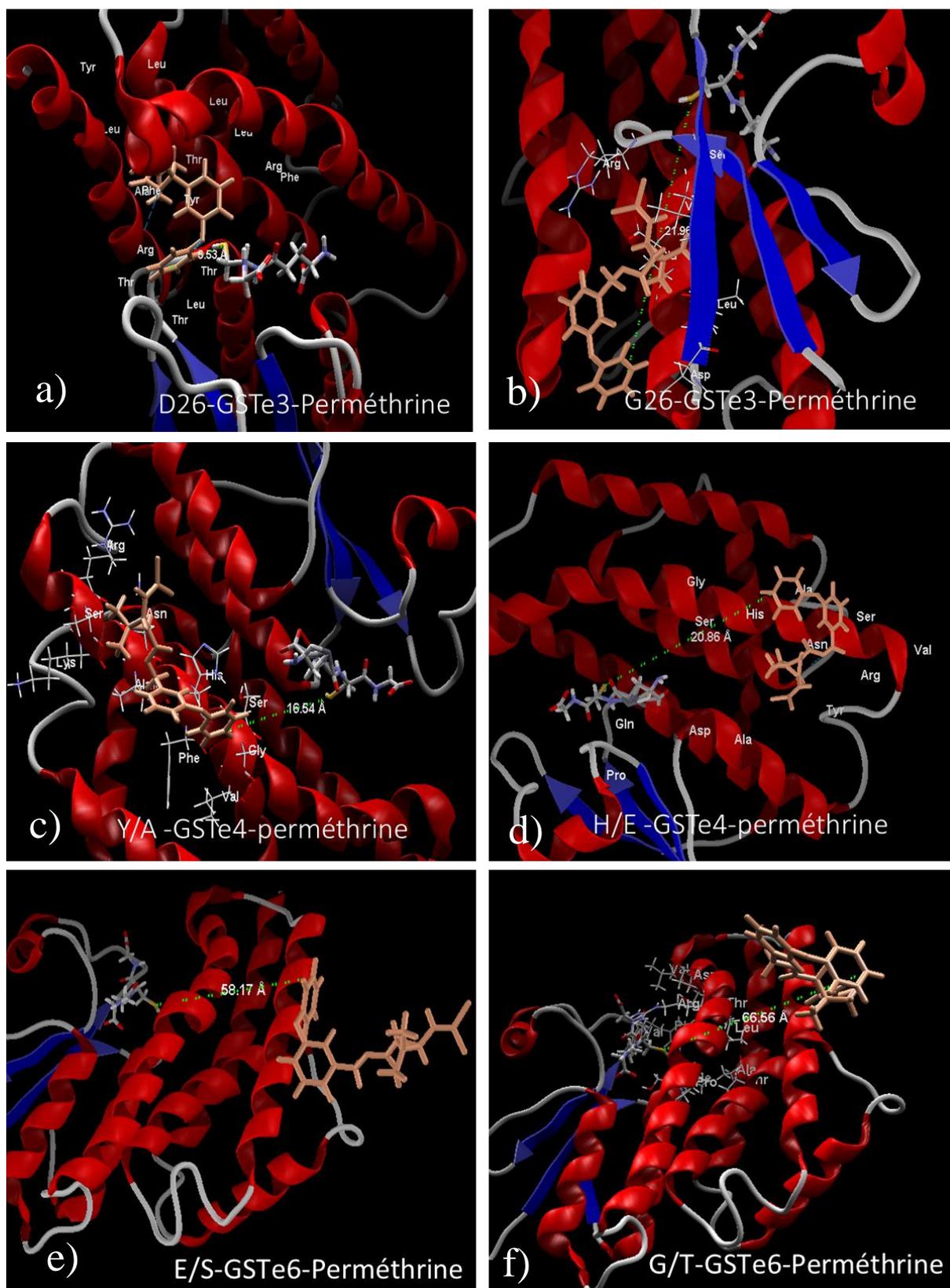
La détermination de l'affinité entre la structure des GSTes et le DDT consistait à évaluer la distance entre la molécule de GSH attachée au GSTes et le DDT. Plus la distance est faible, plus la réaction va nécessiter une faible énergie et par conséquent, l'affinité sera meilleure. Les poses productives vis-à-vis du DDT ont été obtenues avec les allèles de GSTe3 et GSTe6. Cependant, les distances GSH-DDT des allèles de résistance D26-GSTe3 (3,56 Å) et E/S-GSTe6 (3,59 Å) ont été inférieures à celles des allèles n'ayant pas ces mutations G26-GSTe3 (4,18 Å) et G/T-GSTe6 (60,10 Å). Par contre, aucune pose productible n'a été obtenue pour les allèles de GSTe4 (Figure 49).



**Figure 49** : Affinité entre les GSTes et le DDT (en bleu) :  
a) D26-GSTe3 ; b) G26-GSTe3 ; c) Y/A-GSTe4 ; d) H/E-GSTe4 ; e) E/S-GSTe6 et ; f) G/T-GSTe6.

#### **III.2.1.1.4. Affinité ente les structures 3D des GSTes modelées et la perméthrine**

Dans le cas de la perméthrine, la liaison se fait entre le carbone en 4' du benzène externe de la perméthrine et le groupement SH du glutathion. Dans le cadre de cette analyse, aucune pose productible n'a été obtenue entre le glutathion des GSTes et la perméthrine à l'exception de la protéine de l'allèle muté D26-GSTe3 pour qui une distance de 5,53 Å a été obtenue. Par contre, il a été observé une réduction de la distance entre les allèles mutés D26-GSTe3 (5,53 Å) ; Y/A-GSTe4 (16,54 Å) et E/S-GSTe6 (56,84 Å) et la perméthrine comparés aux allèles G26-GSTe3 (21,96 Å) ; H/E-GSTe4 (20,86 Å) et G/T-GSTe6 (75,11 Å) présents dans la souche sensible de laboratoire Fang (Figure 50). Malgré la distance élevée entre le glutathion et la perméthrine, il a tout de même été remarqué la présence des liaisons hydrogène entre certains acides aminés du site actif des protéines de GSTe3 et GSTe6 avec la perméthrine.

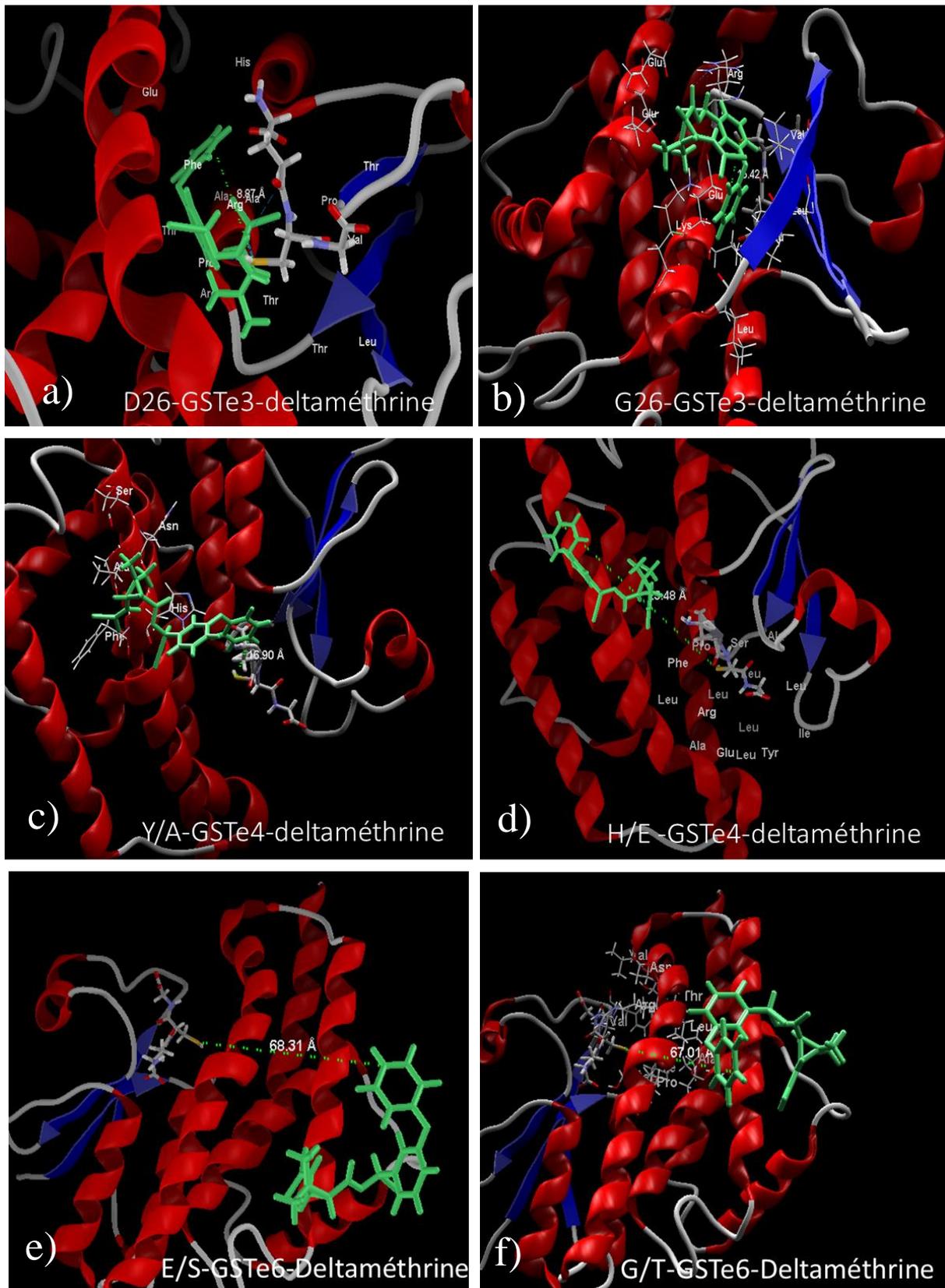


**Figure 50 :** Affinité entre les GSTes et la perméthrine (en orange).

a) D26-GSTe3 ; b) G26-GSTe3 ; c) Y/A-GSTe4 ; d) H/E-GSTe4 ; e) E/S-GSTe6 et ; f) G/T-GSTe6.

### **III.2.1.1.5. Affinité ente les structures 3D des GSTes modelées et la deltaméthrine**

La prédiction de l'affinité entre les structures 3D des protéines modélisées et la deltaméthrine a montré que ces derniers n'ont pas une grande affinité avec la deltaméthrine. Aucune pose productible n'a été obtenue pour le cas de la deltaméthrine. La distance entre le glutathion et l'insecticide était supérieure à 5 Å pour toutes les poses testées (Figure 51). À l'exception de GSTe6 où aucune différence n'a été observée pour les deux allèles (60 Å), une affinité plus levée a été observée avec les allèles mutés D26-GSTe3 (8,87 Å) et Y/A-GSTe4 (16,90 Å) comparé aux allèles G26-GSTe3 (15,42 Å) et H/E-GSTe4 (23,48 Å) indiquant que les variations alléliques observées sur la séquence des GSTes pourraient augmenter leurs affinités avec la deltaméthrine.



**Figure 51 :** Affinité entre les GSTes et la deltaméthrine (en vert).

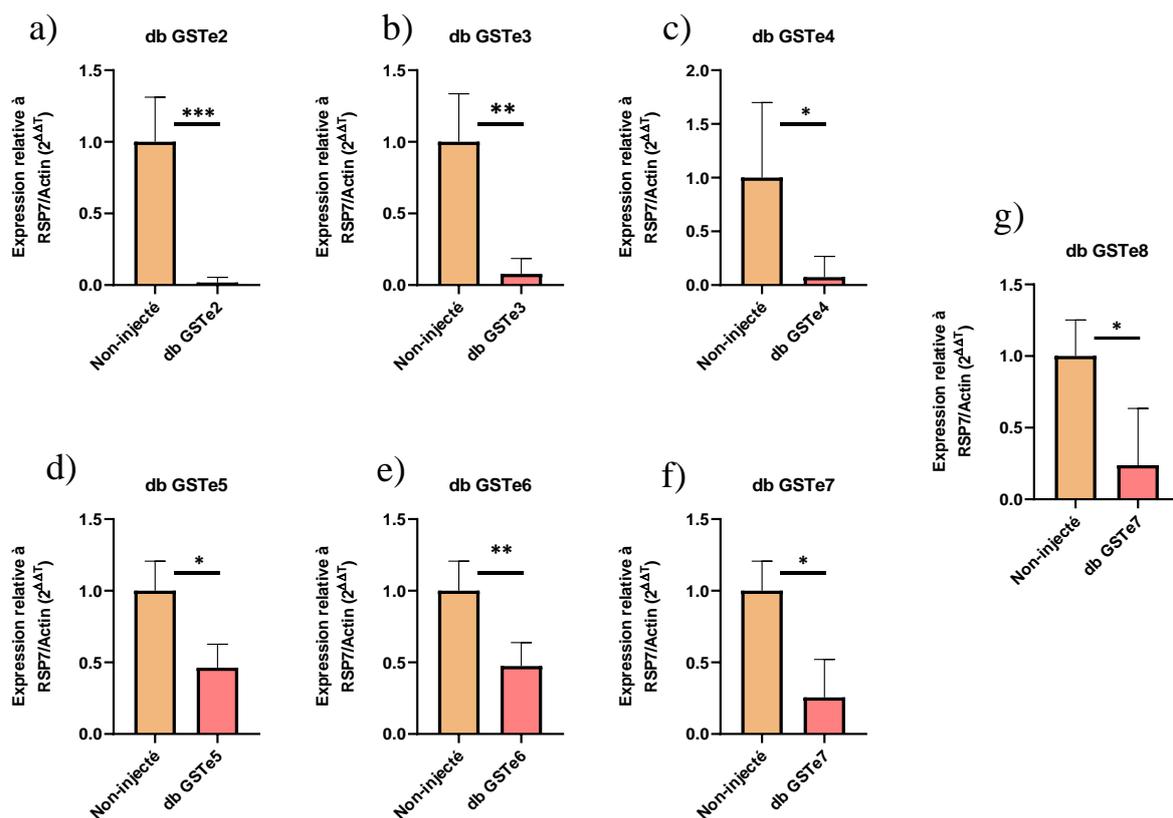
a) D26-GSTe3 ; b) G26-GSTe3 ; c) Y/A-GSTe4 ; d) H/E-GSTe4 ; e) E/S-GSTe6 et ; f) G/T-GSTe6.

### **III.2.1.2. Rôle fonctionnel des GSTes sur la résistance aux insecticides**

#### **III.2.1.2.1. Etude *in vivo* du rôle des GSTes sur la résistance des populations d'*An. funestus* aux insecticides par la méthode d'ARN interférence**

##### **III.2.1.2.1.1. Confirmation de la réduction de l'expression des GSTes chez les moustiques injectés au double brin d'ARN**

Pour confirmer que l'injection des doubles brins d'ARN des GSTes inhibe de manière réversible l'expression des glutathion s-transférases epsilon *in vivo* chez les moustiques, nous avons réalisé la PCR à temps réel sur l'ADNc des moustiques injectés (dbGSTes) et des moustiques non injectés à l'aide des amorces spécifiques à chaque GSTes. Le niveau d'expression des GSTes a été mis en évidence en considérant comme gènes de ménage l'actine 5C et la Protéine Ribosomale S7 (*RPS7*) et les résultats sont consignés dans la Figure 52. De manière générale, il a été observé une réduction partielle significative du niveau d'expression des GSTes chez tous les moustiques 4 jours après injection ( $P = 0,0024$  (*GSTe2*);  $0,0014$  (*GSTe3*);  $0,0377$  (*GSTe4*);  $0,0422$  (*GSTe5*);  $0,0014$  (*GSTe6*);  $0,0387$  (*GSTe7*) et  $0,0241$  (*GSTe8*)), comparé au niveau d'expression de ces GSTes chez les moustiques n'ayant pas reçu le double brin d'ARN de GSTes. Ce faible niveau d'expression observé chez les moustiques injectés par rapport aux moustiques non-injectés suggère que l'injection d'ARN double brin *in vivo* réduit considérablement l'expression des GSTs epsilon chez *An. funestus*.



**Figure 52 :** Confirmation de l'effet *knockdown* des doubles brins d'ARN des GSTes par PCR à temps réel chez les moustiques injectés et les moustiques non injectés du même âge. (a) dbGSTe2, (b) dbGSTe3, (c) dbGSTe4, (d) dbGSTe5, (e) dbGSTe6, (f) dbGSTe7, (g) dbGSTe8. L'injection de ARNdb réduit significativement l'expression des GSTes. \* =  $P < 0,05$  et \*\* =  $P < 0,01$ .

### III.2.1.2.1.2. Effet de la réduction du niveau d'expression des GSTes sur la résistance d'*An. funestus* de Mibellon à la perméthrine

Des mortalités significativement plus élevées ont été observées après exposition à la perméthrine chez les moustiques ayant préalablement reçu une injection du dbGSTe2 ( $72,46 \pm 3,09$  % ;  $P = 0,0052$ ), dbGSTe3 ( $70,09 \pm 2,75$  % ;  $P = 0,009$ ), dbGSTe4 ( $69,01 \pm 3,70$  % ;  $P = 0,017$ ) et du dbGSTe5 ( $67,61 \pm 4,41$  % ;  $P = 0,018$ ) comparé au groupe témoin négatif non injecté ( $55,50 \pm 3,59$  %) et au groupe témoin positif injecté au dbGFP ( $58,09 \pm 6,41$  %). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les mortalités des moustiques injectés avec le dbGSTe6 ( $59,28 \pm 4,14$  % ;  $P = 0,25$ ), le dbGSTe7 ( $56,93 \pm 3,63$  % ;  $P = 0,39$ ) et le dbGSTe8 ( $61,25 \pm 2,16$  % ;  $P = 0,13$ ) par rapport aux groupes témoins, 1h après exposition à la perméthrine (Figure 53a). De même, aucune différence significative n'a été observée entre le taux de mortalité des moustiques non-injectés ( $55,50 \pm 3,59$  %) et ceux des moustiques injectés avec le double brin GFP ( $58,09 \pm 6,41$  % ;  $P = 0,35$ ), tous deux utilisés comme témoins, indiquant que le processus d'injection en lui-même n'affecte pas la survie des moustiques

injectés. Ces résultats de l'exposition d'*An. funestus* à la perméthrine ont révélé que les gènes *GSTe2*, *3*, *4* et *5* contribuent à la résistance de ce vecteur à la perméthrine.

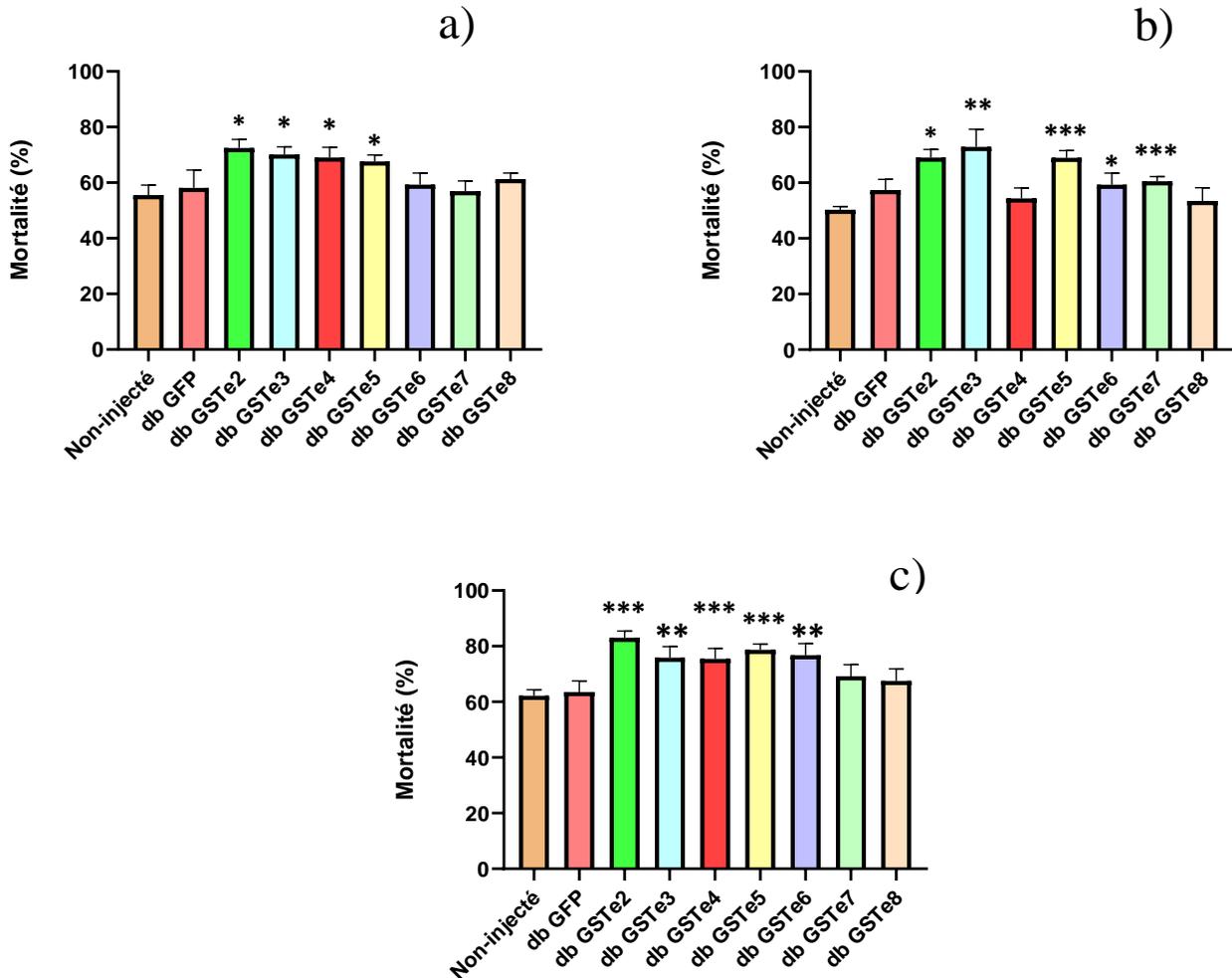
#### **III.2.1.2.1.3. Effet de la réduction du niveau d'expression des GSTes sur la résistance d'*An. funestus* de Mibellon à la deltaméthrine**

L'exposition des moustiques ayant reçu une injection de double brin des GSTes à la deltaméthrine (Figure 53b) a révélé que le taux de mortalité était significativement plus élevé avec les moustiques ayant reçue une injection de dbGSTe2 ( $69,06 \pm 2,92$  % ;  $P = 0,026$ ), dbGSTe3 ( $72,87 \pm 6,29$  % ;  $P = 0,0001$ ), dbGSTe5 ( $68,92 \pm 2,58$  % ;  $P = 0,000038$ ), dbGSTe6 ( $59,28 \pm 4,14$  % ;  $P = 0,018$ ) et dbGSTe7 ( $60,53 \pm 1,63$  % ;  $P = 0,00039$ ) par rapport aux moustiques non-injectés ( $50,25 \pm 1,18$  %) et aux moustiques injectés au dbGFP ( $57,40 \pm 3,78$  %). Par contre, aucune différence significative n'a été observée chez les moustiques injectés au dbGSTe4 ( $54,41 \pm 3,68$  % ;  $P = 0,11$ ) et au dbGSTe8 ( $53,49 \pm 4,73$  % ;  $P = 0,22$ ) par rapport au groupe témoin non injecté. De même, aucune différence significative n'a pas été observée entre le taux de mortalité des moustiques non-injectés ( $50,25 \pm 1,18$  %) et des moustiques injectés avec le double brin GFP ( $57,40 \pm 3,78$  % ;  $P=0,41$ ), indiquant que le processus d'injection en lui-même n'affecte pas la survie des moustiques injectés. Au vue de ces résultats, il ressort que l'inhibition des GSTes chez *An. funestus* augmenterait significativement la sensibilité des moustiques à la deltaméthrine, à l'exception de la réduction de l'expression de *GSTe4* et *GSTe8* pour lesquels aucun impact sur la sensibilité des moustiques n'a été observé après injection des dbGSTe4 et dbGSTe8 chez l'échantillon d'*An. funestus* de Mibellon.

#### **III.2.1.2.1.4. Effet de la réduction du niveau d'expression des GSTes sur la résistance d'*An. funestus* de Mibellon au DDT**

L'évaluation du profil de susceptibilité d'*An. funestus* de Mibellon au DDT après inhibition de la surexpression des GSTes nous a permis de mettre en évidence l'implication de l'expression des gènes lorsque le moustique est en contact avec le DDT (Figure 53c). En effet, une différence de mortalité significative a été enregistrée avec les moustiques injectés au dbGSTe2 ( $83,0 \pm 2,39$  % ;  $P = 0,0001$ ), dbGSTe3 ( $75,87 \pm 3,99$  % ;  $P = 0,0036$ ), dbGSTe4 ( $75,45 \pm 3,72$  % ;  $P = 0,00052$ ), dbGSTe5 ( $78,68 \pm 2,11$  % ;  $P = 0,00038$ ) et dbGSTe6 ( $76,78 \pm 4,19$  % ;  $P = 0,003$ ) comparé aux moustiques non-injectés ( $62,21 \pm 2,16$  %) et ceux injectés au dbGFP ( $63,52 \pm 4,01$  %) après 1 h d'exposition au DDT. En outre, aucune différence de mortalités significative n'a été obtenue en comparant la mortalité des moustiques injectés au dbGSTe7 et dbGSTe8 comparé aux témoins suite à l'exposition de ceux-ci au DDT. Il a été

également observé comme dans le cas de l'exposition à la perméthrine et à la deltaméthrine que le processus d'injection en lui-même n'affecte pas la survie des moustiques injectés en comparant la mortalité des moustiques non-injectés ( $62,21 \pm 2,16 \%$ ) et ceux injectés au dbGFP ( $63,52 \pm 4,01 \%$  ;  $P=0,38$ ). De manière générale, à l'exception de la réduction de la surexpression de *GSTes7* et de *GSTe8*, ces résultats suggèrent que la réduction de la surexpression des GSTes augmenterait la sensibilité au DDT chez *An. funestus*.



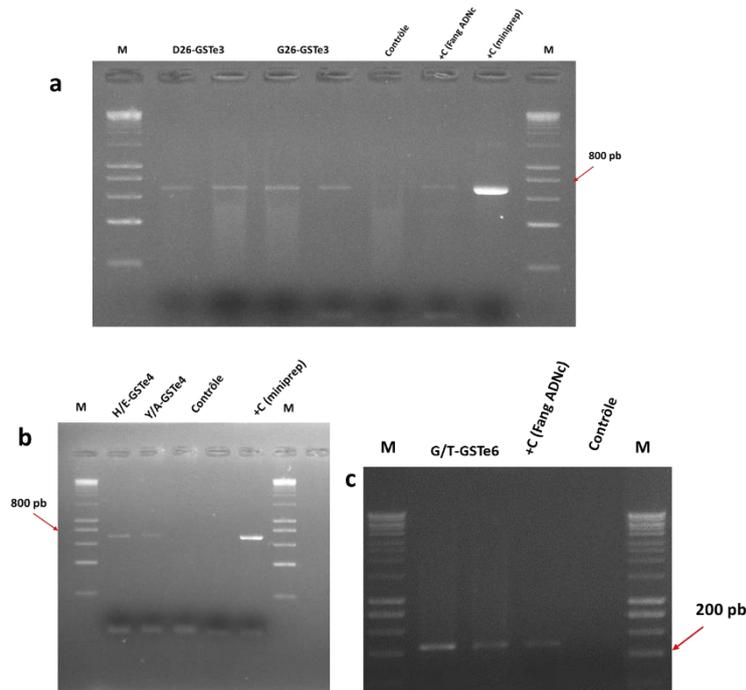
**Figure 53** : Profil de susceptibilité des moustiques aux insecticides après réduction de l'expression des GSTes par la technique de l'ARN interférence.

a) exposition à la perméthrine 0,75 % pendant 1 h ; b) exposition à la deltaméthrine 0,05 % pendant 1 h ; c) exposition au DDT 4 % pendant 1 h. Test de signification : \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , et \*\*\* =  $P < 0,001$ .

### **III.2.1.2.2. Effet de l'expression transgénique des GSTes chez *D. melanogaster* sur la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes**

#### **III.2.1.2.2.1. Validation de l'effectivité de l'expression des GSTes chez les drosophiles transgéniques**

Après le succès du clonage des allèles des GSTes dans le vecteur d'expression de la drosophile, les colonies positives sélectionnées avec une taille de 10 000 paires de base ont été utilisées pour synthétiser les midipreps qui ont par la suite été injecté aux drosophiles après le séquençage par la méthode de SANGER dans le but de confirmer l'effectivité du clonage. Pour se rassurer que les drosophiles transgéniques obtenues exprimaient les GSTes, une PCR semi-quantitative a été réalisée à partir de l'ADN complémentaire extrait de chaque groupe de drosophile. A l'issue de la PCR, nous avons obtenu des bandes positives pour les drosophiles transgéniques et aucune bande n'a été obtenue pour les drosophiles contrôles n'exprimant pas de GSTes. De ces observations, il ressort que les drosophiles transgéniques D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4 et Y/A-GSTe4 et G/T-GSTe6 expriment respectivement les Protéines GSTe3, GSTe4 et GSTe6 comparé aux drosophiles contrôles où nous avons aucune bande sur l'électrophorogramme (Figure 54).



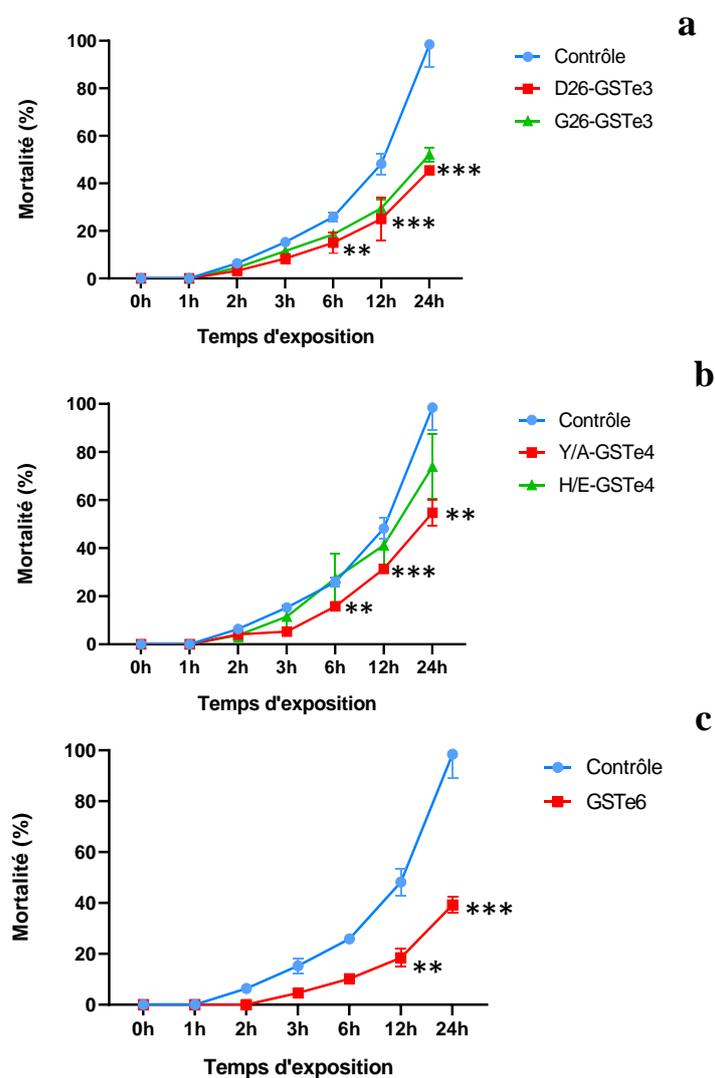
**Figure 54** : Confirmation de la surexpression des GSTes chez les drosophiles transgéniques par la PCR semi-quantitative.

a) Drosophiles transgéniques exprimant GSTe3 ; b) drosophiles transgéniques exprimant GSTe4 ; c) drosophiles transgéniques exprimant GSTe6. (*Contrôle*= drosophiles ayant reçu le vecteur d'expression *pUAS* ne possédant aucun gène ; le *contrôle positif (+C)* est constitué du plasmide recombinant constitué du vecteur d'expression *pUAS* sur lequel a été ligué les GSTes d'intérêts ainsi que de l'ADN complémentaire des moustiques de laboratoire FANG amplifié avec les amorces des GSTes respectifs ; marqueur de poids moléculaire (M) ladder 1kb).

### III.2.1.2.2.2. Impact de la surexpression des GSTes sur la résistance au DDT

Pour déterminer si la surexpression des GSTes peut conférer une résistance aux insecticides indépendamment des autres gènes de détoxification de l'organisme, les drosophiles transgéniques exprimant les allèles de *GSTe3*, *GSTe4* et *GSTe6* ont été générées à l'aide du système GAL4/UAS et exposées aux insecticides. Pour l'expression transgénique de ces gènes chez la drosophile, le système Actin5C a été utilisé, permettant ainsi une expression des GSTes dans l'ensemble de leur organisme ce qui a donc permis de mieux apprécier l'impact de cette surexpression sur la résistance aux insecticides. De l'exposition de ses drosophiles aux DDT, il a été observé que les drosophiles exprimant les GSTes survivent plus à l'exposition au DDT que les contrôles n'exprimant les GSTes d'*An. funestus* (Figure 55). En effet, les taux de mortalité significativement plus faibles ont été obtenus avec les drosophiles transgéniques exprimant les allèles D26-GSTe3 ( $45,46 \pm 1,56$  % ;  $P < 0,001$ ), G26-GSTe3 ( $52,09 \pm 3,18$  % ;  $P < 0,001$ ), Y/A-GSTe4 ( $54,74 \pm 5,53$  % ;  $P < 0,001$ ) et H/E-GSTe4 ( $73,24 \pm 1,34$  % ;  $P < 0,01$ ) et GSTe6 ( $39,24 \pm 3,11$  % ;  $P < 0,001$ ) comparé au groupe contrôle ( $98,45 \pm 9,37$ %). Cependant,

une différence significative a été observée en comparant la mortalité des drosophiles transgéniques ayant l'allèle muté Y/A-GSTe4 ( $P < 0,01$ ) présent au Cameroun, au Benin et en Ouganda comparé à la mortalité des drosophiles transgéniques ayant l'allèle H/E-GSTe4 présent au Malawi, suggérant que la variation allélique Y/A-GSTe4 confère une plus grande résistance au DDT. Aucune différence significative n'a été observée entre les allèles D26-GSTe3 et G26-GSTe3. De manière générale, il ressort de ces observations que la surexpression de GSTe3, GSTe4 et GSTe6 augmenterait la résistance au DDT chez les drosophiles et par conséquent, la surexpression de ces gènes serait impliquée dans la résistance au DDT chez *An. funestus*.

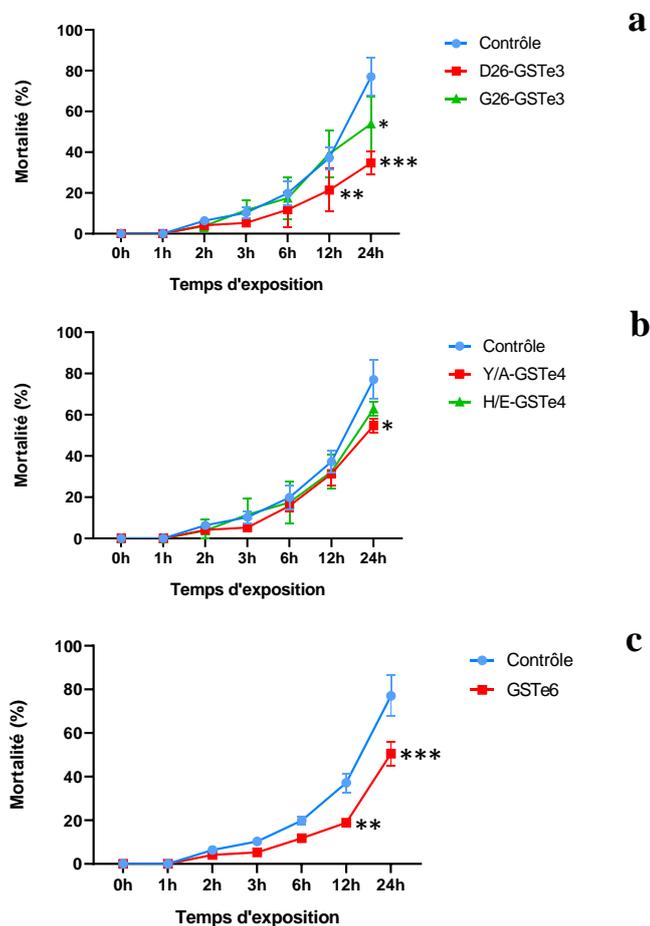


**Figure 55** : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles au DDT.

a) Drosophiles exprimant les *GSTe3* d'*An. funestus*, b) drosophiles exprimant les *GSTe4* d'*An. funestus*, c) drosophiles exprimant les *GSTe6* d'*An. funestus*. (Test de signification : \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , et \*\*\* =  $P < 0,001$ ,  $n=5$  réplicas de 20 drosophiles).

### III.2.1.2.2.3. Impact de la surexpression des GSTes sur la résistance à la perméthrine

De l'exposition des drosophiles transgéniques à la perméthrine, les taux de mortalité significativement plus faibles ont été obtenus avec les drosophiles transgéniques exprimant les allèles D26-GSTe3 ( $34,74 \pm 3,11$  % ;  $P < 0,001$ ), G26-GSTe3 ( $53,85 \pm 3,98$  % ;  $P < 0,05$ ), Y/A-GSTe4 ( $54,70 \pm 3,70$  % ;  $P < 0,05$ ) ; H/E-GSTe4 ( $62,85 \pm 3,47$  % ;  $P > 0,05$ ) et GSTe6 ( $50,53 \pm 3,04$  % ;  $P < 0,001$ ) comparé au contrôle ( $77,00 \pm 3,04$ %) après 24 h (Figure 56). Cependant une réduction significative de la mortalité a été observée chez les drosophiles transgéniques exprimant les protéines mutées D26-GSTe3 ( $P < 0,01$ ), Y/A-GSTe4 ( $P < 0,05$ ) comparé aux drosophiles transgéniques possédant les allèles D26-GSTe3 et H/E -GSTe4, suggérant que la présence des variations alléliques G26D-GSTe3 et Y/A-GSTe4 donnerait une plus grande capacité aux drosophiles de survivre en présence de la perméthrine.

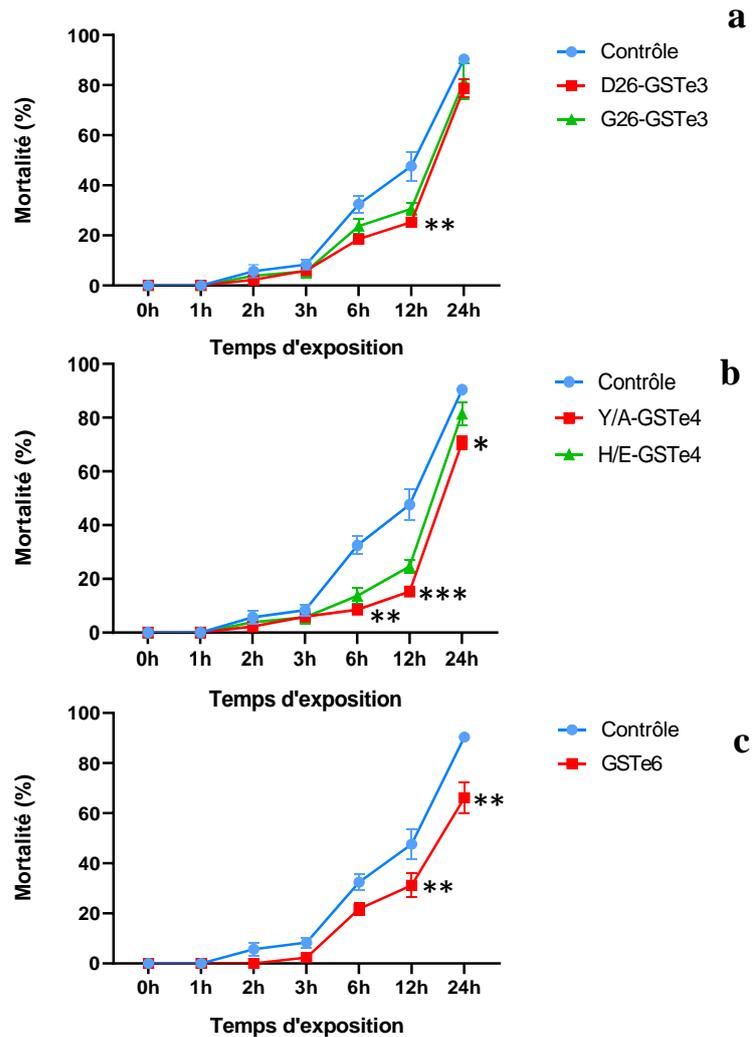


**Figure 56** : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles à la perméthrine.

a) Drosophiles exprimant les *GSTe3* d'*An. funestus*, b) drosophiles exprimant les *GSTe4* d'*An. funestus*, c) drosophiles exprimant les *GSTe6* d'*An. funestus*. (Test de signification : \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , et \*\*\* =  $P < 0,001$ ,  $n=5$  réplicats de 20 drosophiles).

#### **III.2.1.2.2.4. Impact de la surexpression des GSTes sur la résistance à la deltaméthrine**

A la suite de l'exposition des drosophiles transgéniques à la deltaméthrine, il a été observé un niveau de résistance moins élevé de manière générale comparé à l'exposition de ces drosophiles à la perméthrine et au DDT. En effet, après 24 h de contact entre les drosophiles transgéniques exprimant les GSTes et la deltaméthrine, une différence de mortalité significativement plus faible a été obtenue pour les drosophiles transgéniques Y/A-GSTe4 ( $70,72 \pm 2,35$  % ;  $P < 0,05$ ) et GSTe6 ( $66,16 \pm 6,33$  % ;  $P < 0,001$ ) comparé au contrôle n'exprimant pas de GSTes ( $90,41 \pm 1,69$  %) (Figure 57). Ces observations mettent clairement en exergue le fait que la surexpression des GSTe6 et de l'allèle muté Y/A-GSTe4 confèrent la résistance à la deltaméthrine. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la surexpression des allèles D26-GSTe3 ( $78,72 \pm 3,40$  % ;  $p > 0,05$ ), G26-GSTe3 ( $81,48 \pm 7,15$  % ;  $p > 0,05$ ) et H/E-GSTe4 ( $84,48 \pm 4,20$  % ;  $P < 0,05$ ) et la capacité de ces drosophiles à survivre à 24 h d'exposition à la deltaméthrine. Néanmoins, une différence significative a été observée après 12 h exposition entre les drosophiles exprimant D26-GSTe3 ( $25,30 \pm 1,80$  % ;  $P < 0,01$ ), G26-GSTe3 ( $30,59 \pm 2,41$  % ;  $P < 0,01$ ) et Y/A-GSTe4 ( $24,59 \pm 2,41$  % ;  $P < 0,001$ ) et le contrôle ( $47,59 \pm 5,84$  %) révélant ainsi que la surexpression de ces GSTes serait impliquée dans la résistance à la deltaméthrine à un temps d'exposition réduit.



**Figure 57** : Effet de l'expression transgénique des GSTes sur le profil de résistance des drosophiles à la deltaméthrine.

a) Drosophiles exprimant les *GSTe3* d'*An. funestus*, b) drosophiles exprimant les *GSTe4* d'*An. funestus*, c) Drosophiles exprimant les *GSTe6* d'*An. funestus*. (Test de signification : \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , et \*\*\* =  $P < 0,001$ , n=5 réplicats de 20 drosophiles).

### III.2.1.2.2. Confirmation fonctionnelle de la capacité des GSTes à conférer la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes en utilisant les protéines recombinantes de GSTes chez *E. coli*

#### III.2.1.2.2.1. Activité de conjugaison du CNDB par les protéines synthétisées

Les activités globales des protéines de GSTes synthétisées ont été évaluées par la mesure spectrophotométrique de la conjugaison d'un substrat de référence, le CNDB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), en présence du glutathion réduit (GSH) (Habig *et al.*, 1974). Les résultats ont révélé que toutes les protéines de GSTes synthétisées ont la capacité de transformer le CNDB en glutathionyl-2,4-dinitrobenzène facilement excrétable par l'organisme (Tableau

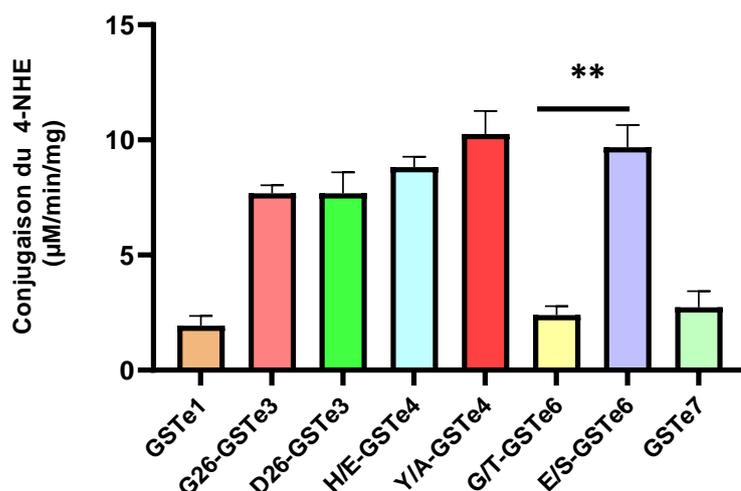
XIX). Une plus grande activité enzymatique a été observée avec les allèles D26-GSTe3 (23,35  $\mu\text{M/ml/min}$ ), G26-GSTe3 (21,35  $\mu\text{M/ml/min}$ ), Y/A-GSTe4 (18,57  $\mu\text{M/ml/min}$ ) et H/E-GSTe4 (14,01  $\mu\text{M/ml/min}$ ) comparé aux allèles E/S-GSTe6 (10,59  $\mu\text{M/ml/min}$ ) et G/T-GSTe6 (6,72  $\mu\text{M/ml/min}$ ).

**Tableau XIX** : Activité de conjugaison du CNDB par les GSTes synthétisées

Allèles de GSTes	Activité CNDB ( $\mu\text{M/ml/min}$ )
GSTe1	1,923
D26-GSTe3	23,357
G26-GSTe3	21,352
Y/A-GSTe4	18,0571
H/E-GSTe4	14,0141
E/S-GSTe6	10,596
G/T-GSTe6	6,722
GSTe7	2,962

#### III.2.1.2.2.2. Activité de conjugaison du 4-NHE par les protéines synthétisées

Toutes les protéines de GSTes synthétisées possèdent également une activité de conjugaison du glutathion sur l'aldéhyde 4-HNE en lipide alcool dihydroxynonène facilement excréable. D'après les résultats obtenus (Figure 58), l'activité de conjugaison du 4-NHE a été classée par ordre d'importance tel que suit : Y/A-GSTe4 (10,25 $\mu\text{M/min/mg}$ ), E/S-GSTe6 (9,68 $\mu\text{M/min/mg}$ ), H/E-GSTe4 (8,82  $\mu\text{M/min/mg}$ ), D26-GSTe3 (7,68  $\mu\text{M/min/mg}$ ), G26-GSTe3 (5,25  $\mu\text{M/min/mg}$ ), GSTe7 (2,73  $\mu\text{M/min/mg}$ ), G/T-GSTe6 (2,39  $\mu\text{M/min/mg}$ ) et GSTe1 (1,93  $\mu\text{M/min/mg}$ ). A l'exception de GSTe6 où nous avons obtenu une plus grande activité enzymatique avec l'allèle muté E/S-GSTe6 comparé à l'allèle G/T-GSTe6, il a été constaté que la présence des mutations n'affecte pas l'habileté des protéines de GSTes synthétisées à conjuguer le 4-hydroxynonénal.



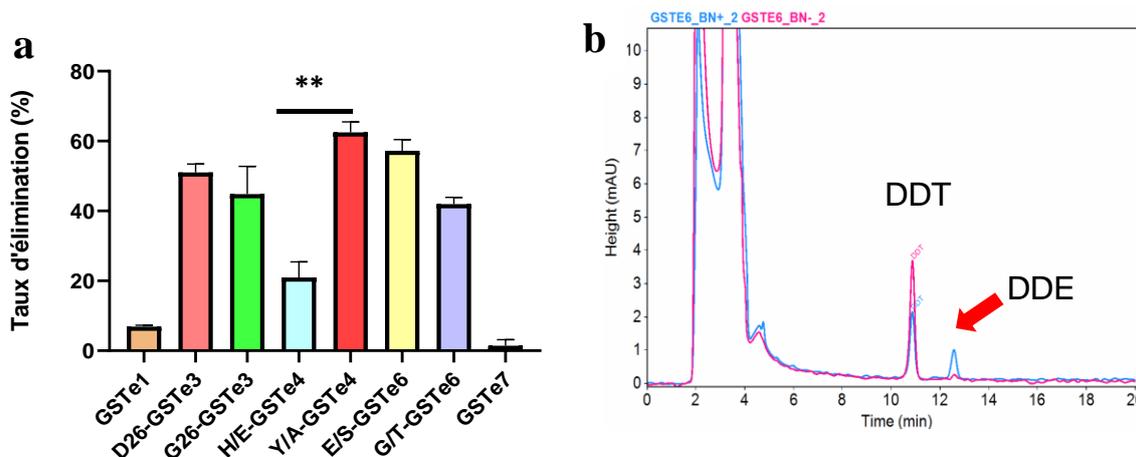
**Figure 58 :** Activité de conjugaison du 4-hydroxynonanal par les GSTes synthétisées.

### III.2.1.2.2.3. Activités métaboliques des protéines recombinantes des allèles de GSTes

#### III.2.1.2.2.3.1 Activité métabolique des GSTes synthétisées sur le DDT

L'évaluation de l'activité métabolique du DDT par les protéines recombinantes GSTe1, GSTe3, GSTe4, GSTe6 et GSTe7 synthétisées, a révélé que toutes les protéines synthétisées ont la capacité d'éliminer le DDT après 1 h d'exposition en présence du glutathion réduit comme cofacteur (Figure 59 a). En comparant la capacité d'éliminer le DDT entre l'allèle muté D26-GSTe3 ( $51,06 \pm 2,3 \%$ ) présent au Cameroun et au Benin et l'allèle non muté G26-GSTe3 ( $44,89 \pm 7,9 \%$ ) présente au Malawi nous avons observé qu'il n'existe pas une différence significative entre les deux allèles. Ceci suggère que la mutation de la glycine par l'aspartate en position 26 ne confère pas une plus grande capacité au GSTe3 de métaboliser le DDT. Pour ce qui est de GSTe4, il a été observé de manière significative une plus grande élimination du DDT dans le milieu réactionnel par l'allèle mutée Y/A-GSTe4 ( $62,48 \pm 3,0 \%$ ) comparé à celle de l'allèle H/E-GSTe4 ( $20,99 \pm 4,4 \%$ ) avec une p-value de 0,0015. Ce qui signifie que la mutation de tyrosine par la thréonine en position 181 et/ou la mutation du glutamate par l'alanine en position 189 chez GSTe4 pourrait augmenter l'activité métabolique de ce gène vis-à-vis du DDT chez *An.funestus*. Concernant l'activité métabolique du DDT par les GSTe6 il a été observé que ce gène a été capable de catalyser la déhydrochlorination du DDT en son métabolite secondaire DDE en utilisant le GSH comme cofacteur. Le chromatographe nous montre une diminution du DDT avec une formation du DDE dans le milieu réactionnel par l'allèle E/S- GSTe6 comparé aux témoins où l'enzyme était absent (Figure 59b). De ces résultats, nous pouvons dire que le GSTe6 métabolise le DDT cependant ; il n'existe pas une différence

significative entre l'activité métabolique des allèles E/S-GSTe6 ( $57,24 \pm 3,1$ ) et G/T-GSTe6 ( $41,96 \pm 1,9$  %).



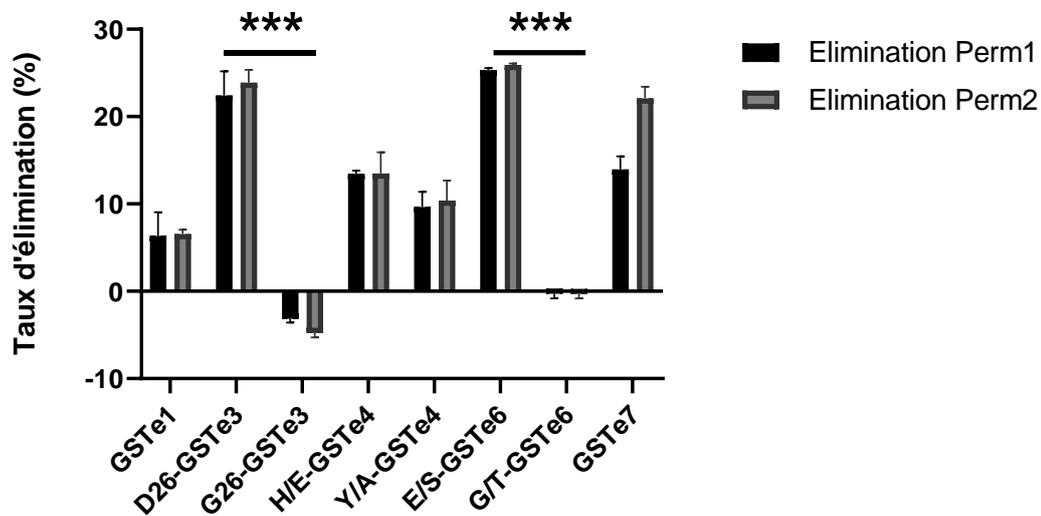
**Figure 59** : Activité métabolique du DDT par les GSTes.

a) Taux d'élimination du DDT après une 1h d'exposition ; (b) chromatogramme du métabolisme du DDT en DDE par GSTe6 par la technique de HPLC.

### III.2.1.2.2.3.2. Activité métabolique de la perméthrine par les GSTes synthétisées

Les protéines synthétisées ont été incubées avec la perméthrine en présence du glutathion réduit dans le but d'évaluer leurs activités métaboliques (Figure 60). Il a été observé une élimination de la perméthrine dans le milieu réactionnel après une heure d'exposition par toutes les protéines testées à l'exception des protéines G26-GSTe3 et G/T-GSTe6 pour lesquels des pourcentages d'élimination négatif ont été enregistrés. De même, il a été observé un pourcentage d'élimination significativement élevé avec les allèles D26-GSTe3 ( $23,89 \pm 1,44$  %) et E/S-GSTe6 ( $25,93 \pm 0,16$  %) comparé aux allèles G26-GSTe3 ( $-4,78 \pm 0,49$  %) et G/T-GSTe6 ( $-0,30 \pm 0,50$  %), suggérant ainsi que la mutation de la glycine par l'aspartate en position 26 chez GSTe3 et la mutation de la serine par la thréonine en position 201 et/ou de la glycine par le glutamate en position 210 chez GSTe6 augmentent respectivement l'habilité de GSTe3 et de GSTe6 à métaboliser la perméthrine. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans l'habilité des allèles Y/A-GSTe4 ( $13,48 \pm 2,43$  %) et H/E-GSTe4 ( $10,38 \pm 2,30$  %) à métaboliser la perméthrine prouvant que ces deux mutations n'augmentent pas l'habilité des allèles de GSTe4 à éliminer la perméthrine en présence du glutathion réduit. De même, il a été observé que les protéines recombinantes de GSTe1 et GSTe7 auraient la capacité d'éliminer la perméthrine dans le milieu réactionnel après une heure d'exposition avec comme pourcentage d'élimination respectifs de  $6,55 \pm 0,47$  % et  $22,07 \pm 1,33$  %. De manière générale, aucune différence significative n'a été observée dans l'habilité des protéines testées à éliminer

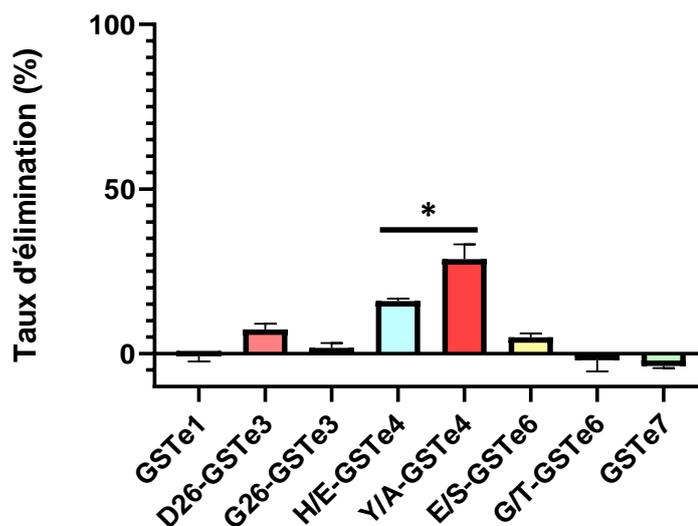
les deux formes de perméthrine à savoir la perméthrine 1 et la perméthrine 2 telle que le montre la figure ci-contre.



**Figure 60 :** Taux d'élimination du DDT par les GSTes synthétisées après une 1h d'exposition.

### III.2.1.2.2.3.3. Activité métabolique de la deltaméthrine par les GSTes synthétisées

L'évaluation de l'activité métabolique des GSTes synthétisées a permis de mettre en évidence leur habileté à éliminer la deltaméthrine. Il a été constaté une faible activité métabolique avec la deltaméthrine comparé au DDT et à la perméthrine (Figure 61). L'évaluation de l'activité métabolique des allèles de GSTe4 synthétisés a montré que la protéine Y/A-GSTe4 possède plus d'habileté à éliminer la deltaméthrine par rapport à la protéine Y/A-GSTe4 avec comme pourcentage d'élimination respectif de  $28,75 \pm 4,42 \%$  et  $15,99 \pm 0,76 \%$  pour les deux allèles. Les protéines D26-GSTe3 ( $7,39 \pm 1,68 \%$ ), G26-GSTe3 ( $1,79 \pm 1,42 \%$ ) et E/S-GSTe6 ( $5,002 \pm 1,14 \%$ ) éliminent la deltaméthrine de manière très modérée. Cependant aucune élimination de la deltaméthrine n'a été observée avec les protéines GSTe1, G/T-GSTe6 et GSTe7 pour lesquels les pourcentages d'élimination de  $-0,79 \pm 1,58 \%$  ;  $-1,95 \pm 3,3 \%$  et  $-3,69 \pm 0,62 \%$  ont été respectivement obtenus.



**Figure 61** : Taux d'élimination de la deltaméthrine par les GSTes synthétisées après une 1h d'exposition.

### III.2.2. Discussion partielle 2

La caractérisation structurale de *GSTe3*, *GSTe4*, et *GSTe6* ainsi que la prédiction de l'affinité entre la présence des mutations sélectionnées et l'habilité du moustique à métaboliser l'insecticide ont permis de mettre en évidence les acides aminés du site actif de chaque enzyme et de prédire l'impact des mutations observées sur la résistance au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine. Une étude similaire avait démontré que la mutation de la leucine par la phénylalanine en position 119 de *GSTe2* d'*An. funestus* augmentait l'efficacité catalytique de cet enzyme à métaboliser le DDT en augmentant la cavité du site actif, ce qui favorisait une meilleure pénétration du DDT (Riveron *et al.*, 2014). De même, Chiu et collaborateur avaient montré que le cytochrome *CYP6Z1* d'*An. gambiae* par sa structure avait la capacité de métaboliser le DDT et les pyréthriinoïdes (Chiu *et al.*, 2008). De manière générale, une affinité plus élevée a été observée avec le DDT comparé aux pyrethriinoïdes. De même, il a été constaté que la présence des variations alléliques D26-GSTe3, Y/A-GSTe4 et E/S-GSTe6 augmente la taille de la cavité de fixation du substrat de ces enzymes ainsi que leurs affinités avec la perméthrine, le DDT et la deltaméthrine. Cette corrélation entre l'augmentation de la cavité du site actif de l'enzyme et l'affinité cofacteur-ligand peut s'expliquer par le fait que lorsque la cavité est plus large, cela peut favoriser une meilleure pénétration du ligand dans le site de fixation et par conséquent une meilleure métabolisation de ce dernier. Ces résultats corroborent ceux des études précédentes ayant démontré que chez *An. funestus*, les variations alléliques impactent la résistance aux pyréthriinoïdes pour les cytochromes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (Ibrahim *et al.*, 2015), le cytochrome *CYP325A* (Wamba *et al.*, 2021) ; ainsi que de la résistance

croisée aux pyréthriinoïdes et au bendiocarbe pour les cytochromes *CYP6AA1* (Ibrahim *et al.*, 2018) et *CYP6Z1* (Ibrahim *et al.*, 2016). De même, la validation fonctionnelle du rôle de la surexpression des cytochromes P450 sur la résistance d'*Aedes quinquefasciatus* aux insecticides à l'aide de la technique d'arrimage moléculaire a montré une affinité entre les structures 3D des cytochromes *CYP9M10*, *CYP6BZ2*, *CYP9J35* et la résistance de ce vecteur à la perméthrine (Yang *et al.*, 2021).

En vue d'évaluer le rôle que joue les GSTes dans la résistance globale d'*An. funestus* aux insecticides à côté de l'intervention des autres gènes de détoxification et des autres mécanismes de résistance qu'il peut développer pour survivre en présence des insecticides, la technique de l'ARN interférence a été utilisée dans la présente étude. Ceci a permis de soustraire le rôle que peut jouer les GSTes lors de l'exposition aux insecticides et d'évaluer l'impact de leur sous-expression sur la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes. De cette expérience, il a été observé une restauration significative de la sensibilité lorsque le niveau d'expression de *GSTe2*, *3*, *4*, *5* et *GSTe6* est réduit affirmant ainsi que la surexpression de ces derniers accroît la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus*. Cette observation est en accord avec les résultats de Lumjuan en 2011, où ils ont prouvé que la réduction partielle de l'expression de *GSTe2* et *GSTe7* chez *An. gambiae* augmente significativement la sensibilité au DDT et à la deltaméthrine (Lumjuan *et al.*, 2011). Cependant, une restauration de la sensibilité plus faible a été obtenue avec l'exposition des moustiques injectés à la deltaméthrine comparé à ceux exposés au DDT et à la perméthrine montrant ainsi que les GSTes sont plus impliquées dans la résistance aux DDT et à la perméthrine. De même, après le « knockdown » des GSTes et l'exposition aux insecticides, un taux de mortalité de 100% n'a été obtenu pour aucun insecticide. Ceci confirme le résultat de l'ARNseq et montre que la surexpression des GSTes n'est pas la seule cause de résistance aux insecticides observée chez *An. funestus* car la surexpression de plusieurs autres familles de gènes sont impliquées (cytochrome P450, Carboxylesterase, GSTd, etc) ainsi que le développement des autres mécanismes de résistance. Ces observations corroborent ceux des études antérieures effectuées chez *A. funestus* qui ont montré que plusieurs gènes sont impliqués dans la résistance aux insecticides tels que les cytochromes *CYP325a* (Wamba *et al.*, 2021), *CYP9K1* (Hearn *et al.*, 2021), *CYP6P9a/b* (Wondji *et al.*, 2009), les carboxylestérases (Weedall *et al.*, 2019) et les protéines D7 des glandes salivaires (Elanga-Ndille *et al.*, 2019a).

Dans l'optique de déterminer si la surexpression des GSTes pourrait conférer la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes de type I et II, les drosophiles transgéniques possédant les allèles D26-GSTe3, G26-GSTe3, H/E-GSTe4, Y/A-GSTe4 et *GSTe6* ont été générées à

l'aide du système GAL4/UAS. L'exposition de ces drosophiles transgéniques aux insecticides indique que la surexpression des GSTes seule, indépendamment des autres gènes de détoxification l'organisme et la présence des variations alléliques sont suffisantes pour conférer une résistance au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine. Ceci pourrait être dû au fait que la présence de ces mutations modifie la structure des GSTes en augmentant la taille de la cavité de fixation du substrat, permettant ainsi une meilleure fixation de l'insecticide. Une telle approche d'expression transgénique a également été utilisée avec succès pour confirmer que la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 et la surexpression du cytochrome *CYP9J11* confèrent la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT chez *An. funestus* (Riveron *et al.*, 2017), tout comme la surexpression des cytochromes *CYP6P9a* et *b* (Riveron *et al.*, 2013). De même une étude très récente en utilisant les drosophiles transgéniques exprimant les cytochromes *6BQ23* et l'allèle de résistance L1014F-kdr (*knockdown resistance*) a permis de tester l'efficacité des nouvelles formulations d'insecticides Fludora® Fusion (composée de deltaméthrine et de chlothianidine) et de KOthrine® (composée uniquement de deltaméthrine) (Luong *et al.*, 2021). Cette étude avait révélé que la formulation d'insecticides Fludora® est une potentielle solution pour la lutte anti-vectorielle car elle était plus efficace que celle ne contenant que la deltaméthrine donc la résistance est de plus à plus croissante. Ces études indiquent ainsi l'utilité et l'apport de cette technique pour la validation fonctionnelle de l'expression d'un gène sur la résistance aux insecticides.

L'activité enzymatique des protéines d'intérêt est un facteur très important pour valider le rôle de l'expression d'un gène ou de la présence des variations alléliques sur la résistance métabolique des Anophèles aux insecticides. Elle permet de déterminer si les protéines synthétisées sont actives et capables de métaboliser ou d'éliminer l'insecticide en présence du cofacteur. Toutes les protéines synthétisées ont montré une capacité à conjuguer le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) et du 4-hydroxynonanal (4-NHE) en présence du glutathion réduit (GSH), montrant ainsi que ces protéines synthétisées sont actives. Cette activité de conjugaison observée chez GSTes pourrait s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle la fonction biologique majeure des GSTs serait de protéger la cellule contre les produits de l'oxydation (Shou-Min, 2012). Ces Résultats sont similaires à ceux de Faizan et collaborateurs qui après avoir réalisé la caractérisation fonctionnelle du rôle des GST sur la tolérance du stress et la résistance au DDT chez *Phlebotomus argentipes* ont montré que les GSTs sigma (Parg-GST $\sigma$ ) sont capables de conjuguer les 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et le 4-hydroxynonanal respectivement en glutathionyl-2,4-dinitrobenzène et en dihydroxynonène facilement excrétable par l'organisme (Hassan *et al.*, 2019).

De même, les protéines recombinantes de GSTe1, GSTe3, GSTe4, GSTe6 et GSTe7 synthétisées ont été capable d'éliminer le DDT et la perméthrine en présence du glutathion réduit comme cofacteur. De manière générale, en ce qui concerne l'impact des variations alléliques sur la capacité des GSTes à métaboliser l'insecticide, un accroissement de l'activité métabolique est le plus souvent observé avec les allèles mutés. Ce qui vient confirmer que les mutations d'acides aminés des GSTes confèrent une plus grande habilité aux *An. funestus* de survivre en présence des insecticides. C'est par exemple le cas de l'allèle 119F-GSTe2, qui avait montré une plus grande activité métabolique du DDT et de la perméthrine comparé à l'allèle sensible L119-GSTe2 chez *An. funestus* (Riveron *et al.*, 2014). Un résultat similaire avait également été obtenu avec la variation allélique I114T-GSTe2 chez *An. gambiae*, en effet Mitchell et collaborateurs en comparant l'activité métabolique des allèles avaient montré que l'allèle muté I114T-GSTe2 avait une plus grande habilité à éliminer le DDT comparé à l'allèle sensible I114-GSTe2 (Mitchell *et al.*, 2014). L'habilité des GSTes d'*An. funestus* à éliminer directement la perméthrine est comparable à celle des GSTs des *Culex*. Une telle étude chez *Culex pipiens* a montré que le GSTD1 (CpGSTD1) était capable de métaboliser directement la perméthrine comme substrat (Huang *et al.*, 2012). Ces études confirment ainsi que la surexpression des GSTes et la présence des variations alléliques sur leurs chaînes latérales participent à la résistance de plus en plus observée chez les Anophèles vis-à-vis du DDT et des pyréthrinoïdes.

Cependant, tout comme dans le cas de la validation de l'effet de la surexpression des GSTes chez les drosophiles transgéniques et la résistance à la deltaméthrine, une activité très faible voir insignifiante a été obtenue pour l'activité métabolique de la deltaméthrine, confirmant que les GSTes ne confèreraient pas une résistance accrue à la deltaméthrine comme dans le cas du DDT. De même, aucune pose productive n'a été obtenue entre les allèles de GSTes modélisés et la deltaméthrine. Les résultats de l'activité métabolique des insecticides testés par les GSTes obtenus corroborent ceux de Riveron et collaborateur qui avaient montré que la surexpression de *GSTe2* et la présence des variations alléliques augmentent significativement la résistance au DDT et à la perméthrine contrairement à la deltaméthrine (Riveron *et al.*, 2014). Cette résistance croisée au DDT et aux pyréthrinoïdes est une préoccupation importante pour la lutte contre le paludisme car les GSTes pourraient protéger les moustiques contre les principaux insecticides utilisés en santé publique.

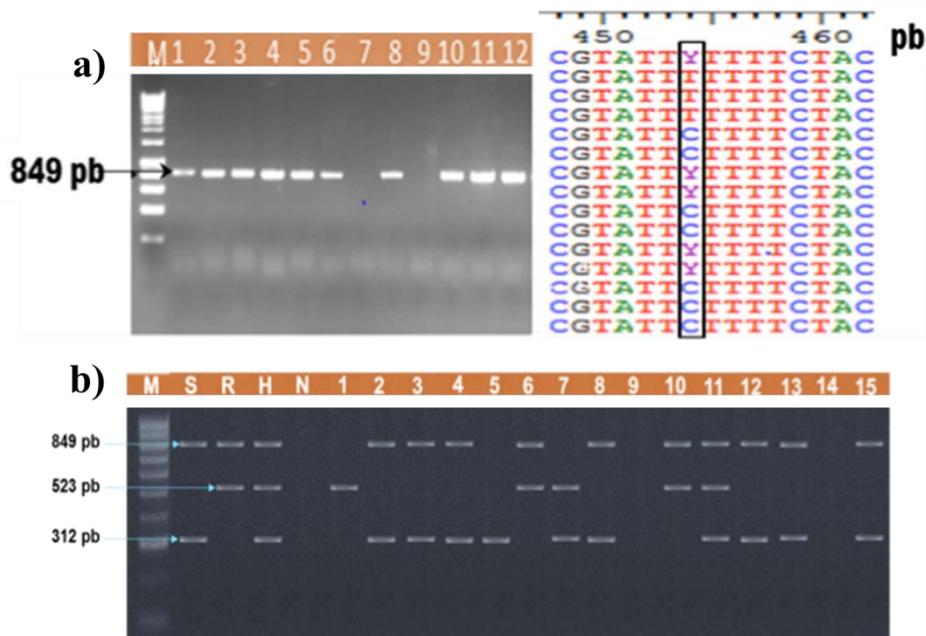
### **III.2.3. Conclusion partielle 2**

Il ressort de la caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* que la surexpression des GSTs epsilon conduit à la résistance aux insecticides de plus en plus observée chez les populations d'*An. funestus* à travers le continent africain. Il a été observé une association significative entre la présence des mutations D26G-GSTe3, H181Y-GSTe4, E189A-GSTe4, T201S-GSTe6 et G210E-GSTe6 et la résistance aux insecticides par modifications de la cavité de fixation de l'insecticide sur le GSTes en présence du glutathion réduit. Permettant ainsi, une meilleure élimination de l'insecticide par le moustique et par conséquent une aggravation du phénomène de résistance aux DDT et aux pyréthriinoïdes. Compte tenu du fait que la lutte anti-vectorielle est essentiellement basée sur l'utilisation de ces insecticides pour la pulvérisation intra-domiciliaires et l'imprégnation des MILDA, il était judicieux de rechercher l'impact de la présence de telles variations alléliques de GSTes sur ces principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique pour faire face à l'incidence du paludisme.

## **III. Impact de la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 d'*An. funestus* sur l'efficacité des principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique**

### **III.3.1. Résultats partiels 3**

Afin de déterminer davantage les bases moléculaires de la résistance aux insecticides, une portion de *GSTe2* couvrant la mutation L119F (L19F-GSTe2) associée à la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes a été génotypée chez les femelles hypersensibles et les femelles hyper résistantes collectées à *Mibellon* Cameroun après des expositions aux insecticides. Tous les génotypes ont été détectés avec succès par la technique récente de PCR Allèle spécifique conçue pour le génotypage d'une portion du gène *GSTe2* couvrant la mutation L119 (figure 62) (Tchouakui *et al.*, 2018).



**Figure 62 :** Présentation de la mutation L119F-GSTe2.

a) Amplification par PCR du gène GSTe2 chez *An. funestus* s.s. et un aperçu du polymorphisme du gène GSTe2 autour de la mutation ponctuelle L119F, où Y représente le génotype hétérozygote C/T ; b) Gel d'agarose de l'AS-PCR pour détecter la mutation L119F-GSTe2 chez *An. funestus* s.s : la bande à 849 pb est le fragment commun de tous les génotypes du gène GSTe2 ; la bande à 523 pb représente les moustiques résistants et celle à 312 pb représente les moustiques sensibles ; les moustiques hétérozygotes ont les deux bandes. (C : cytosine ; T : thymine M : marqueur de poids moléculaire ; S : homozygote sensible, R : homozygote résistant et H : hétérozygote ; N : contrôle négatif ; 1-15 : échantillons génotypés).

### III.3.1.1. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance aux insecticides utilisés pour les pulvérisations intra-domiciliaires

Le génotypage des moustiques morts et ceux survivants respectivement après 30 et 90 minutes d'exposition au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine a montré que la capacité de survie des moustiques homozygotes résistants après exposition aux insecticides était supérieure à celle des moustiques homozygotes sensibles pour tous les insecticides testés (Tableau XX).

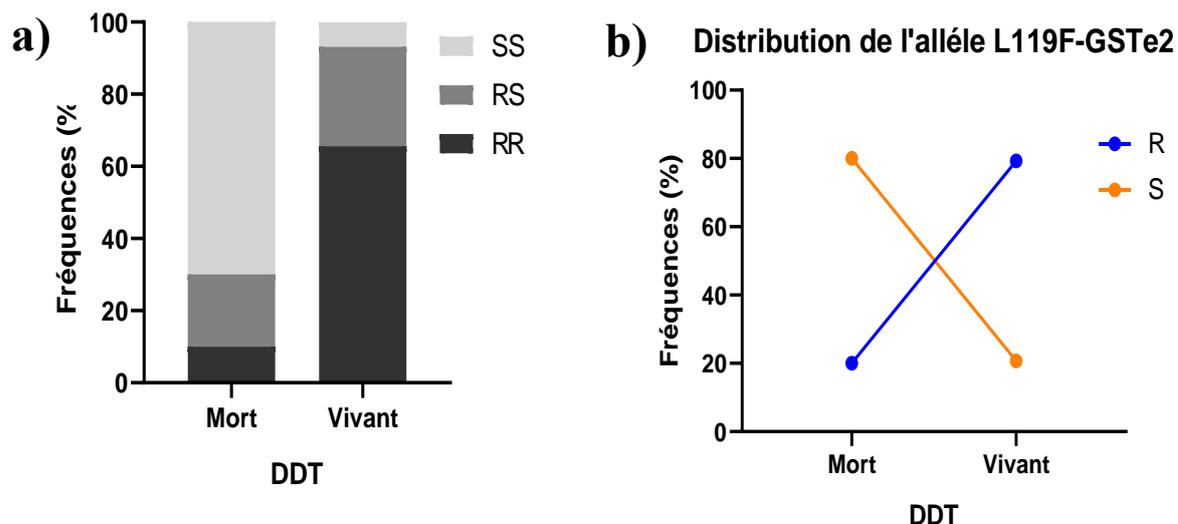
**Tableau XX** : Association entre la mutation L119F-GSTe2 et la résistance aux insecticides utilisés pour les pulvérisations intra-domiciliaires.

Génotypes/Allèles (L119F-Gste2)	Insecticides					
	DDT		Perméthrine		Deltaméthrine	
	RC	P	RC	p	RC	P
<b>RR vs SS</b>	66,5 (10,0- 441,86)	<b>&lt;0,0001<sup>s</sup></b>	4,8 (1,30-18,13)	<b>0,007<sup>s</sup></b>	4,60 (1,38-15,32)	<b>0,03<sup>s</sup></b>
<b>RR vs RS</b>	4,7 (0,94 - 23,8)	<b>0,05<sup>s</sup></b>	3,1 (0,85-11,29)	0,08	3,75 (0,94-14,82)	<b>0,05<sup>s</sup></b>
<b>RS vs SS</b>	14,0 (2,32-84,32)	<b>0,004<sup>s</sup></b>	1,56 (0,46-5,26)	0,47	1,22 (0,39-3,81)	0,72
<b>R vs S</b>	15,3	<b>1,6<sup>-17</sup> s</b>	2,99	0,00047	2,8	0,0016

(P= valeur de P ; s= différence significative ; RC= rapport de côte)

### III.3.1.1.1. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance au DDT

L'analyse de la corrélation entre les génotypes L119F et le DDT a révélé que les moustiques résistants homozygotes (RR) étaient significativement plus susceptibles de survivre à l'exposition à la deltaméthrine que les sensibles homozygotes (SS) (RC = 66,5 ; P < 0,0001) et les hétérozygotes (RS) (RC = 4,7 ; P < 0,05) (TableauXX). De même, une différence significative a été observée entre RS et SS (RC = 14,0 ; P < 0,004) (Figure 63a). En ce qui concerne la distribution de l'allèle résistant (R) et l'allèle sensible (S), il a été constaté que la fréquence de l'allèle résistant est plus élevée chez les moustiques vivants (80 %) que chez les moustiques les morts (20 %) tandis que la fréquence de l'allèle sensible est plus élevée chez les moustiques morts après l'exposition au DDT (79,3%) (RC = 14,0 ; P < 0,004) (Figure 63b).

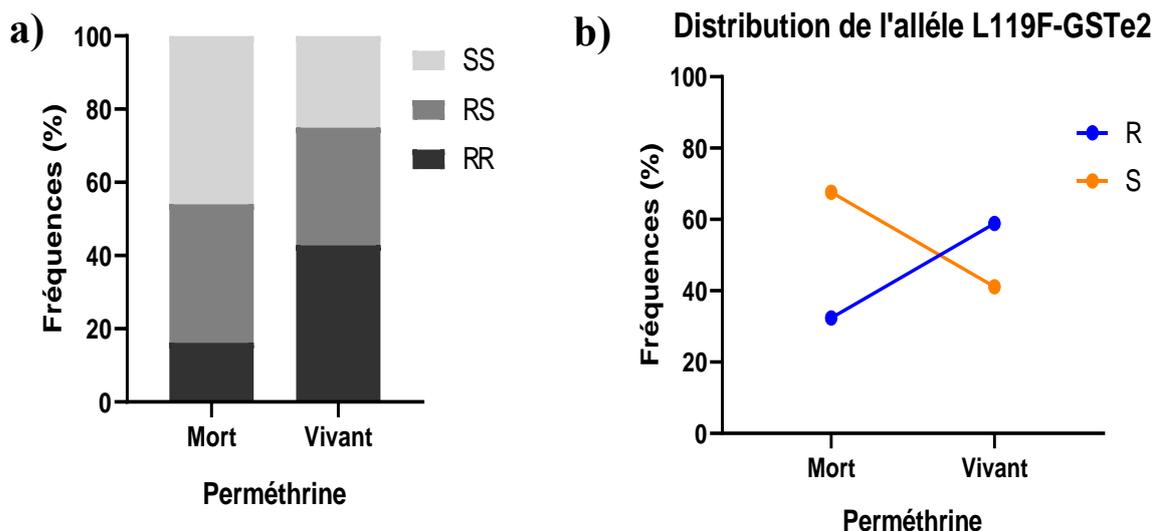


**Figure 63** : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance au DDT chez *An. funestus*.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et chez les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et les moustiques vivants.

### III.3.1.1.2. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance à la perméthrine

La recherche de l'association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance à la perméthrine a montré que les moustiques résistants homozygotes (RR) avaient une plus grande capacité à survivre à l'exposition à la perméthrine que les sensibles homozygotes (SS) (RC = 4,8 ;  $P < 0,007$ ). Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre la fréquence des moustiques hétérozygotes (RS) chez les morts (37 ;08 %) et les vivants (32,14 %) (Figure 64a). De même, il n'a pas été observé de différence significative entre les hétérozygotes (RS) et les homozygotes (RR) (RC = 3,1 ;  $P = 0,08$ ), tout comme entre RS et SS (RC = 1,56 ;  $P = 0,47$ ) (TableauXX). L'allèle résistant (R) a été significativement plus fréquent chez les individus survivants (RC = 3,1 ;  $P = 0,08$ ) comparés à ceux morts (S) après exposition à la perméthrine (RC = 2,99 ;  $P = 0,00047$ ) (Figure 64b).

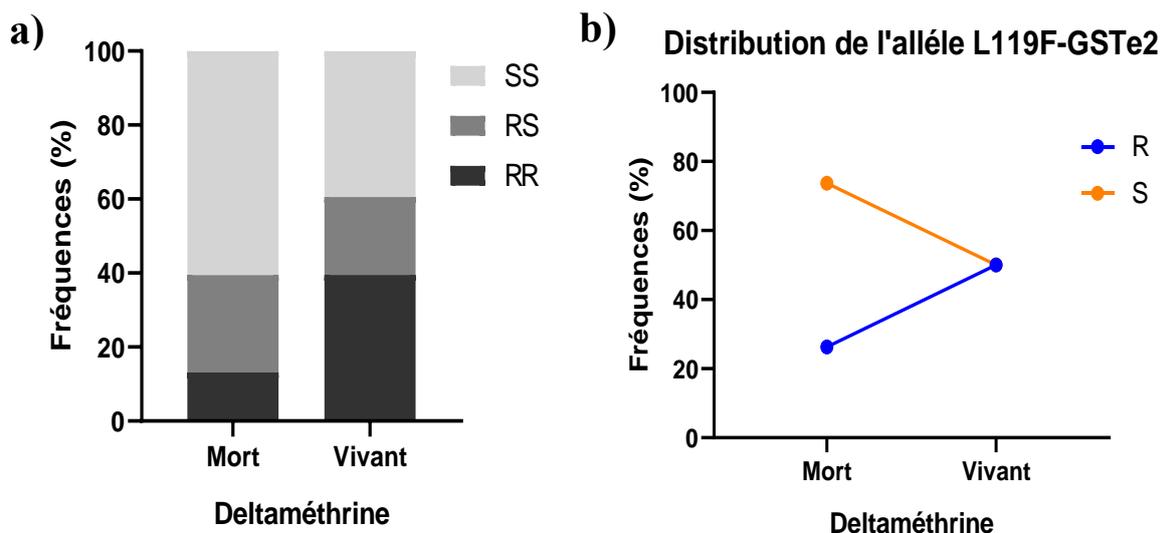


**Figure 64** : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance à la perméthrine chez *An. funestus*.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et chez les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et chez les moustiques vivants.

### III.3.1.1.3. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance à la deltaméthrine

De même, l'investigation de l'association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la résistance à la deltaméthrine chez *An. funestus* a révélé que les moustiques résistants homozygotes (RR) étaient significativement plus susceptibles de survivre à l'exposition à la deltaméthrine que les moustiques sensibles homozygotes (SS) (RC = 4,60 ;  $p = 0,03$ ) et les hétérozygotes (RS) (RC = 3,75 ;  $p < 0,05$ ) (TableauXX). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les RS et les SS (RC = 1,22 ;  $p = 0,72$ ) (Figure 65a). Pour ce qui est de la distribution de l'allèle résistant (R) et l'allèle sensible (S), il a été constaté une même fréquence (50 %) de ces allèles chez les moustiques vivants, tandis que l'allèle sensible est plus élevé chez les moustiques morts (67,6 %) après exposition à la deltaméthrine comparé aux moustiques résistants (26,3 %) (Figure 65b).



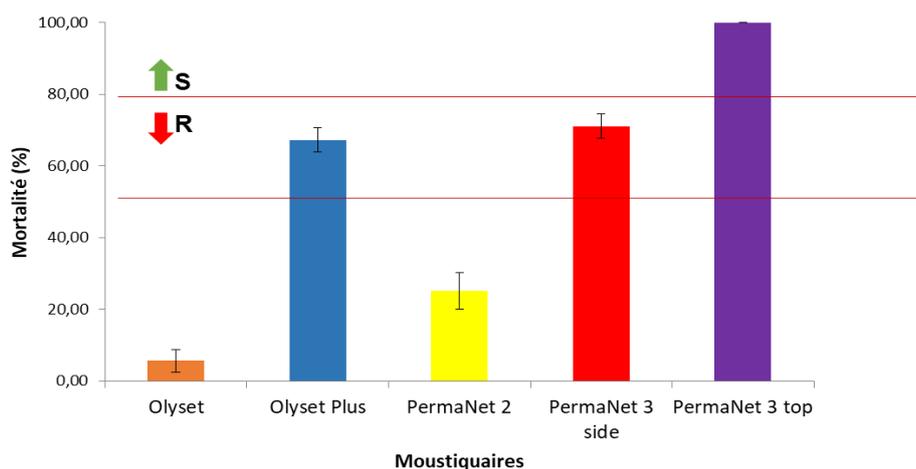
**Figure 65** : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la résistance à la deltaméthrine chez *An. funestus*.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et chez les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et chez les moustiques vivants.

### III.3.1.2. Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité des moustiquaires utilisées aux Cameroun

#### III.3.1.2.1. Résultat de l'exposition des moustiques aux différentes moustiquaires imprégnées utilisées au Cameroun

Le test d'efficacité a relevé une résistance d'*An. funestus* de Mibellon aux moustiquaires Olyset ( $5,63 \pm 1,33$  % de mortalité) et PermaNet 2.0 ( $25,06 \pm 5,06$  % de mortalité), imprégnées respectivement de deltaméthrine et de perméthrine (Figure 66). Par contre, une efficacité maximale a été obtenue avec la moustiquaire PermaNet 3 top qui contiennent le synergiste PBO sur la partie supérieure (100 % de mortalité). Cependant, une efficacité un peu réduite a été observée pour les moustiquaires PermaNet 3.0 ( $71,04 \pm 3,8$  %) et d'Olyset Plus ( $67,23 \pm 3,44$  %) comprenant le PBO sur la partie latérale. La souche sensible FANG a montré une sensibilité totale à toutes les moustiquaires testées. De manière générale, il ressort de ces observations que l'efficacité des moustiquaires est menacée par la résistance aux insecticides et que les MILDAs à PBO ont une plus grande efficacité.



**Figure 66 :** Test d'efficacité aux MILDA utilisées au Cameroun.

( $M < 50\%$  : Pas d'efficacité,  $50\% < M \leq 80\%$  : efficacité minimale ;  $M \geq 80\%$  : efficacité optimale).

L'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur la capacité d'*An. funestus* à survivre à l'exposition à diverses moustiquaires a été évalué en utilisant les moustiques hyper résistants et les moustiques hypersensibles issus des tests en cônes. Seuls quelques vivants ont été obtenus avec la moustiquaire Olyset et aucun moustique survivant pour la moustiquaire PermaNet 3 top, empêchant ainsi d'évaluer l'association entre la présence de cette mutation chez *An. funestus* et l'efficacité de ces moustiquaires. Par conséquent, la recherche de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité des moustiquaires a été réalisée pour les moustiquaires PermaNet 2.0, PermaNet 3.0, et Olyset Plus.

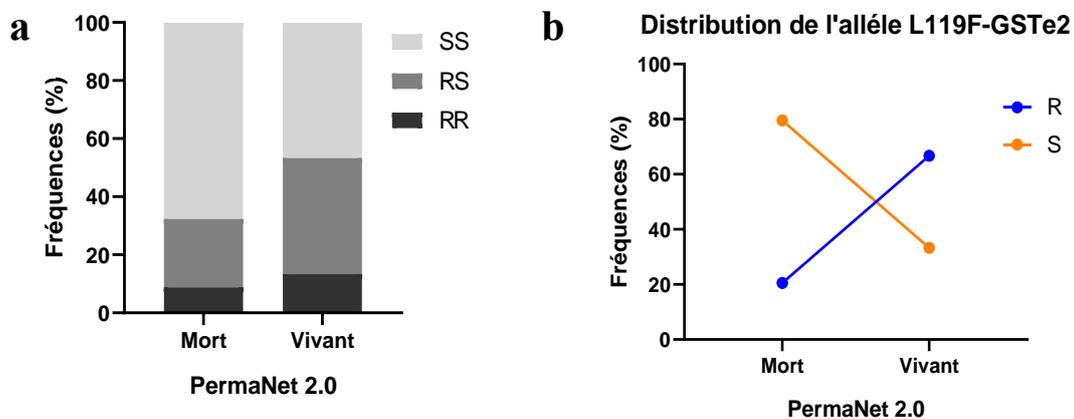
### III.3.1.2.2. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0

Une plus grande capacité à survivre en présence de la moustiquaire PermaNet 2.0 a été observée chez les moustiques homozygotes résistants (RR) comparés aux moustiques homozygotes sensibles (SS) ( $RC = 2,09$  ;  $p < 0,001$ ). De même, les moustiques hétérozygotes (RS) ont été plus susceptibles à survivre en présence de la moustiquaire PermaNet 2.0 par rapport aux moustiques homozygotes sensibles (SS) ( $RC = 2,3$  ;  $p < 0,001$ ) (Figure 67a). La fréquence de l'allèle sensible L119-GSTe2 a été plus élevée chez les morts (79,5 %) comparés aux vivants (33,3 %) tout comme la fréquence de l'allèle résistant 199F-GSTe2 a été plus élevée chez les moustiques vivants (67,6 %) comparés aux moustiques morts (20,5 %) (Figure 67b). De ces résultats, il ressort qu'il existe une corrélation entre les génotypes L119F et la réduction de l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0 (Tableau XXI).

**Tableau XXI :** Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0.

PermaNet 2.0	Mortalité		
	RC	PV	CI
RR v SS	2,09	0,002	3,8-234,0
RS v SS	2,3	0,0001	1,2-4,4
RR v RS	0,8	0,9	0,3-2,4
R v S	1,8	0,008	0,9-3,5

(Analyse Statistique avec vassarstat ; PV= valeur de P ; RC= rapport de côte)



**Figure 67 :** Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 2.0.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et chez les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et chez les moustiques vivants.

### III.3.1.2.3. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 3.0

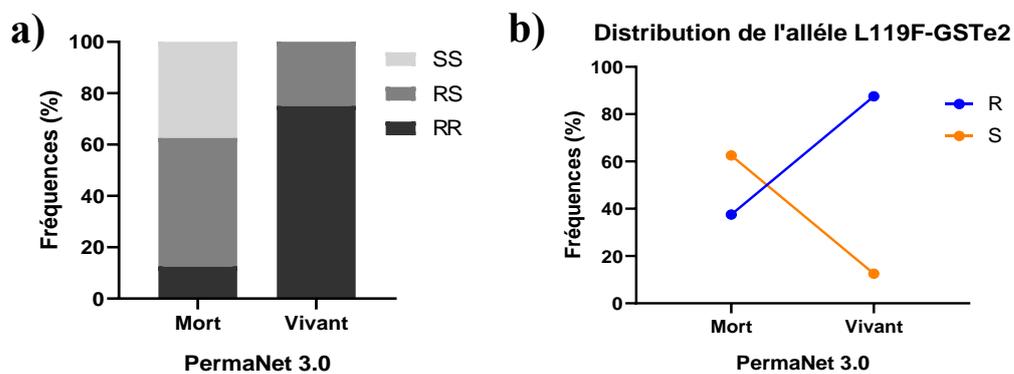
L'analyse de la corrélation entre la variation allélique L119F-GSTe2 et la capacité des moustiques à survivre en présence de la moustiquaire PermaNet 3.0 a révélé que les moustiques homozygotes résistants (RR) avaient beaucoup plus de chance de survivre à l'exposition que ceux homozygotes sensibles (SS) (RC = 30.1 ;  $P = 0.000001$ ) et hétérozygotes (RS) (RC= 12.3 ;  $P = 0,02$ ) (Figure 68). De même, l'allèle F119-GSTe2 est plus élevée chez les moustiques vivants (87,5%) contrairement aux moustiques morts où l'allèle F119-GSTe2 est plus élevée (62,5%). Cette analyse de la distribution des génotypes de la mutation L119F-GSTe2 entre les moustiques vivants et les moustiques morts après une exposition à la moustiquaire

PermaNet 3.0 montre une capacité de survie significativement accrue chez les moustiques résistants possédant l'allèle F119F-GSTe2 (R vs S :  $P = 0.0003$ ) (Tableau XXII, Figure 68b).

**Tableau XXII** : Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 3.0.

PermaNet 3.0		Mortalité		
		RC	PV	CI
	RR v SS	30,1	0,000001	0,8-5,3
	RS v SS	2,4	0,005	1,3-4,5
	RR v RS	12,3	0,002	1,5-98,6
	R v S	3,8	0,0003	1,8-7,7

(Analyse Statistique avec vassarstat ; PV= valeur de P ; RC= rapport de côte)



**Figure 68** : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire PermaNet 3.0.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et chez les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et chez les moustiques vivants.

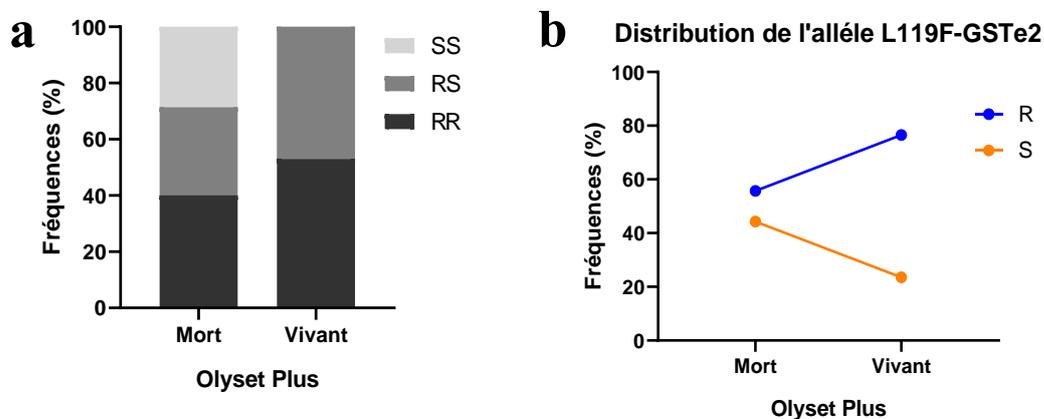
#### III.3.1.2.4. Association entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et l'efficacité de la moustiquaire Olyset Plus

Aucune association n'a été observée entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et capacité des moustiques à survivre au contact de la moustiquaire Olyset Plus, que ce soit au niveau allélique R vs S (RC = 1,04 ;  $p = 1.0$ ) ou génotypique pour RR vs SS (RC = 1,1 ;  $P=0,08$ ) (Figure 69 ; Tableau XXIII).

**Tableau XXIII** : Tableau de contingence de l'impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire Olyset Plus

Olyset Plus		Mortalité		
		RC	PV	CI
	RR v SS	1,1	0,8	0,4-2,7
	RS v SS	0,9	1,0	0,5-1,8
	RR v RS	1,1	0,8	0,4-2,7
	R v S	1,04	1,0	0,5-1,8

(Analyse Statistique avec vassarstat ; P= valeur de P ; RC= rapport de côte)



**Figure 69** : Impact de la présence de la mutation L119F-GSTe2 sur l'efficacité de la moustiquaire OlySet plus.

a) Fréquences alléliques comparatives chez les moustiques résistants et les moustiques sensibles ; b) Distribution des allèles chez les moustiques morts et chez les moustiques vivants.

### III.3.2. Discussion partielle 3

Les moustiquaires Olyset et PermaNet 2.0, couramment utilisées par le PNLN pour la prévention du paludisme au Cameroun ont présenté une très faible efficacité sur les moustiques de terrain utilisés dans notre étude à l'issue des tests en cônes. Cette perte d'efficacité des outils de lutte anti-vectorielle à base de pyréthrinoïdes a été reportée dans d'autres sites d'études au Cameroun et en Afrique (Riveron *et al.*, 2015; Riveron *et al.*, 2018; Wondji *et al.*, 2012). Cependant, les moustiquaires PermaNet 3.0 (Side et Top), et Olyset Plus tous à base de PBO ont montré une plus grande efficacité comparée aux moustiquaires PermaNet 2.0 et Olyset imprégnées uniquement de pyréthrinoïdes. Ce contraste d'efficacité significatif observé entre les moustiquaires imprégnées à base de pyréthrinoïdes uniquement et celles à base de pyréthrinoïdes + PBO serait dû au fait que le PBO bloque l'expression des cytochromes P450 lors de l'exposition en occupant le site de fixation de l'insecticide sur ces enzymes ; sachant les

cytochromes P450 interviennent dans la phase I de détoxification et sont les principaux enzymes intervenant dans le processus de résistance métabolique (Liu *et al.*, 2015). Ces résultats sont similaires à ceux des études antérieures ayant montré que la surexpression des cytochromes P450 notamment les gènes dupliqués *CYP6P9a* et *CYP6P9b* augmente la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus* et par conséquent réduit l'efficacité des moustiquaires (Weedall *et al.*, 2019).

Cette étude a investigué l'impact de la résistance métabolique induite par les GSTes sur l'efficacité des outils de lutte utilisés contre le paludisme en santé publique. La recherche de la corrélation entre la présence de la mutation L119F-GSTe2 et la réduction de l'efficacité des outils de lutte anti-vectorielle a révélé une association très forte entre la présence de cette mutation et la capacité d'*An. funestus* à survivre en présence des pyréthrinoïdes (perméthrine et deltaméthrine), du DDT et des moustiquaires PermaNet 3.0 et PermaNet 2.0. L'absence d'association observée avec Olyset Plus pourrait s'expliquer par le fait que pour cette moustiquaire, le PBO est incorporé sur la partie latérale alors que pour PermaNet 3.0, le PBO est uniquement sur le haut. Une des raisons pour lesquelles une plus grande association est trouvée avec PermaNet 3.0 (côté) pourrait être le fait qu'avec une concentration de deltaméthrine plus élevée que PermaNet 2.0, les moustiques qui survivent à l'exposition à PermaNet 3.0 sont ceux qui sont susceptibles d'être beaucoup plus résistants en raison d'une plus grande expression de GSTe2 et d'autres cytochromes P450. Ainsi, un plus grand nombre de moustiques possédant l'allèle de résistant F119-GSTe2 a été sélectionné avec PermaNet 3.0 où la dose de deltaméthrine est plus élevée comparé à PermaNet 2.0 qui est constitué d'une dose de deltaméthrine plus faible. De même, des études antérieures avaient montré que la surexpression des GSTs confère la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes chez les anophèles et les Aèdes (Che-Mendoza *et al.*, 2009; Ranson *et al.*, 2001; Riveron *et al.*, 2014). Cela suggère qu'en-dehors des mécanismes basés sur les cytochromes P450, plusieurs autres mécanismes seraient impliqués dans la résistance d'*An. funestus* aux MILDA, car lorsque les enzymes du cytochrome P450 sont inhibés par le PBO, les moustiques possédant l'allèle de résistance F119-GSTe2 sont capables de mieux survivre à l'exposition aux moustiquaires à base PBO. De plus, la présence des individus de génotype RR chez les moustiques morts suite à l'exposition aux insecticides pourrait confirmer que l'existence de la mutation L119F-GSTe2 et la surexpression de ce gène ne sont pas les seuls mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides chez *An. funestus* (Weedall *et al.*, 2019). Cependant, cette propagation d'une résistance métabolique médiée par la mutation L119F-GSTe2 et la surexpression des *GSTe2* conférant la capacité aux moustiques à survivre en présence des MILDA avec synergistes constituera une préoccupation

à un moment où ces moustiquaires sont progressivement introduites pour lutter contre la résistance aux pyréthrinoïdes. De même, l'implication des GSTs dans la résistance aux insecticides devra également être prise en considération autant que celle des cytochromes P450 (Ranson and Hemingway, 2005).

### **III.3.2. Conclusion partielle 3**

De manière générale, il a été observé que la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 impacte l'efficacité des insecticides à base de DDT et de pyréthrinoïdes. De même, la présence de cette mutation affecte l'efficacité des moustiquaires PermaNet 2.0 et PermaNet 3.0. Cependant, aucune association n'a été faite avec la moustiquaire OlySet plus. De ces résultats, il ressort qu'il serait important d'utiliser les MILDA à base de synergistes pour lesquelles une meilleure efficacité a été observée vis-à-vis d'*Anopheles funestus*.

### **III.4. Discussion générale**

En dépit des efforts menés jusqu'ici pour élucider les mécanismes impliqués dans la résistance métabolique d'*An. funestus* aux insecticides, peu d'informations sont disponibles sur le rôle que joueraient les *GSTs epsilon* dans la résistance aux insecticides chez ce vecteur à l'exception de l'étude antérieure qui avaient montré l'impact de la surexpression de *GSTe2* sur la résistance aux DDT et aux pyréthrinoïdes (Riveron *et al.*, 2014). Pourtant, la mise sur pied des outils de diagnostic de résistance appropriés pour faciliter la détection de la résistance à un stade précoce sur le terrain afin d'informer les programmes de contrôle, est primordiale pour minimiser l'impact de la résistance métabolique sur l'efficacité des outils de lutte. Cependant, la conception des méthodes diagnostiques basées sur l'ADN nécessite une meilleure compréhension des bases moléculaires qui y sont impliquées. Dans le but de contribuer à mieux comprendre les bases moléculaires impliquées dans la résistance métabolique, ce travail de thèse visait à déterminer le rôle des glutathion s-transférases dans la résistance aux insecticides chez *An. funestus* en utilisant une approche de caractérisation fonctionnelle. Pour atteindre cet objectif, nous avons tour à tour : évalué le profil d'expression des GSTs epsilon chez *An. funestus* au Cameroun par rapport aux autres pays d'Afrique et détecté des potentiels marqueurs de résistance ; réalisé la caractérisation structurelle et fonctionnelle des GSTes impliquées dans la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* et pour finir nous avons évalué l'impact de la variation allélique L119F de *GSTe2* sur les principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés en santé publique.

De manière générale, cette étude a montré que les échantillons d'*An. funestus* de Mibelon testés sont résistants à la perméthrine, à la deltaméthrine et au DDT. Un niveau de résistance similaire d'*An. funestus* aux pyréthriinoïdes et au DDT avait déjà été reporté dans d'autres localités du Cameroun à savoir : Gounougou (Menze *et al.*, 2016) et Elende (Nkemngo *et al.*, 2020). De même, plusieurs autres études ont reporté cette résistance d'*An. funestus* aux insecticides dans certains pays d'Afrique notamment au Benin (Riveron *et al.*, 2014), au Ghana (Hunt *et al.*, 2011), en Ouganda (Morgan *et al.*, 2010) et au Malawi (Vezenegho *et al.*, 2013). Cependant, cette résistance aux insecticides de plus en plus observée au Cameroun affecte l'efficacité des MILDA à base de pyréthriinoïdes vis-à-vis d'*An. funestus* et d'*An. gambiae* qui sont les vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun ; mettant ainsi un frein sur la lutte antivectorielle et la réduction de l'incidence du paludisme (Ngongang-Yipmo *et al.*, 2022). D'où la nécessité de rechercher les mécanismes impliqués dans cette résistance aux insecticides à travers le continent africain.

La recherche des gènes impliqués dans la résistance aux insecticides par séquençage de l'ARN a montré qu'à côté des cytochromes P450, des GSTs et des estérases, d'autres familles de gènes sont impliquées dans la résistance au DDT, notamment : les sulfotransférases, les facteurs de liaison à l'ATP, les UDP-glucuronosyltransférases et les métalloprotéines. Ces résultats corroborent ceux des études antérieures qui ont montré qu'en absence de la résistance par modification des sites cibles du type *kdr* observé chez certains vecteurs comme *An. gambiae*, l'un des principaux mécanismes de résistance chez les vecteurs du paludisme à l'exemple d'*An. funestus* est la résistance métabolique médiée principalement par la surexpression et la présence des variations alléliques des gènes de la famille des glutathion s-transférases, des cytochromes P450 et des carboxylestérases (Weedall *et al.*, 2019; Wondji *et al.*, 2022). Le contraste du profil d'expression des cytochromes P450 et des glutathion s-transférases observé à travers le continent est similaire à ceux des travaux d'analyses transcriptomiques antérieurs. C'est le cas des cytochromes P450 dupliqués *CYP6P9a* et *CYP6P9b* principalement surexprimés en Afrique australe (Riveron *et al.*, 2013 ; Weedall *et al.*, 2019), de *GSTe2* principalement surexprimé en Afrique de l'Ouest (Riveron *et al.*, 2014) et du cytochrome *CYP9K1* qui est majoritairement surexprimé en Afrique de l'Est (Hearn *et al.*, 2021). Pour ce qui est des glutathion s-transférases, trois principales classes sont surexprimées à savoir les GST epsilon, GST delta et les GST thêta. De même, tous les gènes du cluster epsilon des GSTs sont régulés à la hausse à travers l'Afrique lorsque l'on compare leur niveau d'expression chez les moustiques résistants au DDT et les moustiques susceptibles, à l'exception

de GSTe8. Ces observations corroborent celles des études similaires sur d'autres espèces de moustiques notamment chez le vecteur du paludisme *An. gambiae* (Mitchell *et al.*, 2014) et chez le vecteur de la dengue *Aedes aegypti* (Bariami *et al.*, 2012). La validation du profil d'expression des GSTes a montré que celles-ci sont exprimées dans toutes les zones de collecte de cette étude. Cependant, le niveau d'expression des GSTes était plus associé à la résistance au DDT comparée à la perméthrine tout comme dans les travaux de Riveron sur des échantillons du Bénin et pouvant être dû au fait que les GSTes seraient capables de métaboliser directement le DDT en DDE (Riveron *et al.*, 2014).

Une faible diversité génétique a été observée pour les gènes *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe6* et *GSTe8* au Cameroun et certains haplotypes ont été détectés uniquement chez les moustiques hyper résistants montrant que ces derniers sont sélectionnés lors de l'exposition à la perméthrine. Des résultats similaires ont été rapportés chez *An. gambiae* (Mitchell *et al.*, 2014) et *Ae. Aegypti* (Lumjuan *et al.*, 2011). La présence des haplotypes dominants dans la plupart de cas et des haplotypes appartenant uniquement aux moustiques résistants indique la sélection probable des mutations qui pourraient jouer un rôle dans la résistance à la perméthrine et au DDT à l'exemple des cas rapportés pour le gène *GSTe2* (Riveron *et al.*, 2014) et les cytochromes P450s *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (Ibrahim *et al.*, 2015). Dans cette étude, la recherche des potentiels marqueurs de résistance par comparaison des séquences des GSTes des populations d'*An. funestus* de quatre pays d'Afrique a permis de détecter les variations alléliques G26D-GSTe3, Y/A-GSTe4, H/E-GSTe4, E/S-GSTe6 et G/T-GSTe6 qui pourraient être associées au profil de résistance de ces différentes zones d'étude. La recherche du rôle que peut jouer de telles variations alléliques dans la résistance aux insecticides reste très nécessaire pour la lutte anti-vectorielle. En effet, les travaux récents ont montré que la présence de l'unique variation allélique L119F-GSTe2 détectée par Riveron et collaborateurs (Riveron *et al.*, 2014) augmente l'habilité d'*An. funestus* à survivre longtemps après le contact avec la moustiquaire Olyset plus (Tchakounte *et al.*, 2019; Ngongang-Yipmo *et al.*, 2022).

La caractérisation structurelle *in silico* des variations alléliques de *GSTe3*, *GSTe4* et *GSTe6* sur la résistance aux insecticides a révélé que la présence des variations alléliques D26-GSTe3, Y/A-GSTe4 et E/S-GSTe6 permet une affinité de ces allèles de GSTes avec la perméthrine, le DDT et la deltaméthrine par rapport aux allèles G26-GSTe3, H/E-GSTe4, et G/T-GSTe6 en augmentant la taille de la cavité de fixation de l'insecticide. En effet, lorsque la cavité de fixation est plus grande, elle permet une meilleure pénétration de l'insecticide et la distance entre le glutathion et le groupement fonctionnel de l'insecticide devient plus petit. Ces résultats corroborent ceux des études précédentes ayant démontré que chez *An. funestus*, les

variations alléliques impactent la résistance aux pyréthriinoïdes pour les cytochromes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (Ibrahim *et al.*, 2015), *CYP325A* (Wamba *et al.*, 2021), ainsi que de la résistance croisée aux pyréthriinoïdes et au bendiocarbe pour les cytochromes *CYP6AA1* (Ibrahim *et al.*, 2018) et *CYP6Z1* (Ibrahim *et al.*, 2016). La validation fonctionnelle *in vivo* et *in vitro* du rôle des GSTes dans la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT a permis de mettre en exergue l'implication des GSTes dans cette résistance à côté et indépendamment des autres gènes de détoxification de l'organisme, et l'activité enzymatiques des différents allèles de *GSTe3*, *GSTe4* et *GSTe6* sélectionnés. Pour ce qui est de l'impact des variations alléliques sur la capacité des GSTes à survivre en présence de l'insecticide, il a été observé une plus grande capacité de survie et une plus grande activité métabolique avec les allèles mutés confirmant ainsi la prédiction de l'affinité GSTes-insecticides réalisée *in silico*. De manière générale, au vu des résultats obtenus de la validation fonctionnelle de l'implication des GSTes dans la résistance aux insecticides réalisée dans la présente étude, il ressort que la surexpression des GSTes serait plus impliquée dans la résistance au DDT comparée à la résistance aux pyréthriinoïdes. Cette grande affinité entre les GSTes et le DDT pourrait s'expliquer par la structure dynamique des GSTes qui favoriserait la métabolisation du DDT en DDE en présence du glutathion réduit (Pontes *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2008). De même, la résistance aux pyréthriinoïdes observée chez les drosophiles exprimant les GSTes ainsi que leur élimination par les protéines des GSTes synthétisées seraient dues au fait que les GSTs peuvent également protéger le moustique de la toxicité des pyréthriinoïdes en séquestrant l'insecticide (Kostaropoulos *et al.*, 2001) ou en protégeant les moustiques contre le stress oxydatif et la peroxydation lipidique causés par l'exposition à la perméthrine (Vontas *et al.*, 2001). En effet, plusieurs études antérieures avaient également montré une implication des GSTes dans la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* (Chen *et al.*, 2003), *An. funestus* (Ndo *et al.*, 2019) ainsi que chez les *Aedes* (Lumjuan *et al.*, 2011). Cette résistance croisée au DDT et aux pyréthriinoïdes médiée par les GSTes serait une préoccupation importante pour la lutte contre le paludisme, car ces enzymes de détoxification pourraient protéger les moustiques contre les principaux insecticides utilisés en santé publique.

Les moustiquaires imprégnées à base du synergiste PBO se sont montrées plus efficaces que les moustiquaires simples, justifiant ainsi que les gènes de détoxifications jouent un rôle essentiel dans la résistance aux insecticides de la population d'*An. funestus* de Mibelon. Ces résultats sont similaires à ceux qui avaient été obtenus à la suite de l'évaluation de l'efficacité des MILDA vis-à-vis de la population d'*An. funestus* d'Elende (Centre-Cameroun)(Nkemngo *et al.*, 2020). La détermination de l'impact des variations alléliques des GSTes sur l'efficacité

des outils de lutte utilisés en santé publique a révélé que la présence de l'allèle F199-GSTe2 augmente la capacité d'*An. funestus* à survivre en présence du DDT, de la deltaméthrine, de la perméthrine et des MILDA Permanet 2.0 et Permanet 3.0 testées. De même, une étude récente a pu mettre en évidence que la présence de l'allèle de résistance du cytochrome 6P9a chez *An. funestus* réduit l'efficacité des MILDA (Weedall *et al.*, 2019). Ce qui peut donc contribuer à expliquer la perte d'efficacité des outils de lutte anti-vectorielle sur le terrain, car de plus en plus, il est reporté que les moustiques continuent de vivre et de prendre leur repas sanguin sur l'Homme malgré la présence des insecticides et des moustiquaires dans les domiciles (Norris and Norris, 2011; Tchouakui *et al.*, 2021).

**CONCLUSION GENERALE, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE

Les données issues du présent travail de recherche témoignent que la surexpression de *GSTe1*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5*, *GSTe6*, *GSTe7* et *GSTe8* ainsi que la diversité génétique des GSTes chez *An. funestus* sont fortement liées à leurs profils de résistance face aux insecticides. La présence des variations alléliques D26G-GSTe3, H181Y-GSTe4, E189A-GSTe4, T201S-GSTe6 et G210E-GSTe6 impacte les structures 3D de GSTe3, GSTe4 ainsi que de GSTe6 et leur confère une plus grande habilité à métaboliser le DDT et les pyréthriinoïdes. Cependant, l'implication des GSTes dans la résistance croisée entre le DDT et les pyréthriinoïdes rend le management de la résistance aux insecticides chez ce vecteur majeur du paludisme plus complexe. De même, la présence de la variation allélique L119F-GSTe2 chez *An. funestus* accroît la résistance aux insecticides et par conséquent réduit l'efficacité des principaux outils de lutte anti-vectorielle utilisés au Cameroun. Ces résultats montrent que des stratégies de gestion de la résistance telles que la rotation d'insecticides, l'utilisation des insecticides à base de synergistes des principales familles d'enzymes impliquées dans la résistance pourraient aider à contrôler la résistance si elles sont appliquées avant que les allèles de résistance tels que F119-GSTe2, D26-GSTe3, Y/A-GSTe4 et E/S-GSTe6 ne soient complètement établis dans la population. Car il a été observé qu'une réduction de l'expression des GSTes est associée à la restauration de la sensibilité des moustiques.

## RECOMMANDATIONS

A la lumière des observations découlant de cette étude, nous recommandons aux populations de dormir sous des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action pour réduire le contact avec les moustiques. A la communauté scientifique, nous recommandons la mise sur pied des outils de diagnostic rapide à base des variations alléliques D26G-GSTe3, H161Y-GSTe4, A189G-GSTe4, A169T-GSTe6 et G210E-GSTe6, car ces outils permettront de détecter assez rapidement la résistance sur le terrain. Aux pouvoirs publics, nous recommandons d'intégrer, dans les programmes de lutte anti-vectorielle, la distribution des moustiquaires à base de synergiste telle que le PBO et de préconiser la rotation d'insecticides sur le terrain pour réduire la résistance.

## PERSPECTIVES

Dans nos futures investigations nous nous proposons de :

- ✚ évaluer l'impact des mutations D26G-GSTe3, H161Y-GSTe4, A189G-GSTe4, A169T-GSTe6 et G210E-GSTe6 sur l'efficacité des MILDA et des insecticides utilisés pour la PID comme réalisé pour le cas de la variation allélique L199F-GSTe2 ;
- ✚ étudier la diversité génétique des GSTes associée à la résistance au DDT chez les populations d'*An. funestus* du Cameroun ;
- ✚ anticiper l'aggravation de la résistance en recherchant l'impact de la surexpression des GSTes aux organophosphorés et aux nouvelles classes d'insecticides telles que les néonicotinoïdes et les pyrroles ;
- ✚ réaliser la caractérisation fonctionnelle des promoteurs des GSTes et des régions inter-géniques présentes entre les GSTes sachant que dans certains cas, la détoxification est dû à des changements au niveau transcriptionnel sur la séquence du promoteur ;
- ✚ évaluer l'impact de la surexpression combinée de plusieurs GSTes sur la résistance aux insecticides chez *An. funestus* au Cameroun ;

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- A-Elgayoum, S., El-FekiAel, K., Mahgoub, B., El-Rayah, e.-A., Giha, H., 2009. Malaria overdiagnosis and burden of malaria misdiagnosis in the suburbs of central Sudan: special emphasis on artemisinin-based combination therapy era. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 64, 20-26.
- Abulhassan, Z., Kurfi, B.G., Ibrahim, S.S., Ishaq, D.U., Mukthar, M.M., 2019. Investigation of the Role of ABC Transporters in Pyrethroids Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles coluzzii* from Northern Nigeria. *Open Journal of Immunology* 9, 29.
- Adolfi, A., Poulton, B., Anthousi, A., Macilwee, S., Ranson, H., Lycett, G.J., 2019. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 25764-25772.
- Ahmad, M., Denholm, I., Bromilow, R.H., 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 62, 805-810.
- Altalhi, A.D., 2005. Investigation of Mosquito Survival Associated with *Bacillus thuringiensis israelensis* and Aquatic Plant, *Lemna minor*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8, 314-317.
- Amichot, M., Tarès, S., Brun-Barale, A., Arthaud, L., Bride, J.M., Bergé, J.B., 2004. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 *Cyp6a2* enable DDT metabolism. *European Journal of Biochemistry* 271, 1250-1257.
- Annan, Z., 2007. Structure génétique des populations de *Plasmodium falciparum*, agent de forme grave du paludisme, chez l'homme et les anophèles vecteurs en Afrique. Montpellier 2,
- ANOFEL, 2014. polycopié national de parasitologie et de mycologie.
- Antonio-Nkondjio, C., Kerah, C., 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, 1215-1221.
- Antonio-Nkondjio, C., Simard, F., 2013. Highlights on *Anopheles nili* and *Anopheles moucheti*, Malaria Vectors in Africa, In: Manguin S, I.T. (Ed.) *Anopheles* Mosquitoes: New Insights into Malaria Vectors.
- Antonio-Nkondjio, C., Sonhafouo-Chiana, N., Ngadjeu, C., Doumbe-Belisse, P., Talipouo, A., Djamouko-Djonkam, L., Kopya, E., Bamou, R., Awono-Ambene, P., Wondji, C.S.,

2017. Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors* 10, 1-14.
- Aponte, H.A., Penilla, R.P., Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., López, A.D., Solis, F., Manrique-Saide, P., Ranson, H., Lenhart, A., McCall, P.J., 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide biochemistry and physiology* 107, 226-234.
- Ashley, E.A., Dhorda, M., Fairhurst, R.M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J.M., Mao, S., Sam, B., 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine* 371, 411-423.
- Asih, P.B., Syahrani, L., Rozi, I.E., Pratama, N.R., Marantina, S.S., Arsyad, D.S., Mangunwardoyo, W., Hawley, W., Laihad, F., Sukowati, S., 2012. Existence of the rdl mutant alleles among the anopheles malaria vector in Indonesia. *Malaria journal* 11, 1-6.
- Awolola, T., Oduola, O., Strode, C., Koekemoer, L., Brooke, B., Ranson, H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 1139-1145.
- Ayala, F.J., Escalante, A.A., Rich, S.M., 1999. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* 41, 55-68.
- Baker, D., Sali, A., 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294, 93-96.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Juárez, M.P., Mijailovsky, S.J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 9268-9273.
- Bamou, R., Sonhafouo-Chiana, N., Mavridis, K., Tchuinkam, T., Wondji, C.S., Vontas, J., Antonio-Nkondjio, C., 2019. Status of insecticide resistance and its mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations from forest settings in south Cameroon. *Genes* 10, 741.
- Bariami, V., Jones, C.M., Poupardin, R., Vontas, J., Ranson, H., 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1692.

- Barrera, J., Cesar, R.M., Martins, D.C., Vêncio, R.Z., Merino, E.F., Yamamoto, M.M., Leonardi, F.G., Pereira, C.A.d.B., Portillo, H.A.d., 2007. Constructing probabilistic genetic networks of *Plasmodium falciparum* from dynamical expression signals of the intraerythrocytic development cycle, In: *Methods of Microarray Data Analysis V*. Springer, pp. 11-26.
- Barrès, B., Mottet, C., 2017. La résistance aux néonicotinoïdes chez le puceron vert du pêcher. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail*, 29-31.
- Baton, L., Zhang, D., Li, Y., Xi, Z., 2021. Combining the incompatible and sterile insect techniques for pest and vector control, In: *Area-Wide Integrated Pest Management*. CRC Press, pp. 367-404.
- Baxter, C.A., Murray, C.W., Clark, D.E., Westhead, D.R., Eldridge, M.D., 1998. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 33, 367-382.
- Becker, N., 1988. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel Journal Entomology* 32, 63-69.
- Belinato, T.A., Martins, A.J., 2016. Insecticide resistance and fitness cost. *Insecticides Resistance: InTech*, 243-261.
- Benedict, M.Q., Robinson, A.S., 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in parasitology* 19, 349-355.
- Benelli, G., Beier, J.C., 2017. Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Tropica* 174, 91-96.
- Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., 2002. The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58, 899-907.
- Bhatt, P., Bhatt, K., Huang, Y., Lin, Z., Chen, S., 2020. Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Chemosphere* 244, 125507.
- Bhatt, S., Weiss, D., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K., Moyes, C., Henry, A., Eckhoff, P., 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526, 207-211.
- Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., Xu, Y., Dimopoulos, G., Xi, Z., 2013. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science* 340, 748-751.
- Bissagnéné, E., 2008. *Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique*. Wolters Kluwer France.

- Bisset, J., Rodríguez, M., Ricardo, Y., Ranson, H., Perez, O., Moya, M., Vazquez, A., 2011. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Medical and Veterinary Entomology* 25, 233-239.
- Blandin, S., Moita, L.F., Köcher, T., Wilm, M., Kafatos, F.C., Levashina, E.A., 2002. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO reports* 3, 852-856.
- Blanford, S., Chan, B.H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M.B., 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 308, 1638-1641.
- Bloomquist, J.R., 1996. Ion channels as targets for insecticides. *Annual review of entomology* 41, 163-190.
- Board, P.G., Anders, M., 2011. Glutathione transferase zeta: discovery, polymorphic variants, catalysis, inactivation, and properties of *Gstz1*<sup>-/-</sup> mice. *Drug metabolism reviews* 43, 215-225.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24798-24806.
- Boelee, E., 2003. Malaria in irrigated agriculture. *Irrigation and Drainage: The journal of the International Commission on Irrigation and Drainage* 52, 65-69.
- Boete, C., Koella, J.C., 2003. Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control. *TRENDS in Parasitology* 19, 32-38.
- Bombliès, A., 2012. Modeling the role of rainfall patterns in seasonal malaria transmission. *Climatic change* 112, 673-685.
- Boyer, S., 2006. Résistance métabolique des larves de moustiques aux insecticides: conséquences environnementales. Université Joseph-Fourier-Grenoble I,
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., DeRisi, J.L., Ward, G., 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology* 1, e5.
- Bradley, J., Stone, W., Da, D.F., Morlais, I., Dicko, A., Cohuet, A., Guelbeogo, W.M., Mahamar, A., Nsango, S., Soumaré, H.M., 2018. Predicting the likelihood and intensity of mosquito infection from sex specific *Plasmodium falciparum* gametocyte density. *Elife* 7, e34463.

- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development* 118, 401-415.
- Bray, R., Garnham, P., 1982. The life-cycle of primate malaria parasites. *British medical bulletin* 38, 117-122.
- Brown, A.E., Catteruccia, F., 2006. Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for RNAi-based approaches. *Biotechniques* 40, S38-S44.
- Brown, M.R., Clark, K.D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S.F., Crim, J.W., Suderman, R.J., Strand, M.R., 2008. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5716-5721.
- Bruce-Chwatt, L., Pull, J., 1980. Malaria. 40 maxims. *La Nouvelle presse medicale* 9, 1577-1580.
- Buckingham, S.D., Biggin, P.C., Sattelle, B.M., Brown, L.A., Sattelle, D.B., 2005. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Molecular pharmacology* 68, 942-951.
- Burt, A., Coulibaly, M., Crisanti, A., Diabate, A., Kayondo, J.K., 2018. Gene drive to reduce malaria transmission in sub-Saharan Africa. *Journal of Responsible Innovation* 5, S66-S80.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25, 169-193.
- Busvine, J., 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 193-195.
- Carballar-Lejarazú, R., Ogaugwu, C., Tushar, T., Kelsey, A., Pham, T.B., Murphy, J., Schmidt, H., Lee, Y., Lanzaro, G.C., James, A.A., 2020. Next-generation gene drive for population modification of the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 22805-22814.
- Carnevale, P., Robert, V., 2017. *Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD éditions.
- Carnevale, P., Robert, V., Manguin, S., Corbel, V., Fontenille, D., Garros, C., Rogier, C., 2009. *Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*.
- Casimiro, S., Coleman, M., Mohloai, P., Hemingway, J., Sharp, B., 2014. Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: culicidae) from Mozambique. *Journal of medical entomology* 43, 267-275.

- Charlwood, J., Pinto, J., Sousa, C., Madsen, H., Ferreira, C., Do Rosario, V., 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) from São Tomé Island. *Journal of Vector Ecology* 27, 178-183.
- Charlwood, J., Thompson, R., Madsen, H., 2003. Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. *Malaria journal* 2, 1-10.
- Che-Mendoza, A., Penilla, R.P., Rodríguez, D.A., 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. *African Journal of Biotechnology* 8.
- Chen, L., Hall, P.R., Zhou, X.E., Ranson, H., Hemingway, J., Meehan, E.J., 2003. Structure of an insect  $\delta$ -class glutathione S-transferase from a DDT-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 59, 2211-2217.
- Chiu, T.-L., Wen, Z., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 8855-8860.
- Cho, A., 2012. Constructing phylogenetic trees using maximum likelihood. Scripps Women College, Claremont.
- Chouaibou, M.S., Fodjo, B.K., Fokou, G., Allassane, O.F., Koudou, B.G., David, J.P., Antonio-Nkondjio, C., Ranson, H., Bonfoh, B., 2016. Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Cote d'Ivoire. *Malar J* 15, 426.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., Daborn, P.J., 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5731-5736.
- ci, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396-404.
- Clarkson, C.S., Miles, A., Harding, N.J., O'Reilly, A.O., Weetman, D., Kwiatkowski, D., Donnelly, M.J., Consortium, A.g.G., 2021. The genetic architecture of target-site resistance to pyrethroid insecticides in the African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Molecular Ecology*.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1660.
- Clements, A.N., 1992. The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.

- Clements, A.N., 1999. The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour. CABI publishing.
- Coetzee, M., Fontenille, D., 2004. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect biochemistry and molecular biology* 34, 599-605.
- Coetzee, M., Koekemoer, L.L., 2013. Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annual review of entomology* 58, 393-412.
- Cohuet, A., Simard, F., Toto, J., Kengne, P., Coetzee, M., Fontenille, D., 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69, 200–205.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., Davies, E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science* 2, 144-151.
- Collins, W.E., 2012. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annual review of entomology* 57, 107-121.
- Collins, W.E., Jeffery, G.M., 2007. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews* 20, 579-592.
- Cornejo, O.E., Escalante, A.A., 2006. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends in parasitology* 22, 558-563.
- Cowman, A., Foote, S., 1990. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *International Journal for Parasitology* 20, 503-513.
- Cui, Y., Sun, J.L., Yu, L., 2017. Application of the CRISPR gene-editing technique in insect functional genome studies—a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 162, 124-132.
- Dagg, K., Irish, S., Wiegand, R.E., Shililu, J., Yewhalaw, D., Messenger, L.A., 2019. Evaluation of toxicity of clothianidin (neonicotinoid) and chlorfenapyr (pyrrole) insecticides and cross-resistance to other public health insecticides in *Anopheles arabiensis* from Ethiopia. *Malaria journal* 18, 1-11.
- Dame, D., Curtis, C., Benedict, M., Robinson, A., Knols, B., 2009. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal* 8, S2.
- Dana, A.N., Hong, Y.S., Kern, M.K., Hillenmeyer, M.E., Harker, B.W., Lobo, N.F., Hogan, J.R., Romans, P., Collins, F.H., 2005. Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC genomics* 6, 1-24.

- Danis, M., Mouchet, J., 1991. Paludisme.
- Das, A., Bajaj, R., Mohanty, S., Swain, V., 2007. Genetic diversity and evolutionary history of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Current Science*, 1516-1524.
- Dattoo, M.S., Natama, M.H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., 2021. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet* 397, 1809-1818.
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P., Williamson, M., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life* 59, 151-162.
- Delannay, C., Goindin, D., Kellaou, K., Ramdini, C., Gustave, J., Vega-Rúa, A., 2018. Multiple insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* populations from Guadeloupe (French West Indies) and associated mechanisms. *PloS one* 13, e0199615.
- Detinova, T.S., Bertram, D.S., Organization, W.H., 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria. World Health Organization.
- Devonshire, A.L., Moores, G.D., 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 18, 235-246.
- Dia, I., Guelbeogo, M.W., Ayala, D., 2013. Advances and Perspectives in the Study of the Malaria Mosquito *Anopheles funestus*. *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors* 10, 55389.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akoobeto, M., Guiguemde, T.R., Darriet, F., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G.J., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 67, 617-622.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kengne, P., Brengues, C., Baldet, T., Ouari, A., Simard, F., Lehmann, T., 2006. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *Journal of medical entomology* 43, 480-483.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC genomics* 4, 1-16.

- Djègbè, I., Agossa, F.R., Jones, C.M., Poupardin, R., Cornelie, S., Akogbéto, M., Ranson, H., Corbel, V., 2014. Molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. *Parasites & vectors* 7, 1-9.
- Djouaka, R., Irving, H., Tukur, Z., Wondji, C.S., 2011. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLoS one* 6, e27760.
- Djouaka, R., Riveron, J.M., Yessoufou, A., Tchigossou, G., Akoton, R., Irving, H., Djegbe, I., Moutairou, K., Adeoti, R., Tamò, M., 2016. Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasites & vectors* 9, 1-12.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbet, 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* ss. from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics* 9, 1-10.
- Doolan, D.L., 2011. *Plasmodium* immunomics. *International journal for parasitology* 41, 3-20.
- Douglas, A.D., Williams, A.R., Illingworth, J.J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A.L., Wyllie, D.H., Crosnier, C., Miura, K., Wright, G.J., 2011. The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nature communications* 2, 1-9.
- Duffy, J.B., 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *genesis* 34, 1-15.
- Duffy, P.E., Gorres, J.P., 2020. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *npj Vaccines* 5, 1-9.
- Edi, C.V., Djogbenou, L., Jenkins, A.M., Regna, K., Muskavitch, M.A., Poupardin, R., Jones, C.M., Essandoh, J., Ketoh, G.K., Paine, M.J., 2014. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS genetics* 10, e1004236.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Binyang, A., Assatse, T., Tene-Fossog, B., Tchouakui, M., Nguete Nguiffo, D., Irving, H., Ndo, C., Awono-Ambene, P., 2019a. Overexpression of two members of D7 salivary genes family is associated with pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* ss but not in *Anopheles gambiae* in Cameroon. *Genes* 10, 211.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Ndo, C., Binyang, A., Assatse, T., Nguiffo-Nguete, D., Djonabaye, D., Irving, H., Tene-Fossog, B., Wondji, C.S., 2019b. The G119S

- acetylcholinesterase (Ace-1) target site mutation confers carbamate resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon: A challenge for the coming IRS Implementation. *Genes* 10, 790.
- Eldridge, M.D., Murray, C.W., Auton, T.R., Paolini, G.V., Mee, R.P., 1997. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of computer-aided molecular design* 11, 425-445.
- Elliott, M., Janes, N., Potter, C., 1978. The future of pyrethroids in insect control. *Annual review of entomology* 23, 443-469.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect molecular biology* 14, 3-8.
- Farenhorst, M., Mouatcho, J.C., Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Koekemoer, L.L., Knols, B.G., Coetzee, M., 2009. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 17443-17447.
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125, 1-15.
- Ffrench-Constant, R., 1999. Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? *Insect biochemistry and molecular biology* 29, 397-403.
- Fikes, J.D., 1990. Organophosphorus and carbamate insecticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20, 353-367.
- Fischer, J.A., Giniger, E., Maniatis, T., Ptashne, M., 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332, 853-856.
- Fiser, A., Do, R.K.G., 2000. Modeling of loops in protein structures. *Protein science* 9, 1753-1773.
- Fiser, A., Sali, A., 2003. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics* 19, 2500-2501.
- Fongnikin, A., Houeto, N., Agbevo, A., Odjo, A., Syme, T., N'Guessan, R., Ngufor, C., 2020. Efficacy of Fludora® Fusion (a mixture of deltamethrin and clothianidin) for indoor residual spraying against pyrethroid-resistant malaria vectors: laboratory and experimental hut evaluation. *Parasites & vectors* 13, 1-11.
- Fonseca-González, I., Quiñones, M.L., Lenhart, A., Brogdon, W.G., 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science* 67, 430-437.

- Fontenille, D., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., Antonio-Nkondjio, C., Wondji, C., Kengne, P., Dia, I., Bouccolini, D., Rajaonarivelo, V., Dabire, R., Adja-Akre, M., Ceainu, C., Le Goff, G., Simard, F., 2003. Systématique et biologie des anophèles vecteur de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Médecine Tropicale* 63, 247-253.
- Fontenille, D., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., Kengne, P., Antonio-Nkondjio, C., Wondji, C., Simard, F., 2005. Malaria vectors: from the field to genetics. *Research in Africa. Revue d'épidémiologie et de Sante Publique* 53, 283-290.
- Fontenille, D., Simard, F., 2004. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 357-375.
- Fournier, D., Mutero, A., 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 108, 19-31.
- Franciosa, H., Berge, J., 1995. Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families. *Insect biochemistry and molecular biology* 25, 311-317.
- Fu, Y., Li, W., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives* 87, 245-254.
- Furlan, L., Pozzebon, A., Duso, C., Simon-Delso, N., Sánchez-Bayo, F., Marchand, P.A., Codato, F., van Lexmond, M.B., Bonmatin, J.-M., 2021. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 3: alternatives to systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 11798-11820.
- Garnham, P.C.C., 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*.
- Gilles, H., 1993. Diagnostic methods in malaria. *Bruce-Chwatt's Essential Microbiology*.
- Gillies, M., Coetzee, M., 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publ S Afr Inst Med Res* 55, 1-143.
- Gillies, M.T., De Meillon, B., 1968. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). *The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*.
- Gohlke, H., Hendlich, M., Klebe, G., 2000. Predicting binding modes, binding affinities and hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 20, 115-144.

- Gong, Y., Li, M., Li, T., Liu, N., 2021. Molecular and functional characterization of three novel carboxylesterases in the detoxification of permethrin in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Science*.
- Goodsell, D.S., Morris, G.M., Olson, A.J., 1996. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of molecular recognition* 9, 1-5.
- Grant, D.F., Bender, D.M., Hammock, B.D., 1989. Quantitative kinetic assays for glutathione S-transferase and general esterase in individual mosquitoes using an EIA reader. *Insect biochemistry* 19, 741-751.
- Greenwood, B., Targett, G., 2009. Do we still need a malaria vaccine? *Parasite Immunology* 31, 582-586.
- Grjebine, A., 1966. *Insectes Diptères Culicidae Anophelinae*.
- Groger, M., Fischer, H.S., Veletzky, L., Lalremruata, A., Ramharter, M., 2017. A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human *Plasmodium ovale* malaria. *Malaria journal* 16, 1-16.
- Gu, W., Novak, R.J., 2009. Agent-based modelling of mosquito foraging behaviour for malaria control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 1105-1112.
- Gu, W., Utzinger, J., Novak, R.J., 2008. Habitat-based larval interventions: a new perspective for malaria control. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 78, 2-6.
- Guerra, C.A., Gikandi, P.W., Tatem, A.J., Noor, A.M., Smith, D.L., Hay, S.I., Snow, R.W., 2008. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS medicine* 5, e38.
- Gupta, S., Gazendam, N., Farina, J.M., Saldarriaga, C., Mendoza, I., López-Santi, R., Pérez, G.E., Martínez-Sellés, M., Baranchuk, A., 2021. Malaria and the Heart: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 77, 1110-1121.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., 2016. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology* 34, 78-83.

- Hancock, P.A., White, V.L., Callahan, A.G., Godfray, C.H., Hoffmann, A.A., Ritchie, S.A., 2016. Density-dependent population dynamics in *Aedes aegypti* slow the spread of wild *Wolbachia*. *Journal of Applied Ecology* 53, 785-793.
- Harbach, R., 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of entomological research* 94, 537-553.
- Harbach, R., 2011. Genus ANOPHELES Meigen, 1818 Mosquito Taxonomic Inventory.
- Hartley, S., Thizy, D., Ledingham, K., Coulibaly, M., Diabaté, A., Dicko, B., Diop, S., Kayondo, J., Namukwaya, A., Nourou, B., 2019. Knowledge engagement in gene drive research for malaria control. *PLoS neglected tropical diseases* 13, e0007233.
- Hassan, F., Singh, K.P., Ali, V., Behera, S., Shivam, P., Das, P., Dinesh, D.S., 2019. Detection and functional characterization of sigma class GST in *Phlebotomus argentipes* and its role in stress tolerance and DDT resistance. *Scientific reports* 9, 1-15.
- Haubruge, É., Amichot, M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *BASE*.
- Hearn, J., Tagne, C.D., Ibrahim, S.S., Tene-Fossog, B., Mugenzi, L.J., Irving, H., Riveron, J., Weedall, G.D., Wondji, C.S., 2021. Multi-omics analysis identifies a CYP9K1 haplotype conferring pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa. *bioRxiv*.
- Helvecio, E., Romão, T.P., de Carvalho-Leandro, D., de Oliveira, I.F., Cavalcanti, A.E.H.D., Reimer, L., de Paiva Cavalcanti, M., de Oliveira, A.P.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., 2020. Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. *Pesticide biochemistry and physiology* 165, 104464.
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect biochemistry and molecular biology* 30, 1009-1015.
- Hemingway, J., Hawkes, N., Carroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 653-665.
- Henderson, S.J., Belemvire, A., Nelson, R., Linn, A., Moriarty, L.F., Brofsky, E., Diaw, M., Gittelman, D., 2020. Advancing Malaria Prevention and Control in Africa Through the Peace Corps-US President's Malaria Initiative Partnership. *Global Advances in Health and Medicine* 9, 2164956120976107.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* 10, 413-417.

- Hill, J., Lines, J., Rowland, M., 2006. Insecticide-treated nets. *Advances in parasitology* 61, 77-128.
- Hillyer, J.F., Barreau, C., Vernick, K.D., 2007. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *International journal for parasitology* 37, 673-681.
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y., Dong, Y., 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476, 454-457.
- Hollingworth, R., Dong, K., 2008. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. *Global pesticide resistance in arthropods* 40, 89.
- Homem, R.A., Davies, T.G.E., 2018. An overview of functional genomic tools in deciphering insecticide resistance. *Current opinion in insect science* 27, 103-110.
- Howes, R.E., Mioramalala, S.A., Ramiranirina, B., Franchard, T., Rakotorahalahy, A.J., Bisanzio, D., Gething, P.W., Zimmerman, P.A., Ratsimbaoa, A., 2016. Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar: operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malaria journal* 15, 1-18.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F., 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278.
- Huang, H., Yao, H., Liu, J.-Y., Samra, A.I., Kamita, S.G., Cornel, A.J., Hammock, B.D., 2012. Development of pyrethroid-like fluorescent substrates for glutathione S-transferase. *Analytical biochemistry* 431, 77-83.
- Hunt, D.A., Treacy, M., 1998. Pyrrole insecticides: a new class of agriculturally important insecticides functioning as uncouplers of oxidative phosphorylation, In: *Insecticides with novel modes of action*. Springer, pp. 138-151.
- Hunt, R.H., Fuseini, G., Knowles, S., Stiles-Ocran, J., Verster, R., Kaiser, M.L., Choi, K.S., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., 2011. Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes at four localities in Ghana, West Africa. *Parasites & vectors* 4, 1-7.
- Hyde, J.E., 2005. Drug-resistant malaria. *Trends in parasitology* 21, 494-498.
- Ibrahim, S.S., Amvongo-Adjia, N., Wondji, M.J., Irving, H., Riveron, J.M., Wondji, C.S., 2018. Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* is exacerbated by overexpression and overactivity of the P450 CYP6AA1 across Africa. *Genes* 9, 140.
- Ibrahim, S.S., Mukhtar, M.M., Muhammad, A., Wondji, C.S., 2021. 2La paracentric chromosomal inversion and overexpressed metabolic genes enhance thermotolerance

- and pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biology* 10, 518.
- Ibrahim, S.S., Ndula, M., Riveron, J.M., Irving, H., Wondji, C.S., 2016. The P450 CYP 6Z1 confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Molecular ecology* 25, 3436-3452.
- Ibrahim, S.S., Riveron, J.M., Bibby, J., Irving, H., Yunta, C., Paine, M.J., Wondji, C.S., 2015. Allelic variation of cytochrome P450s drives resistance to bednet insecticides in a major malaria vector. *PLoS genetics* 11, e1005618.
- Imbahale, S.S., Mweresa, C.K., Takken, W., Mukabana, W.R., 2011. Development of environmental tools for anopheline larval control. *Parasites & Vectors* 4, 1-10.
- Ingham, V.A., Anthousi, A., Douris, V., Harding, N.J., Lycett, G., Morris, M., Vontas, J., Ranson, H., 2020. A sensory appendage protein protects malaria vectors from pyrethroids. *Nature* 577, 376-380.
- Ioannides, C., 2001. Xenobiotic metabolism: an overview. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, 1-32.
- Irving, H., Wondji, C.S., 2017. Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC genetics* 18, 1-11.
- Irwin, J.J., Shoichet, B.K., 2005. ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling* 45, 177-182.
- Isaacs, A.T., Mawejje, H.D., Tomlinson, S., Rigden, D.J., Donnelly, M.J., 2018. Genome-wide transcriptional analyses in *Anopheles* mosquitoes reveal an unexpected association between salivary gland gene expression and insecticide resistance. *BMC genomics* 19, 1-12.
- Ishak, I.H., Kamgang, B., Ibrahim, S.S., Riveron, J.M., Irving, H., Wondji, C.S., 2017. Pyrethroid resistance in Malaysian populations of dengue vector *Aedes aegypti* is mediated by CYP9 family of cytochrome P450 genes. *PLoS neglected tropical diseases* 11, e0005302.
- Ishak, I.H., Riveron, J.M., Ibrahim, S.S., Stott, R., Longbottom, J., Irving, H., Wondji, C.S., 2016. The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific reports* 6, 1-13.

- Itokawa, K., Komagata, O., Kasai, S., Masada, M., Tomita, T., 2011. Cis-acting mutation and duplication: History of molecular evolution in a P450 haplotype responsible for insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Insect biochemistry and molecular biology* 41, 503-512.
- Janer, E.C., Klafke, G., Fontes, F., Capurro, M., Schumaker, T., 2019. Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance. *Ticks and tick-borne diseases* 10, 761-765.
- Karatolos, N., Williamson, M., Denholm, I., Gorman, K., Ffrench-Constant, R., Nauen, R., 2012. Resistance to spiromesifen in *Trialeurodes vaporariorum* is associated with a single amino acid replacement in its target enzyme acetyl-coenzyme A carboxylase. *Insect molecular biology* 21, 327-334.
- Kareemi, T.I., Mishra, A.K., Chand, S.K., Nirankar, J.K., Vishwakarma, A.K., Tiwari, A., Bharti, P.K., 2021. Analysis of the insecticide resistance mechanism in *Anopheles culicifacies* sensu lato from a malaria-endemic state in India. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Karpushova, A., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S., Schmid, R., 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied microbiology and biotechnology* 67, 59-69.
- Karunaratne, S.H.P., Jayawardena, K., Hemingway, J., Ketterman, A.J., 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal* 294, 575-579.
- Kazmin, D., Nakaya, H.I., Lee, E.K., Johnson, M.J., Van Der Most, R., Van Den Berg, R.A., Ballou, W.R., Jongert, E., Wille-Reece, U., Ockenhouse, C., 2017. Systems analysis of protective immune responses to RTS, S malaria vaccination in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 2425-2430.
- Keiser, J., Maltese, M.F., Erlanger, T.E., Bos, R., Tanner, M., Singer, B.H., Utzinger, J., 2005. Effect of irrigated rice agriculture on Japanese encephalitis, including challenges and opportunities for integrated vector management. *Acta tropica* 95, 40-57.
- Kerah, H., Mallaye, P., Antonio-Nkondjio, C., Donan-Gouni, I., Awono-Ambene, P., Samekoko, A., Simard, F., 2009. Malaria transmission dynamics in Goulmoun, a rural city in south-western Chad. *BMC Infectious Diseases* 9, 71.
- Kilama, M., Smith, D.L., Hutchinson, R., Kigozi, R., Yeka, A., Lavoy, G., Kanya, M.R., Staedke, S.G., Donnelly, M.J., 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.
- Killeen, G.F., McKenzie, F.E., Foy, B.D., Bøgh, C., Beier, J.C., 2001. The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 469-476.
- Killeen, G.F., Smith, T.A., Ferguson, H.M., Mshinda, H., Abdulla, S., Lengeler, C., Kachur, S.P., 2007. Preventing childhood malaria in Africa by protecting adults from mosquitoes with insecticide-treated nets. *PLoS medicine* 4, e229.
- Killiny, N., Hajeri, S., Tiwari, S., Gowda, S., Stelinski, L.L., 2014. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PloS one* 9, e110536.
- Kleinschmidt, I., Bradley, J., Knox, T.B., Mnzava, A.P., Kafy, H.T., Mbogo, C., Ismail, B.A., Bigoga, J.D., Adechoubou, A., Raghavendra, K., 2018. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. *The Lancet infectious diseases* 18, 640-649.
- Kleywegt, G.J., Jones, T.A., 1997a. [11] Model building and refinement practice, In: *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 208-230.
- Kleywegt, G.J., Jones, T.A., 1997b. [27] Detecting folding motifs and similarities in protein structures, In: *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 525-545.
- Kleywegt, G.J., Zou, J.-Y., Divne, C., Davies, G.J., Sinning, I., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Srisodsuk, M., Teeri, T.T., Jones, T.A., 1997. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *Journal of molecular biology* 272, 383-397.
- Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics* 75, 376-386.
- Knight, K., Stone, A., 1977. *A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae)* Washington, 661 p.
- Koekemoer, L., Kamau, L., Hunt, R., Coetzee, M., 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Trop Med Hyg* 66, 804-811.
- Kollman, P.A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules:

- combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research* 33, 889-897.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect biochemistry and molecular biology* 31, 313-319.
- Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2012. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology letters* 210, 155-168.
- Kpanou, C.D., Sagbohan, H.W., Dagnon, F., Padonou, G.G., Ossè, R., Salako, A.S., Sidick, A., Sewadé, W., Sominahouin, A., Condo, P., 2021. Characterization of resistance profile (intensity and mechanisms) of *Anopheles gambiae* in three communes of northern Benin, West Africa. *Malaria Journal* 20, 1-12.
- Kriesner, P., Hoffmann, A.A., Lee, S.F., Turelli, M., Weeks, A.R., 2013. Rapid sequential spread of two *Wolbachia* variants in *Drosophila simulans*. *PLoS pathogens* 9, e1003607.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874.
- Kurtovic, L., Atre, T., Feng, G., Wines, B.D., Chan, J.-A., Boyle, M.J., Drew, D.R., Hogarth, P.M., Fowkes, F.J., Bergmann-Leitner, E.S., 2020. Multifunctional Antibodies Are Induced by the RTS, S Malaria Vaccine and Associated With Protection in a Phase 1/2a Trial. *The Journal of infectious diseases*.
- Lacroix, L., Lazar, V., BIDART, J.-M., 2005. Méthodes d'analyse de l'expression des gènes à haut débit: les puces à ADN. *La Lettre du sénologue*, 15-19.
- Lander, E.S., 2016. The heroes of CRISPR. *Cell* 164, 18-28.
- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, P., Yen, J., Sofer, L., Lind, R., Sabourault, C., Madi-Ravazzi, L., 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect biochemistry and molecular biology* 33, 701-708.
- Leach, A.R., Shoichet, B.K., Peishoff, C.E., 2006. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *Journal of medicinal chemistry* 49, 5851-5855.
- Lee, K.-S., Cox-Singh, J., Brooke, G., Matusop, A., Singh, B., 2009. *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *International journal for parasitology* 39, 1125-1128.

- Lee, S.J., Ter Kuile, F.O., Price, R.N., Luxemburger, C., Nosten, F., 2017. Adverse effects of mefloquine for the treatment of uncomplicated malaria in Thailand: A pooled analysis of 19, 850 individual patients. *PloS one* 12, e0168780.
- Lesk, A.M., Chothia, C., 1980. How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *Journal of molecular biology* 136, 225-270.
- Li-Byarlay, H., Li, Y., Stroud, H., Feng, S., Newman, T.C., Kaneda, M., Hou, K.K., Worley, K.C., Elsik, C.G., Wickline, S.A., 2013. RNA interference knockdown of DNA methyltransferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 12750-12755.
- Li, T., Liu, L., Zhang, L., Liu, N., 2014. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific reports* 4, 1-9.
- 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.
- Liang, X., Liu, J., Bian, G., Xi, Z., 2020. *Wolbachia* inter-strain competition and inhibition of expression of cytoplasmic incompatibility in mosquito. *Frontiers in Microbiology* 11, 1638.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lindsay, S.W., Thomas, M.B., Kleinschmidt, I., 2021. Threats to the effectiveness of insecticide-treated bednets for malaria control: thinking beyond insecticide resistance. *The Lancet Global Health*.
- Liu, G.-Y., Ju, X.-L., Cheng, J., 2010. Selectivity of Imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling. *Journal of molecular modeling* 16, 993-1002.
- Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual review of entomology* 60, 537-559.
- Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F., Li, T., 2015. Cytochrome P450s—Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide biochemistry and physiology* 120, 77-81.
- Liu, N., Li, T., Reid, W.R., Yang, T., Zhang, L., 2011. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Plos one* 6, e23403.
- Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Denholm, I., Han, Z., Millar, N.S., 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in

- Nilaparvata lugens (brown planthopper). Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 8420-8425.
- Livak, K.J., 1984. Organization and mapping of a sequence on the Drosophila melanogaster X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. Genetics 107, 611-634.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. methods 25, 402-408.
- Lovett, B., Bilgo, E., Millogo, S.A., Ouattarra, A.K., Sare, I., Gnambani, E.J., Dabire, R.K., Diabate, A., Leger, R.J.S., 2019. Transgenic Metarhizium rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. Science 364, 894-897.
- Loy, D.E., Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Plenderleith, L.J., Sundararaman, S.A., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2017. Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. International journal for parasitology 47, 87-97.
- Lucas, E.R., Rockett, K.A., Lynd, A., Essandoh, J., Grisales, N., Kemei, B., Njoroge, H., Hubbart, C., Rippon, E.J., Morgan, J., 2019. A high throughput multi-locus insecticide resistance marker panel for tracking resistance emergence and spread in Anopheles gambiae. Scientific Reports 9, 1-10.
- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L.-a., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, Aedes aegypti. Insect biochemistry and molecular biology 35, 861-871.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.-a., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H., 2011. The role of the Aedes aegypti Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect biochemistry and molecular biology 41, 203-209.
- Lumjuan, N., Stevenson, B.J., Prapanthadara, L.-a., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W., Ranson, H., 2007. The Aedes aegypti glutathione transferase family. Insect biochemistry and molecular biology 37, 1026-1035.
- Luong, H.N.B., Damijonaitis, A., Nauen, R., Vontas, J., Horstmann, S., 2021. Assessing the anti-resistance potential of public health vaporizer formulations and insecticide mixtures with pyrethroids using transgenic Drosophila lines. Parasites & vectors 14, 1-7.
- Lyimo, I.N., Ferguson, H.M., 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. Trends in parasitology 25, 189-196.

- Macias, V.M., Ohm, J.R., Rasgon, J.L., 2017. Gene drive for mosquito control: where did it come from and where are we headed? *International journal of environmental research and public health* 14, 1006.
- MacKerell Jr, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack Jr, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B* 102, 3586-3616.
- Manguin, S., Bangs, M., Pothikasikorn, J., Chareonviriyaphap, T., 2010. Review on global co-transmission of human Plasmodium species and Wuchereria bancrofti by Anopheles mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 159-177.
- Manguin, S., Garros, C., Dusfour, I., Harbach, R., Coosemans, M., 2008. Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of Anopheles subgenus Cella in Southeast Asia: an updated review. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 489-503.
- Manoukis, N.C., Diabate, A., Abdoulaye, A., Diallo, M., Dao, A., Yaro, A.S., Ribeiro, J.M., Lehmann, T., 2009. Structure and dynamics of male swarms of Anopheles gambiae. *Journal of medical entomology* 46, 227-235.
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Sélior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yébakima, A., Corbel, V., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PloS one* 7, e30989.
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., Brengues, C., Yébakima, A., Ranson, H., Corbel, V., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC genomics* 10, 1-14.
- Marinotti, O., Calvo, E., Nguyen, Q.K., Dissanayake, S., Ribeiro, J., James, A.A., 2006. Genome-wide analysis of gene expression in adult Anopheles gambiae. *Insect molecular biology* 15, 1-12.
- Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S.E., Perrimon, N., 2008. Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature genetics* 40, 476-483.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid

- knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology* 7, 179-184.
- Matthews, B.J., Dudchenko, O., Kingan, S.B., Koren, S., Antoshechkin, I., Crawford, J.E., Glassford, W.J., Herre, M., Redmond, S.N., Rose, N.H., 2018. Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature* 563, 501-507.
- Maude, R.J., Nguon, C., Dondorp, A.M., White, L.J., White, N.J., 2014. The diminishing returns of atovaquone-proguanil for elimination of *Plasmodium falciparum* malaria: modelling mass drug administration and treatment. *Malaria journal* 13, 1-8.
- Mellanby, K., 1992. The DDT story. The British Crop Protection Council.
- Menze, B.D., Kouamo, M.F., Wondji, M.J., Tchapgá, W., Tchoupo, M., Kusimo, M.O., Mouhamadou, C.S., Riveron, J.M., Wondji, C.S., 2020. An experimental hut evaluation of PBO-based and pyrethroid-only nets against the malaria vector *Anopheles funestus* reveals a loss of bed nets efficacy associated with GSTe2 metabolic resistance. *Genes* 11, 143.
- 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, e0163261.
- 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. *Malaria journal* 17, 1-10.
- Merzendorfer, H., 2014. ABC transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites. *Advances in insect physiology* 46, 1-72.
- Metcalf, R.L., 1971. Session I—The Inhibition of Esterases by Organophosphorus Compounds and Carbamates: Structure—activity relationships for insecticidal carbamates. *Bulletin of the World Health Organization* 44, 43.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., Rothman, I.K., 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 189, 561-563.
- Mitchell, S.N., Rigden, D.J., Dowd, A.J., Lu, F., Wilding, C.S., Weetman, D., Dadzie, S., Jenkins, A.M., Regna, K., Boko, P., 2014. Metabolic and target-site mechanisms combine to confer strong DDT resistance in *Anopheles gambiae*. *PloS one* 9, e92662.
- Mitchell, S.N., Stevenson, B.J., Müller, P., Wilding, C.S., Egyir-Yawson, A., Field, S.G., Hemingway, J., Paine, M.J., Ranson, H., Donnelly, M.J., 2012. Identification and

- validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6147-6152.
- Mogi, M., 2007. Insects and other invertebrate predators. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23, 93-109.
- 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, 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.
- Morgan, J.C., Irving, H., Okedi, L.M., Steven, A., Wondji, C.S., 2010. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PloS one* 5, e11872.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-958, 960, 962.
- Mouchet, J., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., Sircoulon, J., 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde Paris, 448 p.
- Mugenzi, L.M., Menze, B.D., Tchouakui, M., Wondji, M.J., Irving, H., Tchoupo, M., Hearn, J., Weedall, G.D., Riveron, J.M., Cho-Ngwa, F., 2020. A 6.5-kb intergenic structural variation enhances P450-mediated resistance to pyrethroids in malaria vectors lowering bed net efficacy. *Molecular Ecology* 29, 4395-4411.
- Muleya, V., Hayeshi, R., Ranson, H., Abegaz, B., Bezabih, M.-T., Robert, M., Ngadjui, B.T., Ngandeu, F., Mukanganyama, S., 2008. Modulation of *Anopheles gambiae* Epsilon glutathione transferase activity by plant natural products in vitro. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 23, 391-399.
- N'Guessan, R., Odjo, A., Ngufor, C., Malone, D., Rowland, M., 2016. A chlorfenapyr mixture net interceptor® G2 shows high efficacy and wash durability against resistant mosquitoes in West Africa. *PLoS One* 11, e0165925.
- Nauen, R., 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 63, 628-633.

- Nauen, R., Denholm, I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* 58, 200-215.
- Nchetnkou, C.M., Nyabeyeh, H.N., Tonga, C., Kangam, L., Foko, L.P.K., Nono, L.K., Yamadji, L.A.N., Kemajou, G.M., Bayoi, C.N., Mbongo, T.A.D., 2021. Economic burden and prevalence of malaria in companies in Douala, Cameroon.
- Ndo, C., Kopya, E., Irving, H., Wondji, C., 2019. Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum*. *Wellcome Open Research* 4.
- Ngongang-Yipmo, E.S., Tchouakui, M., Menze, B.D., Mugenzi, L.M., Njiokou, F., Wondji, C.S., 2022. Reduced performance of community bednets against pyrethroid-resistant *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae*, major malaria vectors in Cameroon.
- Nkemngo, F.N., Mugenzi, L.M., Terence, E., Niang, A., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Nguete, N.D., Tchapgá, W., Irving, H., Ntabi, J.D., 2020. Multiple insecticide resistance and *Plasmodium* infection in the principal malaria vectors *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae* in a forested locality close to the Yaoundé airport, Cameroon. *Wellcome Open Research* 5.
- Nkya, T.E., Poupardin, R., Laporte, F., Akhouayri, I., Mosha, F., Magesa, S., Kisinza, W., David, J.P., 2014. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasit Vectors* 7, 480.
- Norris, L.C., Norris, D.E., 2011. Efficacy of long-lasting insecticidal nets in use in Macha, Zambia, against the local *Anopheles arabiensis* population. *Malaria journal* 10, 1-11.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* 302, 205-217.
- Nwane, P., Etang, J., Chouaïbou, M., Toto, J.C., Mimpfoundi, R., Simard, F., 2011. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* ss populations in Cameroon: spread of the L1014F and L1014S mutations. *BMC research notes* 4, 1-9.
- Ochomo, E., Bayoh, M., Brogdon, W., Gimnig, J., Ouma, C., Vulule, J., Walker, E., 2013. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* ss and *Anopheles arabiensis* in western Kenya: phenotypic, metabolic and target site characterizations of three populations. *Medical and veterinary entomology* 27, 156-164.
- Okello, P.E., Van Bortel, W., Byaruhanga, A.M., Correwyn, A., Roelants, P., Talisuna, A., d'Alessandro, U., Coosemans, M., 2006. Variation in malaria transmission intensity in

- seven sites throughout Uganda. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75, 219-225.
- OMS, 2005. World malaria report 2005. World Health Organization and UNICEF.
- OMS 2011. Directives pour le traitement du paludisme (Genève: OMS).
- OMS, 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. World Health Organization.
- OMS 2015. Status report on artemisinin and ACT resistance, September 2015 (World Health Organization).
- OMS, 2016a. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.
- OMS, 2016b. World malaria report 2015. World Health Organization.
- OMS 2017. Report of the twentieth WHOPEP working group meeting, WHO/HQ, Geneva, 20–24 March 2017 (World Health Organization).
- OMS, 2018. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018).
- OMS, 2020. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges, In: World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges.
- OMS, 2021. World malaria report 2021.
- Orihuela, P.L.S., Vassena, C.V., Zerba, E.N., Picollo, M.I., 2014. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of medical entomology* 45, 298-306.
- Ortelli, F., Rossiter, L.C., Vontas, J., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 373, 957-963.
- Oxborough, R.M., Seyoum, A., Yihdego, Y., Dabire, R., Gnanguenon, V., Wat'Senga, F., Agossa, F.R., Yohannes, G., Coleman, S., Samdi, L.M., 2019. Susceptibility testing of *Anopheles* malaria vectors with the neonicotinoid insecticide clothianidin; results from 16 African countries, in preparation for indoor residual spraying with new insecticide formulations. *Malaria journal* 18, 1-11.
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics* 12, 87-98.
- Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M.J., Lu, P., Liang, X., Zhang, F., Raikhel, A.S., Xi, Z., 2018. The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish

- a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. The ISME journal 12, 277-288.
- Panini, M., Manicardi, G.C., Moores, G., Mazzoni, E., 2016. An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal* 13, 326-335.
- Parajuli, K., Hanchana, S., Inwong, M., Pukrittayakamee, S., Chimire, P., 2009. Comparative evaluation of microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspected malaria patients of Nepal. *Nepal Medical College Journal* 11, 23-27.
- Pates, H., Curtis, C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 53-70.
- Peiris, H., Hemingway, J., 1993. Characterization and inheritance of elevated esterases in organophosphorus and carbamate insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sri Lanka. *Bulletin of Entomological Research* 83, 127-132.
- Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J., 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect biochemistry and molecular biology* 41, 411-422.
- Pierri, C.L., Parisi, G., Porcelli, V., 2010. Computational approaches for protein function prediction: a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804, 1695-1712.
- Pignatelli, P., Ingham, V., Balabanidou, V., Vontas, J., Lycett, G., Ranson, H., 2018. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect molecular biology* 27, 110-122.
- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.A., Corrêa, A.S., Guedes, R.N.C., 2012. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Pest Management Science* 68, 1368-1373.
- Pluess, B., Tanser, F.C., Lengeler, C., Sharp, B.L., 2010. Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane database of systematic reviews*.
- PMI, 2019. The President's Malaria Initiative (PMI)/VectorLink Project. The PMI VectorLink Cameroon Annual Entomology Report: October 2018–September 2019. Rockville, MD. The PMI VectorLink Project, Abt Associates., P 74.
- PMI, 2020. U.S. President's Malaria Initiative Cameroon Malaria Operational Plan FY 2020. Retrieved from ([www.pmi.gov](http://www.pmi.gov)). P 124.
- PNLP, 2020. rapport d'activités 2019 du programme national de lutte contre le paludisme. P63.

- Pontes, F.J., Maia, R.T., Lima, M.C.P., Ayres, C.F., Soares, T.A., 2016. The role of the conformational dynamics of glutathione S-transferase epsilon class on insecticide resistance in *Anopheles gambiae*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27, 1602-1615.
- Ranson, H., Claudianos, C., Orтели, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R., 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179-181.
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods in enzymology* 401, 226-241.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F., 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect molecular biology* 9, 491-497.
- Ranson, H., Lissenden, N., 2016. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol* 32, 187-196.
- Ranson, H., Rossiter, L., Orтели, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J., 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 359, 295-304.
- Reid, W., O'Brochta, D.A., 2016. Applications of genome editing in insects. *Current opinion in insect science* 13, 43-54.
- Riddick, D.S., Lee, C., Ramji, S., Chinje, E.C., Cowen, R.L., Williams, K.J., Patterson, A.V., Stratford, I.J., Morrow, C.S., Townsend, A.J., 2005. Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 1083-1096.
- Riveron, J.M., Chiumia, M., Menze, B.D., Barnes, K.G., Irving, H., Ibrahim, S.S., Weedall, G.D., Mzilahowa, T., Wondji, C.S., 2015. Rise of multiple insecticide resistance in *Anopheles funestus* in Malawi: a major concern for malaria vector control. *Malaria journal* 14, 1-9.
- Riveron, J.M., Ibrahim, S.S., Mulamba, C., Djouaka, R., Irving, H., Wondji, M.J., Ishak, I.H., Wondji, C.S., 2017. Genome-wide transcription and functional analyses reveal heterogeneous molecular mechanisms driving pyrethroids resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7, 1819-1832.

- 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, 252-257.
- Riveron, J.M., Tchouakui, M., Mugenzi, L., Menze, B.D., Chiang, M.-C., Wondji, C.S., 2018. Insecticide resistance in malaria vectors: an update at a global scale, In: *Towards malaria elimination-a leap forward*. IntechOpen.
- Riveron, J.M., Yunta, C., Ibrahim, S.S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B.D., Ismail, H.M., Hemingway, J., Ranson, H., 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, F., Ezekiel, M.P., Spencer, S.A., Meredith, R.F., Bonner, J.A., Khazaeli, M., Saleh, M.N., Carey, D., LoBuglio, A.F., Wheeler, R.H., 2001. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *Journal of clinical oncology* 19, 3234-3243.
- Robert, V., Read, A., Essong, J., Tchuinkam, T., Mulder, B., Verhave, J.-P., Carnevale, P., 1996. Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90, 621-624.
- Roberts, D.R., Andre, R.G., 1994. Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50, 21-34.
- Rodhain, F., Perez, C., 1985. *Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs*.
- Rowe, G.E., Margaritis, A., Wei, N., 2003. Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnology progress* 19, 1439-1443.
- Sadasivaiah, S., Tozan, Y.i., Breman, J.G., 2007. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: how can it be used for malaria control? *Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77 (6) of American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Salgado, V.L., Irving, S.N., Miller, T., 1983. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, 169-182.

- Šali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* 234, 779-815.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal* 9, 283-300.
- Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus research* 102, 65-74.
- Santos, A., Cabezas, M., Tavares, A., Xavier, R., Branco, M., 2015. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*.
- Sarma, N., Patouillard, E., Cibulskis, R.E., Arcand, J.-L., 2019. The economic burden of malaria: revisiting the evidence. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 101, 1405.
- Sauboin, C.J., Van Bellinghen, L.-A., Van De Velde, N., Van Vlaenderen, I., 2015. Potential public health impact of RTS, S malaria candidate vaccine in sub-Saharan Africa: a modelling study. *Malaria journal* 14, 1-17.
- Saul, A., 2007. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Current Opinion in Infectious Diseases* 20, 476-481.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schlagenhauf, P., Adamcova, M., Regep, L., Schaerer, M.T., Rhein, H.-G., 2010. The position of mefloquine as a 21 st century malaria chemoprophylaxis. *Malaria journal* 9, 1-15.
- Schlitzer, M., 2008. Antimalarial drugs—what is in use and what is in the pipeline. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry* 341, 149-163.
- Schmid, R.S., Yokota, Y., Anton, E., 2006. Generation and characterization of brain lipid-binding protein promoter-based transgenic mouse models for the study of radial glia. *Glia* 53, 345-351.
- Scholte, E.-J., Knols, B.G., Takken, W., 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of invertebrate pathology* 91, 43-49.
- Scholte, E.-J., Ng'Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G.F., Knols, B.G., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308, 1641-1642.

- Scott, J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect biochemistry and molecular biology* 29, 757-777.
- Scott, M.L., Hribar, L.J., Leal, A.L., McAllister, J.C., 2021. Characterization of Pyrethroid Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* from the Florida Keys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 104, 1111.
- Searle, M.S., Embrey, K.J., 1990. Sequence-specific interaction of Hoescht 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Research* 18, 3753-3762.
- Serazin, A.C., Dana, A.N., Hillenmeyer, M.E., Lobo, N.F., Coulibaly, M.B., Willard, M.B., Harker, B.W., Sharakhov, I.V., Collins, F.H., Ribeiro, J.M., 2009. Comparative analysis of the global transcriptome of *Anopheles funestus* from Mali, West Africa. *PLoS One* 4, e7976.
- Sevestre, J., Bernardi, C., Gillet, M., Delaunay, P., Fanjat, Y., Toni, G., Marty, P., Alunni, V., Pomares, C., 2021. Post-mortem diagnosis of imported malaria in France: a case report. *Malaria Journal* 20, 1-4.
- Sheehan, D., Meade, G., FOLEY, V.M., DOWD, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal* 360, 1-16.
- Shou-Min, F., 2012. Insect glutathione S-transferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. *Bull Insectol* 65, 265-271.
- Sinden, R., Hartley, R., Winger, L., 1985. The development of *Plasmodium ookinetes* in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology* 91, 227-244.
- Singh, B., Sung, L.K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D.J., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* 363, 1017-1024.
- Singh, D.K., 2012. *Pesticide chemistry and toxicology*, Vol 1. Bentham Science Publishers.
- Singh, R.P., Banerjee, S., Rao, A.R., 2001. Modulatory influence of *Andrographis paniculata* on mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidant status. *Phytotherapy Research* 15, 382-390.
- Sinka, M., Bangs, M., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C., Hemingway, J., Patil, A., Temperley, W., Gething, P., Kabaria, C., Burkot, T., Harbach, R., Hay, S., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* 5, 69.

- Sippl, M.J., 1993a. Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures. *Journal of computer-aided molecular design* 7, 473-501.
- Sippl, M.J., 1993b. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 17, 355-362.
- Smith, T., Schellenberg, J.A., Hayes, R., 1994. Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic. *Statistics in medicine* 13, 2345-2358.
- Somers, J., Nguyen, J., Lumb, C., Batterham, P., Perry, T., 2015. In vivo functional analysis of the *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor D $\alpha$ 6 using the insecticide spinosad. *Insect biochemistry and molecular biology* 64, 116-127.
- 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, 1955.
- Stevenson, B.J., Pignatelli, P., Nikou, D., Paine, M.J., 2012. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1595.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.-P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S.P., Hemingway, J., Black IV, W.C., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology* 38, 113-123.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y., Zhang, Y., 2017. Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Frontiers in physiology* 8, 608.
- Suscovich, T.J., Fallon, J.K., Das, J., Demas, A.R., Crain, J., Linde, C.H., Michell, A., Natarajan, H., Arevalo, C., Broge, T., 2020. Mapping functional humoral correlates of protection against malaria challenge following RTS, S/AS01 vaccination. *Science translational medicine* 12.
- Tabachnick, W., 2003. Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases. *Journal of Medical Entomology* 40, 597-606.
- Tabue, R., Nem, T., Atangana, J., Bigoga, J., Patchoke, S., Tchouine, F., Fodjo, B., Leke, R., Fondjo, E., 2014. *Anopheles ziemanni* a locally important malaria vector in Ndop health district, north west region of Cameroon. *Parasites & Vectors* 7, 262.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.

- Tang, A.H., Tu, C., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *Journal of Biological Chemistry* 269, 27876-27884.
- Tantely, M.L., Le Goff, G., Boyer, S., Fontenille, D., 2016. An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite* 23.
- Tchakounte, A., Tchouakui, M., Mu-Chun, C., Tchapgá, W., Kopia, E., Soh, P.T., Njiokou, F., Riveron, J.M., Wondji, C.S., 2019. Exposure to the insecticide-treated bednet PermaNet 2.0 reduces the longevity of the wild African malaria vector *Anopheles funestus* but GSTe2-resistant mosquitoes live longer. *PLoS One* 14, e0213949.
- Tchigossou, G.M., Atoyebi, S.M., Akoton, R., Tossou, E., Innocent, D., Riveron, J., Irving, H., Yessoufou, A., Wondji, C., Djouaka, R., 2020. Investigation of DDT resistance mechanisms in *Anopheles funestus* populations from northern and southern Benin reveals a key role of the GSTe2 gene. *Malaria Journal* 19, 1-12.
- Tchouakui, M., Chiang, M.-C., Ndo, C., Kuicheu, C.K., Amvongo-Adjia, N., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Kusimo, M.O., Riveron, J.M., Wondji, C.S., 2019. A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher *Plasmodium* infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Scientific reports* 9, 1-12.
- Tchouakui, M., Mugenzi, L., D Menze, B., Khaukha, J., Tchapgá, W., Tchoupo, M., Wondji, M., Wondji, C. 2021. Pyrethroid Resistance Aggravation in Ugandan Malaria Vectors Is Reducing Bednet Efficacy. *Pathogens* 2021, 10, 415 (s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published ...).
- Tchouakui, M., Riveron, J.M., Djonabaye, D., Tchapgá, W., Irving, H., Soh Takam, P., Njiokou, F., Wondji, C.S., 2018. Fitness costs of the glutathione S-transferase epsilon 2 (L119F-GSTe2) mediated metabolic resistance to insecticides in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Genes* 9, 645.
- Testud, F., Grillet, J., 2007. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrétroïdes de synthèse et divers. *Encycl med chir* 16, 059-C-010.
- Thairu, M., Skidmore, I., Bansal, R., Nováková, E., Hansen, T., Li-Byarlay, H., Wickline, S., Hansen, A., 2017. Efficacy of RNA interference knockdown using aerosolized short interfering RNAs bound to nanoparticles in three diverse aphid species. *Insect molecular biology* 26, 356-368.
- Thany, S.H., 2010. Neonicotinoid insecticides, In: *Insect nicotinic acetylcholine Receptors*. Springer, pp. 75-83.

- Thompson, D.A., Lehmler, H.-J., Kolpin, D.W., Hladik, M.L., Vargo, J.D., Schilling, K.E., LeFevre, G.H., Peeples, T.L., Poch, M.C., LaDuca, L.E., 2020. A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts* 22, 1315-1346.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Troczka, B.J., Singh, K.S., Zimmer, C.T., Vontas, J., Nauen, R., Hayward, A., Bass, C., 2021. Molecular innovations underlying resistance to nicotine and neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*.
- Uhel, F., Zafrani, L., 2019. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation* 28, 464-472.
- Van Brussel, J., van Steenbrugge, G.J., Romijn, J., Schröder, F., Mickisch, G., 1999. Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *European journal of cancer* 35, 664-671.
- Verdonk, M.L., Chessari, G., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Nissink, J.W.M., Taylor, R.D., Taylor, R., 2005. Modeling water molecules in protein– ligand docking using GOLD. *Journal of medicinal chemistry* 48, 6504-6515.
- Vezenegho, S.B., Chiphwanya, J., Hunt, R.H., Coetzee, M., Bass, C., Koekemoer, L.L., 2013. Characterization of the *Anopheles funestus* group, including *Anopheles funestus*-like, from Northern Malawi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 107, 753-762.
- Vivekanandhan, P., Thendralmanikandan, A., Kweka, E., Mahande, A., 2021. Resistance to temephos in *Anopheles stephensi* larvae is associated with increased cytochrome P450 and  $\alpha$ -esterase genes overexpression. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1-6.
- Vontas, J., Katsavou, E., Mavridis, K., 2020. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104666.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., Ranson, H., 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 126-131.

- Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* 357, 65-72.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., Hemingway, J., 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* 362, 329-337.
- Wadapurkar, R.M., Vyas, R., 2018. Computational analysis of next generation sequencing data and its applications in clinical oncology. *Informatics in Medicine Unlocked* 11, 75-82.
- Walker, T., Johnson, P., Moreira, L., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F., McMeniman, C., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., 2011. The w Mel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476, 450-453.
- Wamba, A.N., Ibrahim, S.S., Kusimo, M.O., Muhammad, A., Mugenzi, L.M., Irving, H., Wondji, M.J., Hearn, J., Bigoga, J.D., Wondji, C.S., 2021. The cytochrome P450 CYP325A is a major driver of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in Central Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103647.
- Wang, C., Bradley, P., Baker, D., 2007. Protein–protein docking with backbone flexibility. *Journal of molecular biology* 373, 503-519.
- Wang, J.-y., McCommas, S., Syvanen, M., 1991. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics MGG* 227, 260-266.
- Wang, Y., Qiu, L., Ranson, H., Lumjuan, N., Hemingway, J., Setzer, W.N., Meehan, E.J., Chen, L., 2008. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *Journal of structural biology* 164, 228-235.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics* 10, 57-63.
- Wang, Z., Zhu, J., 2004. Correlation of martensitic transformation and surface mechanical behavior with cavitation erosion resistance for some iron-based alloys. *Wear* 256, 1208-1213.
- Ware, G.W., Whitacre, D.M., 2004. An introduction to insecticides. *The pesticide book* 6.

- Warren, G.L., Andrews, C.W., Capelli, A.-M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M.H., Lindvall, M., Nevins, N., Semus, S.F., Senger, S., 2006. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of medicinal chemistry* 49, 5912-5931.
- Weedall, G.D., Mugenzi, L.M., Menze, B.D., Tchouakui, M., Ibrahim, S.S., Amvongo-Adjia, N., Irving, H., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Djouaka, R., 2019. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine* 11.
- Wei, S., Clark, A., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect biochemistry and molecular biology* 31, 1145-1153.
- Whalon, M., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R., 2008. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. *Global pesticide resistance in arthropods* 5, 31.
- Whitbread, A.K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., Board, P.G., 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods in enzymology* 401, 78-99.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Phyo, A.P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., Jittamala, P., Jeeyapant, A., Jain, J.P., Lefèvre, G., Li, R., 2014. Spiroindolone KAE609 for falciparum and vivax malaria. *New England Journal of Medicine* 371, 403-410.
- Wicht, K.J., Mok, S., Fidock, D.A., 2020. Molecular mechanisms of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Annual review of microbiology* 74, 431-454.
- Wilkes, T., Matola, Y., Charlwood, J., 1996. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Medical and veterinary entomology* 10, 108-110.
- Willingham, A.T., Keil, T., 2004. A tissue specific cytochrome P450 required for the structure and function of *Drosophila* sensory organs. *Mechanisms of development* 121, 1289-1297.
- Wirtz, R., Burkot, T., Graves, P., Andre, R., 1987. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *Journal of medical entomology* 24, 433-437.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-138.
- Wondji, C.S., Coleman, M., Kleinschmidt, I., Mzilahowa, T., Irving, H., Ndula, M., Rehman, A., Morgan, J., Barnes, K.G., Hemingway, J., 2012. Impact of pyrethroid resistance on

- operational malaria control in Malawi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19063-19070.
- 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 dieltrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect biochemistry and molecular biology* 41, 484-491.
- Wondji, C.S., Hearn, J., Irving, H., Wondji, M.J., Weedall, G., 2022. RNAseq-based gene expression profiling of the *Anopheles funestus* pyrethroid-resistant strain FUMOZ highlights the predominant role of the duplicated CYP6P9a/b cytochrome P450s. *G3* 12, jkab352.
- Wondji, C.S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N.F., Collins, F.H., Hunt, R.H., Coetzee, M., Hemingway, J., Ranson, H., 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome research* 19, 452-459.
- Wong, S.-L., 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current opinion in biotechnology* 6, 517-522.
- 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, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* 28, 249-268.
- Xu, J., Wang, X.-F., Chen, P., Liu, F.-T., Zheng, S.-C., Ye, H., Mo, M.-H., 2016. RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes* 7, 88.
- Yang, T., Li, T., Feng, X., Li, M., Liu, S., Liu, N., 2021. Multiple cytochrome P450 genes: conferring high levels of permethrin resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports* 11, 1-10.
- Youmsi, G., Marlène, J., 2018. Contribution des anophèles à la transmission de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* à Madagascar. Mise en place d'une plateforme expérimentale pour l'étude de leur compétence vectorielle. Sorbonne université,
- Zaim, M., Guillet, P., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology* 18, 161-163.
- Zaw, M.T., Lin, Z., 2019. Human *Plasmodium knowlesi* infections in South-East Asian countries. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 52, 679-684.

- Zhang, J., Khan, S.A., Heckel, D.G., Bock, R., 2017. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in biotechnology* 35, 871-882.
- Zhu, F., Sams, S., Mural, T., Haynes, K.F., Potter, M.F., Palli, S.R., 2012. RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced insecticide resistance in the bed bug, *Cimex lectularius*. *PloS one* 7, e31037.
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J.D., Grisé, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., Roux, K.H., 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441, 847-852.

**ANNEXES**

## Annexe 1 : Clés d'identification des d'anophèles adultes

### 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>			

## Annexe 2 : Listes des amorces utilisées

### a) Amorces utilisées pour l'identification moléculaire des espèces du groupe *Funestus*

Amorces	Séquences (5' → 3')	Espèce identifiée	Taille (pb)
UV	TGT GAA CTG CAG GAC ACAT	-	-
FUN	GCA TCG ATG GGT TAA TCA TG	<i>An. funestus</i>	505
VAN	TGT CGA CTT GGT AGC CGA AC	<i>An. vaneedeni</i>	587
RIV	CAA GCC GTT CGA CCC TGA TT	<i>An. rivulorum</i>	411
PAR	TGC GGT CCC AAG CTA GGT TC	<i>An. Parensis</i>	252
LEES	TAC ACG GGC GCC ATG TAG TT	<i>An. Leelsoni</i>	146
RIVLIKE	CCG CCT CCC GTG GAG TGG GGG	<i>An. rivulorum-like</i>	313

### b) Liste des amorces utilisées pour déterminer le profil d'expression des GSTes par PCR quantitative

Gènes	Noms des amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (bp)
GSTe1	qGSTe1 Sens	GCGCTTCATTACGGAAGTGG	151
	qGSTe1 Antisens	AAAATCAGCGATAGTCATTTGC	
GSTe2	qGSTe2 Sens	GTTTGAAGCAGTTGCCATACTACGAGG	101
	qGSTe2 Antisens	TCAAGCTTTAGCATTTTCCTCCTTTTTGGC	
GSTe3	qGSTe3 Sens	CCAACCGTTTTGGCATATCT	197
	qGSTe3 Antisens	TTTCTCACTGAGTACTTTGCCTTTT	
GSTe4	qGSTe4 Sens	ATTGCGATTCTATGCGGAAC	218
	qGSTe4 Antisens	GCTTCGGATAGTTGGCTTCA	
GSTe5	qGSTe5 Sens	ACGAGCAGCTTAACCAGGAA	187
	qGSTe5 Antisens	CCGTGTCTGCTTTTCTGTGA	
GSTe6	qGSTe6 Sens	GGAGGTGACTGTTCGTGGAT	161
	qGSTe6 Antisens	TCCGTCCTCGAAGGTAGGTA	
GSTe7	qGSTe7 Sens	GGTACCGCTGGACGAGACTA	182
	qGSTe7 Antisens	TTAGATTGGAGATTCTATCCCTTG	
GSTe8	qGSTe8 Sens	TACCGATCGATGCCGAAC	169
	qGSTe8 Antisens	TATTTTGCGCAACTTTTCCA	

**c) Liste des amorces utilisées pour l'étude de la diversité génétique des GSTes**

<b>Gènes</b>	<b>Noms des amorces</b>	<b>Séquences</b>	<b>Taille de l'amplicon (bp)</b>
GSTe1	GSTe1 Sens	GCGCTTCATTACGGA ACTGG	916
	GSTe1 Antisens	AAAATCAGCGATAGTCATTTGC	
GSTe2	GSTe2 Sens	GTTTGAAGCAGTTGCCATACTACGAGG	850
	GSTe2 Antisens	TCAAGCTTTAGCATTTTCCTCCTTTTTGGC	
GSTe3	GSTe3 Sens	CCAACCGTTTTGGCATATCT	785
	GSTe3 Antisens	TTTCTCACTGAGTACTTTGCCTTTT	
GSTe4	GSTe4 Sens	ATTGCGATTCTATGCGGAAC	844
	GSTe4 Antisens	GCTTCGGATAGTTGGCTTCA	
GSTe5	GSTe5 Sens	ACGAGCAGCTTAACCAGGAA	857
	GSTe5 Antisens	CCGTGTCTGCTTTTTCTGTGA	
GSTe6	GSTe6 Sens	GGAGGTGACTGTTCGTGGAT	1033
	GSTe6 Antisens	TCCGTCCTCGAAGGTAGGTA	
GSTe7	GSTe7 Sens	GGTACCGCTGGACGAGACTA	728
	GSTe7 Antisens	TTAGATTGGAGATTCTATCCCTTG	
GSTe8	GSTe8 Sens	TACCGATCGATGCCGAAC	768
	GSTe8 Antisens	TATTTTGCGCAACTTTTCCA	

**d) Liste des amorces utilisées pour la synthèse des ADN doubles brin des GSTes**

<b>Gènes</b>	<b>Noms des amorces</b>	<b>Séquences</b>	<b>Taille de l'amplicon (bp)</b>
<b>GSTe2</b>	dsGSTe2 Sens	taatac gactcactatagg gaga ACGGA ACTTGTGTTTTTCGC	473
	dsGSTe2 Antisens	taatac gactcactatagg gaga TTGCTGGTGGGTGATAGTGA	
<b>GSTe3</b>	dsGSTe3 Sens	taatac gactcactatagg gaga CCGCAAGAGAAAATCGACTC	308
	dsGSTe3 Antisens	taatac gactcactatagg gaga TAACCTGGGACAAACCTTCG	
<b>GSTe4</b>	dsGSTe4 Sens	taatac gactcactatagg gaga ATTGCGATTCTATGCGGAAC	413

	dsGSTe4 Antisens	taatacgactcactatagggaga CTTGCAGTTGATTTGCAGGA	
<b>GSTe5</b>	dsGSTe5 Sens	taatacgactcactatagggaga TAGCTGCATCGCAACGATAG	302
	dsGSTe5 Antisens	taatacgactcactatagggaga CCGTGTCTGCTTTTCTGTGA	
<b>GSTe6</b>	dsGSTe6 Sens	taatacgactcactatagggaga GTGAAATCCCGGAGGAAAAT	315
	dsGSTe6 Antisens	taatacgactcactatagggaga ACGCCTCAATCAAAGTGGTC	
<b>GSTe7</b>	dsGSTe7 Sens	taatacgactcactatagggaga GAATCGTTATCACCGCCAGT	359
	dsGSTe7 Antisens	taatacgactcactatagggaga CGGGAATTTAGTCTCGTCCA	
<b>GSTe8</b>	dsGSTe8 Sens	taatacgactcactatagggaga AGCATACCTTTGCCATACCG	364
	dsGSTe8 Antisens	taatacgactcactatagggaga CCAACCTCGATTCTGGTCGTT	

**e) Liste des amorces utilisées pour l'expression transgénique des GSTes chez les drosophiles**

Gènes	Noms des amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (bp)
GSTe3	GSTe3-BglII F	<u>AGATCT</u> ATGGCACCGATCGTTTTGTA	850
	GSTe3- XbaI R	<u>TCTAGA</u> TTATACTTTGCCGAGCTTCT	
GSTe4	GSTe4-BglII F	<u>AGATCT</u> ATGCCATCGACCATTAAGTT	785
	GSTe4- XbaI R	<u>TCTAGAT</u> CACTTAGATTTTGCACGAT	
GSTe6	GSTe6-BglII F	<u>AGATCT</u> ATGTCTAAGAAGCAGGTTCT	857
	GSTe6- XbaI R	<u>TCTAGA</u> TTAATTCGCACTATTCTTTG	

**f) Liste des amorces utilisées pour l'expression des protéines recombinantes des GSTes**

<b>Gènes</b>	<b>Noms des amorces</b>	<b>Séquences</b>	<b>Taille de l'amplicon (bp)</b>
<b>GSTe1</b>	GSTe1-NdeI F	GAATTC <b>CATATG</b> CCTAAGCTAGTGCTATA	916
	GSTe1-XhoI R	CCG <b>CTCGAG</b> TTAAACTTTTGCTTTCGTAT	
<b>GSTe3</b>	GSTe3-NdeI F	GAATTC <b>CATATG</b> GCACCGATCGTTTTGTA	850
	GSTe3-XhoI R	CCG <b>CTCGAG</b> TTATACTTTGCCGAGCTTCT	
<b>GSTe4</b>	GSTe4-NdeI F	GAATTC <b>CATATG</b> CCATCGACCATTAAGTT	785
	GSTe4-EcoRI R	CCG <b>GAATTC</b> ACTTAGATTTTGCACGAT	
<b>GSTe6</b>	GSTe6-NdeI F	GAATTC <b>CATATG</b> TCTAAGAAGCAGGTTCT	844
	GSTe6-XhoI R	CCG <b>CTCGAG</b> TTAATTCGCACTATTCTTTG	
<b>GSTe7</b>	GSTe7-NdeI F	GAATTC <b>CATATG</b> GACAAGCTGGTGTTGTA	857
	GSTe7-XhoI R	CCG <b>CTCGAG</b> TCACAAATACTGTGAAGCAT	

### Annexe 3 : liste des gènes différentiellement exprimés lors de la résistance croisée DDT-permethrine

#### a) Liste des gènes différentiellement exprimés au Cameroun lors de la résistance croisée DDT-permethrine

	ID des Gènes	FC ([Rp] vs [Rddt])	Description
<b>Gènes surexprimés</b>	AFUN017741	15.587959	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017765	24.807547	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017743	16.25705	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017737	14.020776	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017574	7.613681	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017756	5.596585	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017336	11.796383	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN010220	2.0599177	Ornithine decarboxylase 1
	AFUN016252	2.2633421	NA
	AFUN021932	1.5017865	Peroxydase 14
	AFUN015966	1.5626017	Cytochrome P450, <i>CYP325A</i>
	AFUN014318	1.5864193	NA
	AFUN022209	1.7754643	Phospholipase A2
	AFUN016787	1.8100652	tRNA-Ser pour l' anticodon AGA
	AFUN016457	1.6353623	Protéine salivaire D7
	AFUN019636	2.390741	NA
	AFUN019590	2.1915233	NA
<b>Gènes sous exprimés</b>	AFUN018669	-2.8696635	NA
	AFUN018844	-1.6577433	Facteur de coagulation, FA9
	AFUN002277	-2.6796584	Protéine odorante
	AFUN017623	-2.2219305	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN015275	-9.692202	NA
	AFUN021561	-2.0741463	NA
	AFUN018859	-2.5157685	Hexamerin-1.1
	AFUN017108	-3.2575352	tRNA-Val for anticodon CAC
	AFUN021871	-3.1633754	NA
	AFUN019223	-2.1574721	Bovin, TEKT4
	AFUN016158	-1.5113468	UDP-glucuronosyl-transférase, <i>UD2A3</i>
	AFUN016757	-2.3624623	tRNA-Thr pour l' anticodon AGU
	AFUN019317	-2.00401	Protéine ransmembranaire emp24

FC ([Rperm]) : facteur de changement des moustiques résistants à la perméthrine ; FC([Rddt]) : facteur de changement des moustiques résistants au DDT.

**b) Liste des gènes différentiellement exprimés au Ghana lors de la résistance croisée  
DDT-permethrine**

	<b>ID des Gènes</b>	<b>FC ([Rp] vs [Rddt])</b>	<b>Description</b>
<b>Gènes surexprimés</b>	AFUN021325	1.5028327	Protéine de l'hémolymphe, P27K
	AFUN015186	1.6101412	Protéine de l'interaction GSK3-beta in,
	AFUN019847	1.6285688	Protéine du choc thermique , HSP90
	AFUN017484	2.0182884	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN018423	1.8434883	tRNA-Ser pour l'anticodon CGA
	AFUN008339	1.6796623	protéine régulée par le glucose, GRP-94
	AFUN019660	1.5367527	Ubiquitine, UBIQ1
	AFUN011065	1.6808943	NA
	AFUN000046	1.5007594	Isomérase, PDIA6
	AFUN020453	1.6042627	NA
	AFUN001129	1.9502834	Protéine régulée par l'ecdystéroïde
	AFUN015292	1.5647336	NA
	AFUN003291	1.5232863	NA
	AFUN019689	1.7178811	Ribonucléase, RNH1
	AFUN016757	1.5662625	tRNA-Thr pour l'anticodon AGU
	AFUN019720	1.5636328	Facteur d'initiation de la transcription, <i>TAF13</i>
	AFUN014924	1.531763	NA
<b>Sous exprimés</b>	AFUN021134	-2.0330873	protéine de liaison au rétinaldéhyde
	AFUN009738	-2.4548316	Protéine odorante, <i>OBP47</i>
	AFUN019089	-2.2794962	NA
	AFUN018991	-5.7070584	NA
	AFUN010097	-2.0184186	NA
	AFUN017021	-2.6483355	Précurseur du microRNA
	AFUN018399	-2.2500498	tRNA-His for anticodon GUG
	AFUN019021	-2.086617	Précurseur de la collagénase
	AFUN008749	-3.1838536	NA
	AFUN018858	-2.1941888	NA
	AFUN003966	-2.339823	Récepteur Scavenger
	AFUN009897	-2.704369	NA
	AFUN011132	-2.2574177	protéine pickpocket, PPK28
	AFUN019167	-13.814865	NA
	AFUN005380	-2.43218	NA
	AFUN021561	-2.5240476	NA
	AFUN021699	-2.6736994	NA
	AFUN007532	-2.68601	NA

AFUN010204	-4.7623925	NA
AFUN019628	-5.293229	NA
AFUN015929	-2.07252	NA
AFUN003002	-2.0492675	Récepteur CD36 <i>SCRB1</i>
AFUN022201	-1.6014247	Glutathion peroxydase 3
AFUN015198	-2.045808	NA
AFUN016525	-4.158567	NA
AFUN019186	-2.121283	NA
AFUN021616	-2.2311869	Protéine odorante, <i>OBP72</i>
AFUN022042	-2.4795148	Protéine pickpocket, <i>PPK11</i>
AFUN019411	-7.0906916	NA
AFUN016737	-2.9234557	tRNA-His pour l'anticodon GUG
AFUN021369	-7.0147233	métalloprotéine, <i>NAS1</i>
AFUN008922	-3.8918836	NA
AFUN006196	-3.8422039	Protéine de liaison des mammifère, <i>SF01</i>
AFUN019636	-2.1408179	NA
AFUN003809	-2.0026965	Protéine odorante OB10
AFUN014165	-4.7097044	NA
AFUN006855	-3.5193913	NA
AFUN021098	-1.5484301	cytochrome P450, <i>CYP4H19</i>

**c) Liste des gènes différentiellement exprimés en Ouganda lors de la résistance croisée DDT-perméthrine**

	ID des Gènes	FC ([Rperm] vs [Rddt])	Description
<b>Gènes surexprimés</b>	AFUN021811	1.6029985	Farnesol déshydrogénase, <i>SDR1</i>
	AFUN018396	2.8209891	tRNA-Arg pour l'anticodon UCG
	AFUN014447	2.6519194	NA
	AFUN019038	2.9406083	NA
	AFUN022115	2.9183872	NA
	AFUN017755	2.116733	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017649	3.2072444	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017328	47.045692	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN017404	2.2988944	Petite sous unité de l'ARN ribosomique
	AFUN019007	2.5040815	NA
	AFUN001292	2.464326	NA
	AFUN016153	2.8789062	Serine protéase, <i>K12H4</i>
	AFUN016265	1.7766759	Carboxylestérase

	AFUN019636	2.897606	NA
	AFUN003809	1.7066069	Protéine sensorielle, <i>CSP3</i>
<b>Gènes sous exprimés</b>	AFUN018455	-2.716616	tRNA-Tyr pour l'anticodon GUA
	AFUN008656	-2.74286	NA
	AFUN021807	-2.2841327	Farnesol déshydrogénase, <i>SDR1</i>
	AFUN017103	-11.194956	Sous unité ribosomale 5.8 S de ARN
	AFUN019152	-2.3926342	Chymotrypsine
	AFUN010685	-2.6143346	Protéine cuticulaire, <i>CUD2</i>
	AFUN018546	-2.1816304	Protéine ribosomale L42
	AFUN021434	-4.2670565	Chymotrypsine
	AFUN000679	-1.7563882	UDP-glucuronosyl transférase, <i>UD18</i>
	AFUN017551	-20.365372	Protéine de régulation de la transcription, <i>RRT15</i>
	AFUN017609	-5.4200435	Large sous unité ribosomale de l'ARN
	AFUN017348	-71.82415	Petite sous unité ribosomale de l'ARN
	AFUN020398	-2.5339777	NA
	AFUN002510	-2.1183908	phospholipase b, <i>plb1</i>
	AFUN019137	-1.5197557	Cassette d'ATP 3
	AFUN019218	-1.7663617	Cytochrome P450, <i>CYP325J1</i>
	AFUN005103	-1.5033096	Cytochrome P450, <i>CYP325F1</i>
	AFUN009877	-1.9640274	cytochrome P450, <i>CYP6Z4</i>
	AFUN007893	-1.5197845	Argininosuccinate
	AFUN003690	-1.6836315	Cytochrome P450, <i>CYP4H14</i>
	AFUN015292	-14.83721	NA
	AFUN019513	-4.584	Protéine du choc thermique 70 B2
	AFUN021369	-2.9131968	Métalloprotéine de zinc nas-1
	AFUN019428	-2.4221325	Protéine cuticulaire 1
	AFUN021584	-2.2233737	Protéinase à sérine
	AFUN020965	-3.2765036	galactosyltransférase

**d) Liste des gènes différentiellement exprimés au Malawi lors de la résistance croisée DDT-perméthrine**

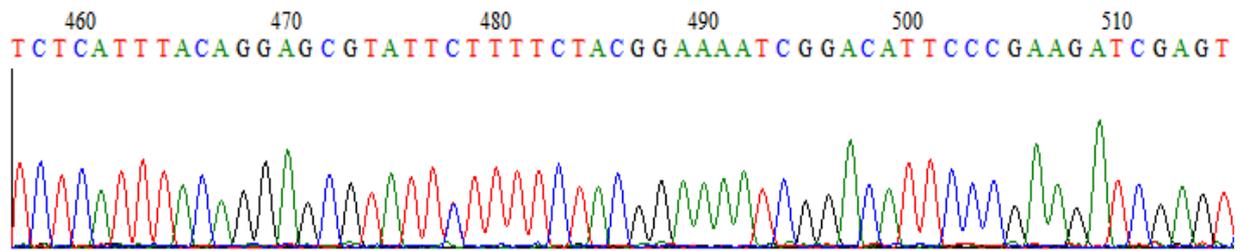
	<b>ID des Gènes</b>	<b>FC ([RDDT] vs [RPerm])</b>	<b>Description</b>
<b>Gènes surexprimés</b>	AFUN018876	2.1157522	NA
	AFUN022342	2.2446945	Purine phosphorylase
	AFUN011532	2.4156828	NA
	AFUN000597	2.3362155	Protéine transmembranaire 2
	AFUN001928	3.1728892	NA
	AFUN010835	2.7511446	Protéine odorante
	AFUN017595	2.3733828	Large sous unité ribosomale de l'ARN
	AFUN018819	2.3996756	NA
	AFUN022161	2.211473	Facteur de transcription Adf-1
	AFUN022250	5.9530497	Protéinase à sérine
	AFUN021561	3.4193678	NA
	AFUN002505	2.0876255	Actine cytoplasmique
	AFUN017045	2.1718502	NA
	AFUN015889	1.9964486	cytochrome P450, <i>CYP6P9b</i>
	AFUN021056	1.6453323	Cassette à ATP
	AFUN018393	2.298294	NA
	AFUN008615	3.0601845	Protéine odorante 1
	AFUN022201	1.8017676	Glutathion peroxydase
	AFUN019513	7.402636	Protéine du choc thermique 70 B2
	AFUN019775	2.3728209	Protéine du choc thermique 70 A1
AFUN014691	3.463066	NA	
AFUN021493	2.2095127	Formyltransférase	
AFUN003809	2.3608007	NA	
AFUN003303	1.6750257	Glutathion s-transférase, <i>GSTU3</i>	
<b>Gènes sous exprimés</b>	AFUN018981	-2.4563937	Protéase à serine 11D
	AFUN019165	-2.153628	NA
	AFUN007080	-2.7267354	Caspase, <i>CASPS6</i>
	AFUN016052	-3.2167156	Carboxylestérase
	AFUN017638	-7.4041314	Petite sous unité ribosomale de RNA
	AFUN017649	-9.002373	Large sous unité ribosomale de RNA
	AFUN010296	-3.172646	Protéinase à sérine 34
	AFUN017092	-6.0629582	Sous unité ribosomale 5S de ARN
	AFUN018655	-4.517771	Protéine odorante

AFUN021904	-3.1884897	NA
AFUN015856	-2.3378432	Protéine gustative, <i>Gr36</i>
AFUN021228	-4.417828	NA
AFUN008426	-1.6448141	Glutathion s-transférase, <i>GSTU2</i>
AFUN015895	-1.7465178	Cytochrome P450, <i>CYP4H25</i>
AFUN015768	-1.8057065	glutathion s-transférase, <i>GSTD11</i>
AFUN020922	-2.7718313	Protéine cuticulaire, <i>CPR131</i>
AFUN016306	-5.0771074	Tubuline
AFUN004331	-6.180799	NA
AFUN019401	-1.6576518	cytochrome P450, <i>CYP6M4</i>
AFUN005747	-4.2846746	Protéine cuticulaire, <i>CPF4</i>

**e) Liste des gènes différentiellement exprimés en Afrique chez les moustiques résistant à la permethrine et au DDT**

<b>Pays</b>	<b>ID des Gènes</b>	<b>Rperm] vs Rddt</b>	<b>Description</b>
<b>Cameroun</b>	AFUN015966	1.5626017	Cytochrome P450, <i>CYP325A</i>
	AFUN016457	1.6353623	Protéine salivaire, <i>D7r1</i>
<b>Ouganda</b>	AFUN021811	1.6029985	déshydrogénase/réductase
	AFUN016265	1.7766759	Carboxylestérase
<b>Ghana</b>	Aucun gène		
<b>Malawi</b>	AFUN021056	1.6453323	Cassette à ATP 3
	AFUN022201	1.8017676	glutathion peroxydase, <i>GPXH3</i>
	AFUN003303	1.6750257	Glutathion s-transférase, <i>GSTU3</i>

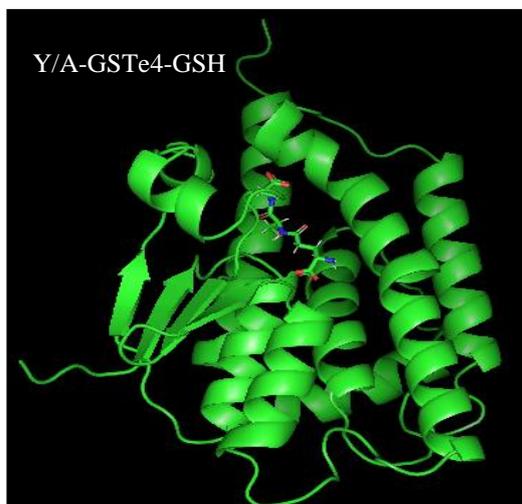
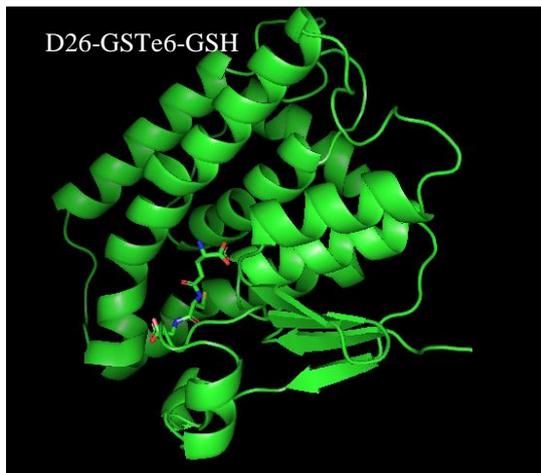
**Annexe4 : Chromatogramme d'une portion des GSTes d'*An. funestus* s.s. visualisée à partir du logiciel BioEdit**

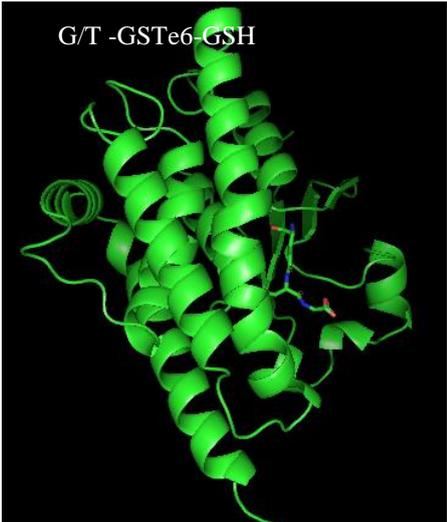
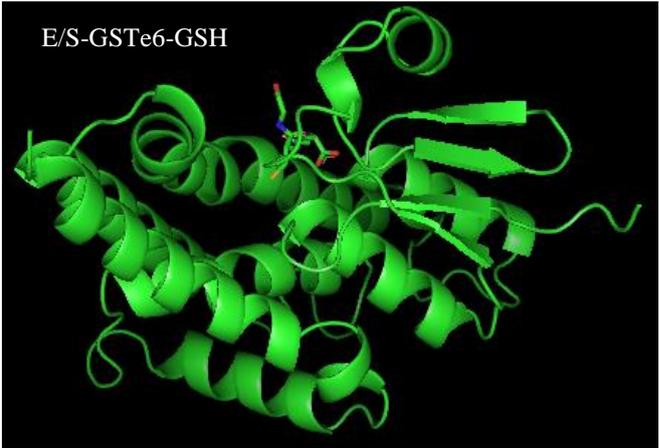


Les pics verts représentent l'adénine (A) ; rouges la thymine (T) ; bleus la cytosine (C) et noirs la guanine (G). Les chiffres désignent la position de la base sur la séquence.

### Annexe 5 : Structures 3D des allèles des GSTEs modélisées avec le glutathion attaché

Le glutathion est le cofacteur nécessaire pour que le GSTe métabolise l'insecticide. Afin de rendre actives les protéines de GSTes modélisées, le glutathion a été attaché sur leur site de fixation avant l'arrimage moléculaire avec l'insecticide qui est le ligand dans le cas de cette étude. La figure ci-contre représente les molécules de GSTes modélisées avec le glutathion attaché.





## Annexe 5 : Liste des présentations et publications scientifiques

### ✚ Liste des présentations orales et affichées à différentes conférences

Présentation Orale à la 8ème conférence annuelle de l'Association panafricaine de lutte contre les moustiques (PAMCA), du 25 au 29 septembre 2022 à *Kigali convention center* au Rwanda. Mersimine F. M. Kouamo, Sulaiman S. Ibrahim, Michael O. Kusimo , Abdullahi Muhammad, Jacob M. Riveron, Murielle J. Wondji, Helen Irving , Boudjeko T. ; Boyom F.F and Charles S. Wondji. “*Allelic variation of GSTe3, GSTe4 and GSTe6 increase insecticide resistance on Anopheles funestus*”. Présentation Orale à la 6ème conférence annuelle de l'Association panafricaine de lutte contre les moustiques (PAMCA), du 23 au 25 septembre 2019 à l'hôtel Hilton de Yaoundé, au Cameroun. Mersimine F.M. Kouamo, Michael Kusimo, Jacob M. Riveron, and Charles S. Wondji. “*Functional validation of the role of an. funestus epsilon glutathione-s-transferases in insecticide resistance*”.

3. Présentation de poster au Symposium scientifique organisé pour les 60 ans d’anniversaire du Centre Pasteur du Cameroun, Palais de congrès, 14-15 novembre 2019 ; “*Genome-Wide Transcriptional Analysis and Functional Validation Linked a Cluster of Epsilon Glutathione S-Transferases with Insecticide Resistance in the Major Malaria*”

### ✚ Liste des publications scientifiques

1. **Kouamo, M.F.M.** ; Ibrahim, S.S. ; Hearn, J. ; Riveron, J.M. ; Kusimo, M. ; Tchouakui, M. ; Ebai, T. ; Tchapgá, W. ; Wondji, M.J. ; Irving, H. ; Boudjeko T. ; Boyom F.F. ; Charles S. Wondji. Genome-Wide Transcriptional Analysis and Functional Validation Linked a Cluster of Epsilon Glutathione S-Transferases with Insecticide Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles funestus* across Africa. *Genes* 2021, 12, 561.

2. Menze, B.D.; **Kouamo, M.F.**; Wondji, M.J.; Tchapgá, W.; Tchoupo, M.; Kusimo, M.O.; Mouhamadou, C.S.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. An Experimental Hut Evaluation of PBO-Based and Pyrethroid-Only Nets against the Malaria Vector *Anopheles funestus* Reveals a Loss of Bed Nets Efficacy Associated with GSTe2 Metabolic Resistance. *Genes* 2020, 11, 143.

-Malaria prevention relies heavily on Vector control interventions through the use of long lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spray (IRS) leading to a significant reduction of malaria burden between 2000 to 2015.  
 -However, insecticide resistance in major malaria vectors such as *Anopheles funestus* is threatening the continued effectiveness of these control interventions  
 -Target site resistance and Metabolic resistance are the main resistance mechanisms.  
 -Although metabolic resistance is conferred by the overexpression of the detoxification enzymes such as cytochrome P450, GSTs and Esterases, the exact mechanisms through which these gene families confer resistance remains unclear in most cases.  
 -For *An. funestus*, progress made in elucidating the role of GSTs has so far focused only on the single GSTe2 gene detecting a key resistance markers now commonly used for resistance monitoring.  
 -RNAseq and microarray transcriptomic studies have shown that many other GST epsilon family genes are over-expressed in resistant mosquitoes across Africa.  
 -Up to date the role of GSTe3 or DDT resistance remain unclear.

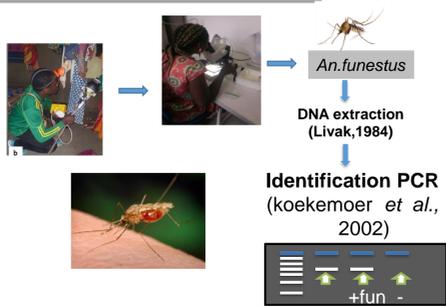
## Objectives

- ❖ Evaluate the expression profiling of the GSTe genes across Africa ;
- ❖ Detect the allelic variants of GST epsilon across Africa;
- ❖ Functional validation of the role of GSTe in conferring resistance to insecticide *in vivo*;
- ❖ Evaluate the impact of GSTe2 on the main vector control tools using the L119F marker recently designed.

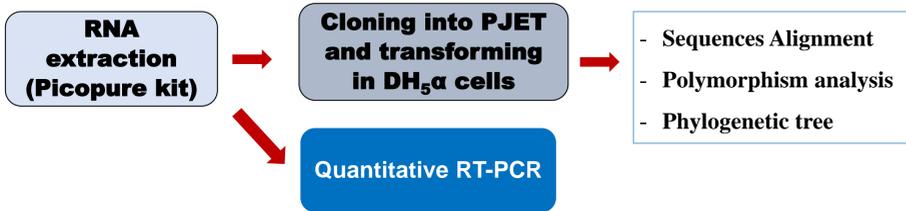
## Material and Methods

### Mosquito collection and identification

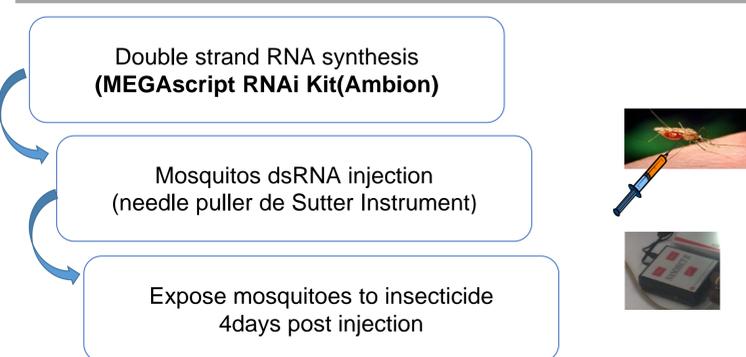
#### Study site



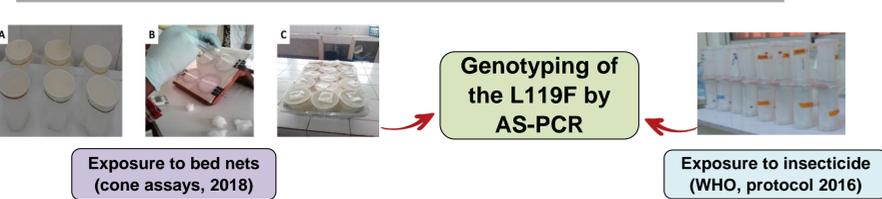
### GSTe expression profile and Polymorphism survey



### Functional validation of the role of GSTe by RNA interference



### Evaluate the impact of GSTe2 on the main vector control tools



## Results and Discussion

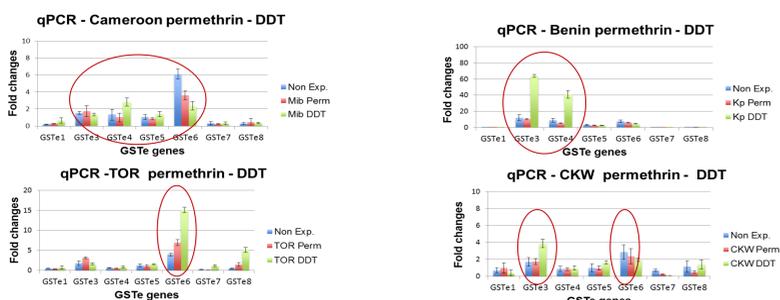


Figure 1: Expression profile of GST epsilon across Africa

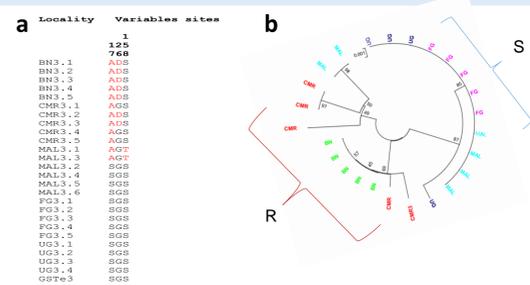


Figure 2: allelic variant of GST epsilon across Africa a) Polymorphism survey of GSTe3 , b) Phylogenetic tree of GSTe3 accross Africa

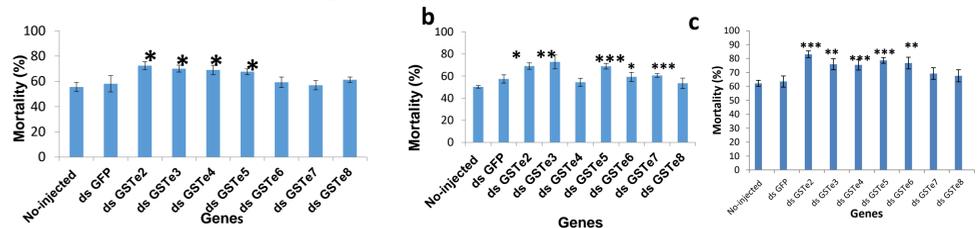


Figure 3: Functional validation of the role of GSTe by RNA interference : a) Afun Mibelon expose to Permethrin 1h , b) Afun Mibelon expose to Deltamethrin 1h , c) Afun Mibelon expose to DDT 1h

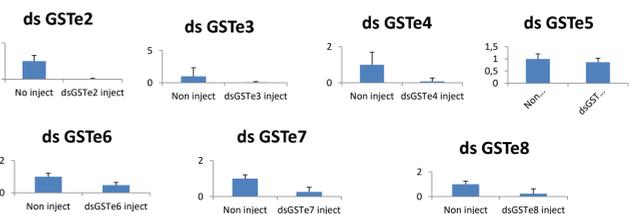


Figure 4: Confirmation of GSTe knockdown effect by quantitative RT-PCR: dsRNA injection significantly reduces the expression of the GST epsilon genes.

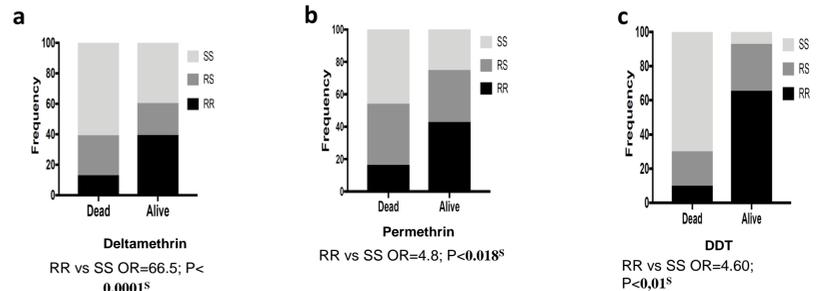


Figure 5: Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive and dead mosquitoes after exposure to: a) Deltamethrin; b) , Permethrin; c) DDT.

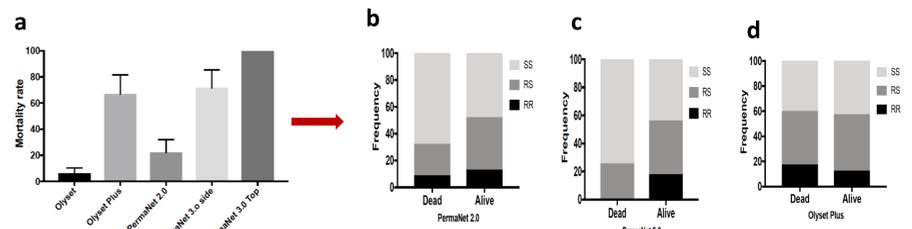


Figure 6: Association between L119F-GSTe2 mutation and ability to survive exposure to : a) LLINs efficacy testing using cone assays *An. funestus* population from Mibellon, Cameroon; and Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive and dead mosquitoes after exposure to: b) Olyset; c) PermaNet 2.0; d) PermaNet 3.0.

## Conclusion

- ❖ GST epsilon are differentially expressed in Africa and their expression is more link to DDT resistance;
- ❖ Silencing of GSTe showed an increased susceptibility to Permethrin, Deltamethrin and DDT confirming the implication of GST enzymes in insecticide resistance;
- ❖ D26G Mutation detected in GSTe3 could be useful marker of metabolic resistance;
- ❖ The higher mortality obtained with both PBO-nets suggests that, these new generation LLINs (PermaNet 3.0 and Olyset Plus) provide a better protection;
- ❖ GSTe2-mediated metabolic resistance is probably reducing the efficacy of PBO-based nets.

## References

- ❖ Ranson H., Rossiter L., Ortelli F., Jensen B., Wang X. L., Roth C. W., Collins F. H. & Hemingway J. (2011). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 359:295-304.
- ❖ Jacob M Riveron, Cristina Yunta1, ... and Charles S Wondji\*. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biology* 2014 15:R27.

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, University of Yaoundé 1, BP 812, Yaoundé, Cameroon;  
<sup>2</sup>LSTM Research Unit at the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), P.O. Box 13591, Yaoundé Cameroon;  
<sup>3</sup>Vector Biology Department, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, United Kingdom;  
 \* Corresponding author



Article

# Genome-Wide Transcriptional Analysis and Functional Validation Linked a Cluster of Epsilon Glutathione S-Transferases with Insecticide Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles funestus* across Africa

Mersimine F. M. Kouamo <sup>1,2,3,4,\*</sup> , Sulaiman S. Ibrahim <sup>1,5,6</sup> , Jack Hearn <sup>6</sup> , Jacob M. Riveron <sup>6</sup>, Michael Kusimo <sup>1</sup> , Magellan Tchouakui <sup>1</sup> , Terence Ebai <sup>1</sup>, Williams Tchapgga <sup>1</sup>, Murielle J. Wondji <sup>1,6</sup>, Helen Irving <sup>6</sup>, Thaddée Boudjeko <sup>2,3</sup>, Fabrice F. Boyom <sup>3,4</sup>  and Charles S. Wondji <sup>1,6,\*</sup> 

- <sup>1</sup> LSTM Research Unit, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé P.O. Box 13591, Cameroon; sulaimansadi.ibrahim@crid-cam.net (S.S.I.); gkusimo@gmail.com (M.K.); magellan.tchouakui@crid-cam.net (M.T.); ebai.terence@crid-cam.net (T.E.); williams.tchapgga@crid-cam.net (W.T.); murielle.wondji@lstmed.ac.uk (M.J.W.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Phytoprotection and Plant Valorisation (LPVRV), Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, Yaoundé P.O. Box 812, Cameroon; boudjeko@yahoo.com
- <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé P.O. Box 812, Cameroon; fabrice.boyom@fulbrightmail.org
- <sup>4</sup> Antimicrobial and Biocontrol Agents Unit, Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, University of Yaoundé I, Yaoundé P.O. Box 812, Cameroon
- <sup>5</sup> Department of Biochemistry, Bayero University, Kano PMB 3011, Nigeria
- <sup>6</sup> Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L35QA, UK; jack.hearn@lstmed.ac.uk (J.H.); jacob.riveron\_miranda@syngenta.com (J.M.R.); helen.irving@lstmed.ac.uk (H.I.)
- \* Correspondence: mersimine.kouamo@crid-cam.net (M.F.M.K.); charles.wondji@lstmed.ac.uk (C.S.W.); Tel.: +237-653-157-384 (C.S.W.)



**Citation:** Kouamo, M.F.M.; Ibrahim, S.S.; Hearn, J.; Riveron, J.M.; Kusimo, M.; Tchouakui, M.; Ebai, T.; Tchapgga, W.; Wondji, M.J.; Irving, H.; et al. Genome-Wide Transcriptional Analysis and Functional Validation Linked a Cluster of Epsilon Glutathione S-Transferases with Insecticide Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles funestus* across Africa. *Genes* **2021**, *12*, 561. <https://doi.org/10.3390/genes12040561>

Received: 11 February 2021  
Accepted: 9 April 2021  
Published: 13 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Resistance is threatening the effectiveness of insecticide-based interventions in use for malaria control. Pinpointing genes associated with resistance is crucial for evidence-based resistance management targeting the major malaria vectors. Here, a combination of RNA-seq based genome-wide transcriptional analysis and RNA-silencing in vivo functional validation were used to identify key insecticide resistance genes associated with DDT and DDT/permethrin cross-resistance across Africa. A cluster of glutathione-S-transferase from epsilon group were found to be overexpressed in resistant populations of *Anopheles funestus* across Africa including *GSTe1* [Cameroon (fold change, FC: 2.54), Ghana (4.20), Malawi (2.51)], *GSTe2* [Cameroon (4.47), Ghana (7.52), Malawi (2.13)], *GSTe3* [Cameroon (2.49), Uganda (2.60)], *GSTe4* in Ghana (3.47), *GSTe5* [Ghana (2.94), Malawi (2.26)], *GSTe6* [Cameroon (3.0), Ghana (3.11), Malawi (3.07), Uganda (3.78)] and *GSTe7* (2.39) in Ghana. Validation of *GSTe* genes expression profiles by qPCR confirmed that the genes are differentially expressed across Africa with a greater overexpression in DDT-resistant mosquitoes. RNAi-based knock-down analyses supported that five *GSTe* genes are playing a major role in resistance to pyrethroids (permethrin and deltamethrin) and DDT in *An. funestus*, with a significant recovery of susceptibility observed when *GSTe2*, 3, 4, 5 and *GSTe6* were silenced. These findings established that *GSTe3*, 4, 5 and 6 contribute to DDT resistance and should be further characterized to identify their specific genetic variants, to help design DNA-based diagnostic assays, as previously done for the 119F-*GSTe2* mutation. This study highlights the role of *GSTes* in the development of resistance to insecticides in malaria vectors and calls for actions to mitigate this resistance.

**Keywords:** malaria; *Anopheles funestus*; metabolic resistance; glutathioneS-transferase; RNA interference

## 1. Introduction

Malaria is the deadliest vector-borne disease, killing more than 400,000 people every year [1]. Vector control interventions through the use of long-lasting insecticide nets and the implementation of indoor residual spray have led to a significant reduction in malaria incidence, between 2000 and 2015 [2]. This gain is under threat, as the most recent WHO World Malaria Report revealed there has been increase in annual case numbers since 2016. This malaria rebound is partly due to escalation of insecticide resistance in major malaria vectors such as *An. gambiae* and *An. funestus*. This was recently shown for a population of *An. funestus* for which high resistance level to pyrethroids was associated with a significant loss of efficacy of insecticide-treated nets including PBO-based nets [3]. The main mechanisms of resistance are target-site and metabolic resistance. The molecular basis of metabolic resistance is more complex and involves among others an overexpression and/or over-activity of major detoxification genes, such as cytochrome P450s (CYP450s), glutathione-S-transferases (GSTs) and the carboxylesterases [4–6], in addition to the recently described sensory appendages proteins [7]. Several studies, including genome-wide transcriptional analyses using microarray/qPCR and functional validation have linked GST with resistance in the major malaria vectors [8–10]. However, most of these studies have concentrated on *GSTe2*, neglecting the other *GST epsilon* genes, even though they have been shown to also consistently be overexpressed [11–15]. Indeed, among the 8 potential members of the GST epsilon class, several genes have previously been shown to be overexpressed in malaria vectors including *An. gambiae* [10] and *An. funestus* [14–16]. However, apart from few validations such as for *GSTe4* in *An. gambiae* and *An. arabiensis* [17] little is known on the role of these genes in insecticide resistance. In the case of *An. funestus*, progress made has focused on the *GSTe2* gene detecting a key resistance marker (*L119F-GSTe2*) now commonly used for resistance monitoring in *An. funestus* [16]. In addition to conferring pyrethroid/DDT resistance, it was also shown that the *L119F-GSTe2*-mediated metabolic resistance to pyrethroids/DDT is associated with negative effects on some life-history traits of field populations of *An. funestus*, supporting that insecticide resistance is associated with a fitness cost [18]. An experimental hut study, using the same marker in *An. funestus* population from Mibellon (Cameroon) had confirmed that presence of the *L119F-GSTe2* was associated with resistance to DDT and pyrethroids [19] and was reducing the efficacy of bed nets [20].

RNA interference (RNAi) is one of the main approaches commonly used for *in vivo* validation of the role of detoxification enzymes in conferring resistance to insecticides in mosquitoes. This is done by injecting adult mosquitoes with double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to the gene of interest. In turn, this induces mRNA degradation via the RNAi pathway and suppresses expression of the protein [21,22]. RNAi has been used to link overexpression of cytochrome P450s and GSTs to insecticide resistance in *An. gambiae* and *Aedes* mosquitoes [23–25]. Recently, RNAi has been used to establish the role of sensory appendage proteins in the leg of *An. gambiae* in conferring pyrethroid resistance [7] confirming that this method provides a robust approach to validate the contribution of specific genes such as those of the GST epsilon, to a specific phenotype.

In this study, using a genome-wide RNA-seq-based transcriptomic analysis, we detected candidate genes associated with DDT-resistance and DDT/permethrin cross-resistance across different regions of Africa revealing the pre-eminence of GST epsilon genes. The role of epsilon class of GSTs in DDT/pyrethroid resistance was investigated in *An. funestus* population from Mibellon (Cameroon) using RNAi-mediated gene silencing. The results suggest that several members of this class in addition to *GSTe2* contribute to the overall resistance observed in the field.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Mosquito Collection and Rearing

Indoor-resting female *An. funestus* were collected early in the morning (6:00 a.m.–8:00 a.m.), using battery-powered aspirators (John. W. Hock, Gainesville, FL, USA) in

Mibellon (6°46' N, 11°70' E, Cameroon; 2015 and 2019), Obuasi (5°56' N, 1°37' W, Ghana; 2014), Kpome (6°55' N, 2°19' E, Benin, 2014), Chikwawa (16°1' S, 34°47' E, Malawi; 2014), and Tororo (0°45' N, 34°5' E, Uganda; 2014). The collection was done from randomly selected houses, following a verbal consent from the chief of the district and the household owners. Mosquitoes collected were kept in paper cups, being transported to the insectary in the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé, Cameroon. The F<sub>1</sub> generation was generated in the insectary from field blood-fed female mosquitoes using forced-egg laying method [26]. Briefly, F<sub>0</sub> gravid females were transferred into 1.5 mL Eppendorf tubes containing a wet filter paper, to enable them to lay eggs. After oviposition the parents that laid eggs were removed and used for species identification. Molecular identification to species level was carried out according to the protocol described previously [27] using genomic DNA (gDNA) extracted from F<sub>0</sub> females identified morphologically as *An. funestus*. DNA extraction was done using the Livak protocol [28]. The eggs were pooled into bowls and supplemented with TetraMin™ baby fish food. The emerged F<sub>1</sub> female progenies were mixed in cages and 2 to 5-day old females used for insecticide bioassays and double-stranded RNA (dsRNA) injection.

## 2.2. Transcriptomic Profiling of DDT Resistance across Africa Using RNA-Seq

Transcriptional profiling of *An. funestus* populations was carried out to detect key candidate genes associated with DDT resistance across Africa. This was done using mosquitoes from four African regions: Central (Mibellon/Cameroon), West (Obuasi/Ghana), Southern (Chikwawa/Malawi), and East (Tororo/Uganda). Total RNA was extracted from pools of 10 female DDT-resistant mosquitoes (alive after 24 h exposure to DDT), unexposed mosquitoes (control) and lab susceptible colony (FANG) using the Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The FANG is a fully insecticide susceptible laboratory colony [29]. In addition, RNA was extracted from 10 permethrin-resistant mosquitoes (alive after 24 h exposure to permethrin) to study the gene differentially expressed across Africa when comparing DDT vs. permethrin-resistant mosquitoes.

RNA libraries were pooled in equimolar amounts using the Qubit and Bioanalyzer data. The quantity and quality of each pool were assessed by Bioanalyzer and subsequently by qPCR using the Kapa Illumina library quantification kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), on a Light Cycler LC480II (Roche, Basel, Switzerland), according to manufacturers' instructions. The pool of libraries was sequenced on one lane of the HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) at 2 × 125 bp paired-end sequencing with v4 chemistry. Sequence library preparation, sequencing, initial processing and quality control were done by the Centre for Genomic Research, University of Liverpool, UK. Alignment to the reference sequence using the AfunF3.1 annotation. ([https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/DS\\_1a787d4361#pmids](https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/DS_1a787d4361#pmids), accessed on 7 April 2020). Data were analysed as described previously [30–32]. Differential gene expression analysis was performed using edgeR and the Strand NGS program (Strand Life Sciences, version 3.0, Hebbal, Bangalore, India).

## 2.3. Investigation of Expression Profile of GSTe Genes in *An. funestus* across Africa

The expression profiles of *GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5*, *GSTe6*, *GSTe7* and *GSTe8* in DDT and permethrin-resistant mosquitoes was assessed across Africa (Cameroon, Benin, Malawi, and Uganda), using qRT-PCR. RNA was extracted from three biological replicates from each population of 10 each of DDT-resistant females (alive 24 h after exposure to DDT), permethrin-resistant (alive 24 h after exposure to permethrin), control (*An. funestus* mosquitoes not exposed to any insecticide), as well as susceptible laboratory colony (FANG). Briefly, 1 µg of the total RNA from each of the three biological replicates was used as the template for cDNA synthesis using Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with oligo-dT20 and RNase H, according to the manufacturer's instructions. The qRT-PCR amplification was performed as described [15] using the primers provided in

Supplementary Table S2.1. The relative expression and fold change of each *GSTe* gene was calculated as previously described [33] by comparing expression in resistant, susceptible and control samples. The normalization was done with the ribosomal protein *S7*, *RPS7* (AFUN007153) and *actin5C* (AFUN006819) housekeeping genes.

#### 2.4. Functional Validation of Role of *GSTe* Genes in Resistance Using RNA Interference

##### 2.4.1. Double Strand RNA Synthesis

Double-stranded RNAs specific to *GSTe* genes of interest were synthesized for use in RNAi gene-silencing experiments. Each *GSTe* oligonucleotide primer was designed using specific cDNA of the corresponding genes downloaded from the Vector Base (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>, accessed on 8 December 2016). The T7 RNA polymerase promoter sequence, TAATACGACTCACTATAGGGAGA, was added to the 5' end of each primer (Supplementary Table S2.2). Specific *GST2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7* and *GSTe8* fragments were amplified by PCR from plasmid clones using KAPA Taq Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA). Double-stranded RNA (dsRNA) was synthesized using in vitro transcription MEGAscript<sup>®</sup> T7 Kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA) and purified using MEGAclear columns (Ambion). The purified products were concentrated by ethanol precipitation and the dsRNA was resuspended in nuclease-free water and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The successful construction of dsRNA was confirmed by running  $3\text{ }\mu\text{L}$  of dsRNA-diluted products in 1.5% agarose gel in a Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer.

##### 2.4.2. Mosquitoes Injection and Susceptibility Bioassays

To explore the role of *GSTe* genes in conferring insecticide resistance, RNAi was performed on Mibellon *An. funestus* population, by injecting sequence-specific dsRNA to 2–3 days old  $F_1$  female mosquitoes, followed by insecticide bioassay. A Nano injector (Nanoinject; Drummond, Burton, OH, USA) was used to inject *dsGSTe2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7* and *dsGSTe8* into the thorax of 2 to 3 days old female *An. funestus* mosquitoes as described [34]. Briefly, mosquitoes, induced to sleep with  $\text{CO}_2$ , were injected with 69 nL of either aliquot of above *dsGSTes* or *dsGFP* (control). Four days after injection, four replicates of 20 mosquitoes for each dsRNA were exposed to permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%) and DDT (4%) for 1 h following the WHO testing protocol [35]. Mosquitoes were transferred to holding tubes after exposure, supplemented with sugar and mortalities counted 24 h after the exposure. The susceptibility test was performed in triplicate with experimental mosquitoes comprising the mosquitoes injected with *dsGSTes* above, whereas mosquitoes injected with *dsGFP* and those not injected were used as controls.

##### 2.4.3. Quantitative RT-PCR to Confirm the Knockdown Effect

For *dsGSTe*-injected and non-injected mosquitoes, RNA was extracted from 3 pools of 5 mosquitoes using TRIzol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). cDNA from each of the three biological replicates was synthesized using the Super-Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with oligo-dT20 and RNase H, according to the manufacturer's instructions. The cDNA from each replicate treatment was then used to assess the extent of RNAi by measuring levels of gene expression after injection by qRT-PCR. To assess the knockdown efficiency after injection and quantitative difference in the level of *GSTes* expression between injected and non-injected mosquitoes, a standard curve of each gene was established using a serial dilution of cDNA. The qPCR amplification was carried out in a MX3005 real-time PCR system using Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A total of 10 ng of cDNA from each sample was used as a template in a three-step program involving a denaturation at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min followed by 40 cycles of 10 s at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 10 s at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a last step of 1 min at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 30 s at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The relative expression and fold-change of each target gene were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  Livak method [33], comparing expression in specific *dsGSTe*-injected samples to non-injected ones, after normalization with the housekeeping genes, *RPS7* (AFUN007153) and *actin5C* (AFUN006819), as described above.

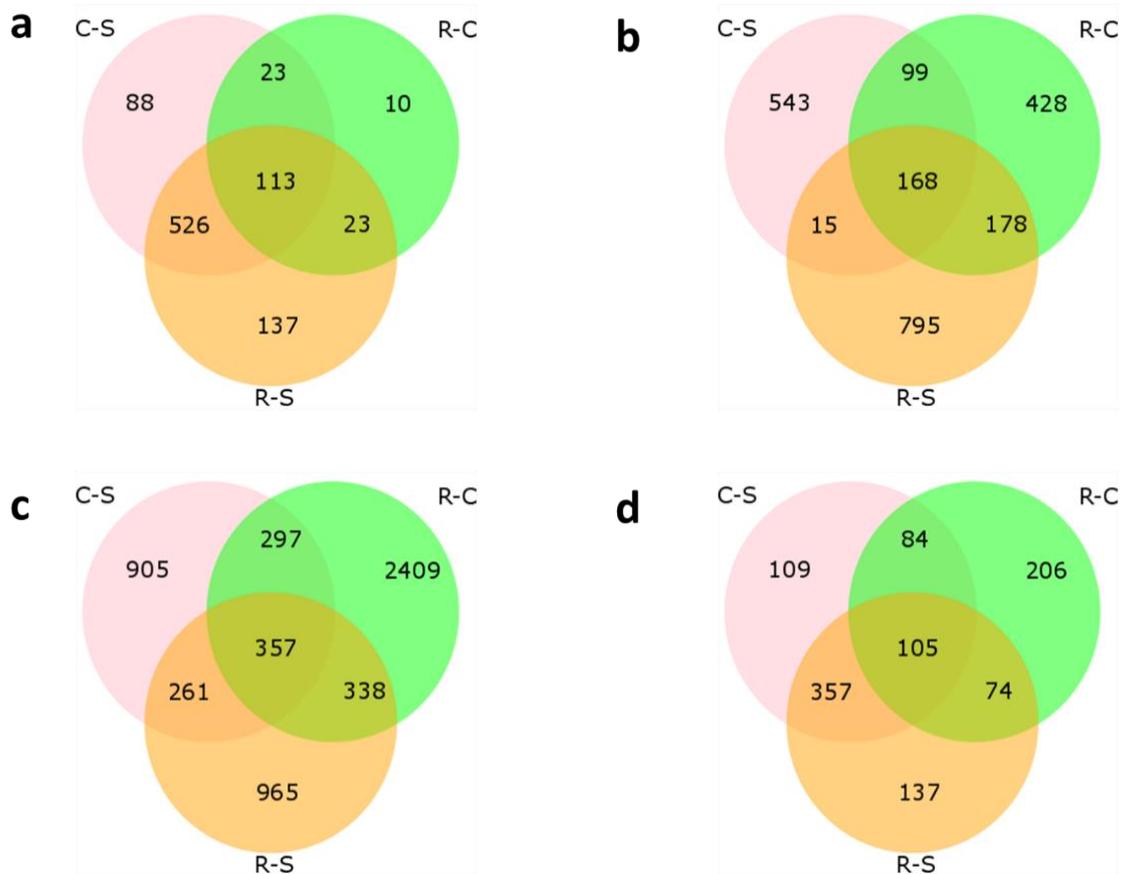
### 2.5. Data Analysis

All analyses were conducted using GraphPad Prism version 7.00, R 3.3.2. for Windows and Strand NGS program (Strand Life Sciences, version 3.0, Hebbal, Bangalore, India). Students' *t*-test was used to assess statistical differences between experimental and control groups.

## 3. Results

### 3.1. RNAseq-Based Comparative Transcriptomic Profiling of DDT Resistance across Africa

To detect genes associated with DDT resistance in *An. funestus* mosquitoes Africa-wide, transcriptional profiling of mosquitoes from different regions of Africa was performed. This comprised populations from southern (Malawi), East (Uganda), West (Ghana) and Central (Cameroon) Africa. Priority was given to the comparison between genes upregulated in DDT-resistant mosquitoes (R) and the control (C, unexposed mosquitoes) because this comparison directly focuses on the difference between mosquitoes having the same genetic background (accounting for potential induction of expression), but differing in treatment received. Attention was also given to genes that were commonly upregulated in R vs Susceptible FANG colony mosquitoes (S) and C vs S as these genes are the ones expressed constitutively in natural mosquitoes' populations. The number of differentially expressed genes in each of the four populations and the FANG susceptible strain is shown in Venn diagrams (Figure 1). Raw data from RNA-seq is deposited on sequence archive, with the following link: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB24351>, accessed on 10 January 2018.



**Figure 1.** Venn diagrams showing the number of differentially expressed genes in each population compared to the FANG susceptible colony: (a) Cameroon population, (b) Ghana population, (c) Uganda population and (d) Malawi population. R-C: genes induced upon exposure and constitutive expression (resistant vs control unexposed), C-S: constitutive differential expression (control vs susceptible); R-S: genes induced upon exposure and constitutive expression (resistant vs susceptible).

### 3.1.1. The Central Africa Population of Cameroon

The major detoxification gene families found to be overexpressed in Cameroon population are cytochrome P450s, glutathione S-transferases and carboxylesterases. When comparing resistant, susceptible and control mosquito cytochrome P450 *CYP325A* is over-expressed, followed by *CYP6P9b*, *CYP6P5*, *CYP315A1*. For GSTs, the epsilon and delta family are upregulated when comparing R-S vs. C-S expression profile. The most overexpressed GSTs are *GSTe2*, *GSTe1*, *GSTe3*, *GSTe6*, *GSTd3* and *GSTt2*. Several genes from carboxylesterase classes, e.g., an unknown COE (AFUN002514), and *COEBE3C* (AFUN016311, a glutathione peroxidase (AFUN022201), an ATP-binding cassette transporter (AFUN019220), a UDP-glucuronosyltransferase (AFUN011266), and sulfotransferase family (AFUN016207) (*SULT1B*), were also found to be overexpressed (Table 1).

**Table 1.** Detoxification genes differentially expressed in Cameroon *An. funestus* between different comparisons at false discovery rate (FDR) < 0.05 and fold change (FC) > 1.5 for genes induced upon exposure and constitutive expression (R-C) or FC > 2 for constitutive differential expression (C-S) and genes induced upon exposure and constitutive expression (R-S).

Gene ID	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN002514	2.8934693		3.4858232	Carboxylesterase, COEunkn
AFUN019220		3.755253	4.1573305	ABC transporter family A
AFUN015966		15.648611	19.80706	Cytochrome P450, <i>CYP325A</i>
AFUN015889		2.4889274	3.1110048	Cytochrome P450, <i>CYP6P9b</i>
AFUN015888		5.4777937	8.212809	Cytochrome P450, <i>CYP6P5</i>
AFUN005715		2.3714201	2.252707	Cytochrome P450, <i>CYP315A1</i>
AFUN011266		2.67154	2.5182736	UDP-glucuronosyltransferase 3A1
AFUN022201		10.439024	9.539281	Glutathione peroxidase, Short
AFUN015807		2.3210542	2.5459306	Glutathione
AFUN015808		2.4095497	2.4903498	S-transferase, <i>GSTE1</i>
AFUN015839		2.004527	2.098784	Glutathione S-transferase, <i>GSTE3</i>
AFUN016008		3.0603988	3.182327	Glutathione
AFUN007291		2.4175029	2.2559748	S-transferase, <i>GSTD3</i>
AFUN015809		3.4979115	4.4708834	Glutathione S-transferase, <i>GSTE6</i>
AFUN016207		2.297438	2.2629843	Glutathione S-transferase, <i>GSTT2</i>
AFUN008941		2.1940587		Glutathione
AFUN016311		2.155015		S-transferase epsilon 2, <i>GSTE2</i>
AFUN002978		2.058842		Sulfotransferase family
AFUN001383	1.6504059			cytosolic 1B member 1; Short
AFUN008941		2.1940587		ABC transporter family C
AFUN016311		2.155015		Carboxylesterase, <i>COEBE3C</i>
AFUN002978		2.058842		Cytochrome P450, <i>CYP314A1</i>
AFUN001383	1.6504059			Cytochrome P450, <i>CYP9J5</i>
AFUN002602			2.0370903	Cytochrome b-561 domain
AFUN006858			2.3245227	containing protein
				Cytochrome P450, <i>CYP306A1</i>

### 3.1.2. The West African Population of Ghana

Many cytochrome P450s were found to be overexpressed when comparing expression profiles of R, C and S in mosquitoes from Ghana. These include *CYP6P4a* (AFUN020895), *CYP325B/C*, *CYP4H26*, *CYP6M4*, *CYP4C36*, *CYP9K1*, *CYP9J5*, *CYP6P9b*, *CYP6P9a*, *CYP6P5* and *CYP4H17* (Table 2). In Ghana, almost all the GST epsilon clusters, *GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5*, *GSTE6* and *GSTe7*, are upregulated in C and R samples. We also note the overexpression of a sulfotransferase *SULT1B*, D7 short form salivary protein (AFUN016458), UDP-glucuronosyltransferase (AFUN011266), carboxylesterase (AFUN016367) and ATP-binding cassette transporter (AFUN019220).

**Table 2.** Detoxification genes differentially expressed in Ghana between different comparisons at FDR < 0.05 and FC > 1.5 for R-C or FC > 2 for C-S and R-S.

Genes ID	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN015830	1.5176085	2.6203227	3.976624	Cytochrome P450, <i>CYP325C</i>
AFUN015894	1.7204243	4.830863	8.311134	Cytochrome P450, <i>CYP4H26</i>
AFUN019348	2.2147367	5.578066	12.353948	Cytochrome P450, <i>CYP325B</i>
AFUN015767	1.5001847	2.0304153	3.0459979	Glutathione S-transferase, <i>GSTD11</i>
AFUN019220		3.5253153	3.8225787	ABC transporter family A
AFUN002796		2.9251132	2.0283942	Sub-family G member 1
AFUN016367		2.291519	2.4250317	Carboxylesterase, <i>COEJHE4E</i>
AFUN019401		2.4856389	2.5770857	Cytochrome P450, <i>CYP6M4</i>
AFUN004316		4.7323303	7.0621023	Cytochrome P450, <i>CYP4H17</i>
AFUN006135		2.4041867	2.1305745	Cytochrome P450, <i>CYP4C36</i>
AFUN007549		2.8564737	2.3530338	Cytochrome P450, <i>CYP9K1</i>
AFUN020895		41.131523	30.434338	Cytochrome P450, <i>CYP6P4</i>
AFUN019365		17.181461	13.95981	Cytochrome P450, <i>CYP6P4</i>
AFUN001383		3.2154377	3.093064	Cytochrome P450, <i>CYP9J5</i>
AFUN015792		3.5820096	5.169663	Cytochrome P450, <i>CYP6P9A</i>
AFUN015889		6.209893	6.1071906	Cytochrome P450, <i>CYP6P9b</i>
AFUN015888		7.485999	6.140407	Cytochrome P450, <i>CYP6P5</i>
AFUN006858		2.186648	2.5465918	Cytochrome P450, <i>CYP306A1</i>
AFUN015795		2.3312643	2.0709553	Cytochrome P450, <i>CYP6M3</i>
AFUN005715		2.0942264	2.0190682	Cytochrome P450, <i>CYP315A1</i>
AFUN019567		6.2830515	6.3453665	Cytochrome P450, <i>CYP4H18</i>
AFUN016456		2.2823555	2.137907	D7 short form salivary protein
AFUN011266		2.815869	3.8286955	UDP-glucuronosyltransferase 3A1
AFUN015807		3.92929	4.207333	Glutathione S-transferase, <i>GSTE1</i>
AFUN015808		2.9914625	2.6008918	Glutathione S-transferase, <i>GSTE3</i>
AFUN015810		3.4769716	2.789998	Glutathione S-transferase, <i>GSTE4</i>
AFUN015811		2.9477298	2.0025258	Glutathione S-transferase, <i>GSTE5</i>
AFUN015839		4.0754375	3.4843476	Glutathione S-transferase, <i>GSTD3</i>
AFUN015840		3.6762526	4.7960463	Glutathione S-transferase, <i>GSTD10</i>
AFUN016008		3.3691344	3.113351	Glutathione S-transferase, <i>GSTE6</i>
AFUN001774		2.3985367	2.0373375	Glutathione s-transferase, <i>GSTE7</i>
AFUN015809		9.269093	7.5253835	Glutathione S-transferase, <i>GSTE2</i>
AFUN008239		2.6680195	2.1065671	Sulfotransferase
AFUN016207		2.6827705	2.3955698	Sulfotransferase
AFUN010696	2.5507598		3.926304	Cytochrome b5 domain-containing protein 1
AFUN015963	1.5521032		2.153224	Cytochrome P450, <i>CYP6R1</i>
AFUN016458	2.4133177		3.0593035	D7 short form salivary protein
AFUN008338	2.4747007		3.1143987	Sulfotransferase 1C4
AFUN008852		2.1302986		Glycosyltransferase
AFUN008941	2.0767095			ABC transporter family C
AFUN021098	2.351223			Cytochrome P450, <i>CYP4H19</i>
AFUN015909	2.0092266			Cytochrome P450, <i>CYP305A3</i>
AFUN015776	2.0201716			Cytochrome P450, <i>CYP12F1</i>
AFUN001382	2.1402965			Cytochrome P450, <i>CYP9J5</i>
AFUN019845	2.144599			Glucosyl/glucuronosyl transferases
AFUN016010	2.0161536			Glutathione S-transferase, <i>GSTD1</i>
AFUN008819	2.0289357			Glutathione transferase microsomal, <i>GSTM53</i>

Table 2. Cont.

Genes ID	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN008941			2.0767095	ABC transporter family C
AFUN021098			2.351223	Cytochrome P450, <i>CYP4H19</i>
AFUN015909			2.0092266	Cytochrome P450, <i>CYP305A3</i>
AFUN015776			2.0201716	Cytochrome P450, <i>CYP12F1</i>
AFUN001382			2.1402965	Cytochrome P450, <i>CYP9J5</i>
AFUN019845			2.144599	UDP-glucuronosyltransferase 2C1
AFUN016010			2.0161536	Glutathione-S-transferase, <i>GSTD1</i>
AFUN008819			2.0289357	Glutathione-S-transferase microsomal, <i>GSTMS3</i>

### 3.1.3. The Southern Africa Population of Malawi

The most overexpressed genes in the Malawi population when comparing R to S are the two P450s *CYP6P9a* and *b* (Table 3). Besides those two genes, many other P450s, including *CYP325J1*, *CYP6M4*, *CYP6P2*, *CYP9K1*, *CYP314A1*, *CYP6N1* and cytochrome *b5*, are upregulated. For GSTs, the most overexpressed genes are from delta family, e.g., *GSTD1* and *GSTD11*. The GST epsilon family include *GSTe1*, *GSTe2*, *GSTe5* and *GSTe6*. In addition, theta family *GSTh1* was also found to be overexpressed in exposed mosquitoes. As for Central and West Africa, we also have the overexpression of carboxylesterase (AFUN016265), sulfotransferase (AFUN016207) and ATP-binding cassette transporter (AFUN019220).

**Table 3.** Detoxification genes differentially expressed in Malawi between different comparisons at FDR < 0.05 and FC > 1.5 for R-C or FC > 2 for C-S and R-S.

Genes ID	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN019523	1.507577	4.439413	6.692756	Cytochrome P450, <i>CYP325J1</i>
AFUN015889	2.5220747	16.651278	41.99576	Cytochrome P450, <i>CYP6P9b</i>
AFUN019220		3.1381407	2.659554	ABC transporter family A
AFUN016265		3.7209604	4.703569	Carboxylic ester hydrolase
AFUN019401		2.8624895	2.7167373	Cytochrome P450, <i>CYP6M4</i>
AFUN015801		2.299937	2.2996929	Cytochrome P450, <i>CYP6P2</i>
AFUN020895		6.031834	6.101497	Cytochrome P450, <i>CYP6P4</i>
AFUN015792		53.420876	49.825886	Cytochrome P450, <i>CYP6P9a</i>
AFUN002978		2.048785	2.5891387	Cytochrome P450, <i>CYP314A1</i>
AFUN010918		2.2058907	2.3527682	Cytochrome P450, <i>CYP6N1</i>
AFUN011266		2.2034643	3.0369558	UDP-glucuronosyltransferase 3A1
AFUN015839		5.0719476	3.63867	Glutathione S-transferase, <i>GSTD3</i>
AFUN016008		2.8427892	3.0745156	Glutathione S-transferase, <i>GSTE6</i>
AFUN016207		2.7247274	2.1642609	Sulfotransferase
AFUN015907		2.2404246		Cytochrome P450, <i>CYP305A3</i>
AFUN015785		2.1118221		Cytochrome P450, <i>CYP6AA2</i>
AFUN015807		2.5705426		Glutathione S-transferase, <i>GSTE1</i>
AFUN004322			2.2281806	Cytochrome b5
AFUN006135			2.3192496	Cytochrome P450, <i>CYP4C36</i>
AFUN007549			2.2119997	Cytochrome P450, <i>CYP9K1</i>
AFUN016010			2.1173494	Glutathione S-transferase, <i>GSTD1</i>
AFUN015767			2.0815623	Glutathione S-transferase, <i>GSTD11</i>
AFUN015811			2.2649431	Glutathione S-transferase, <i>GSTE5</i>
AFUN015809			2.1379018	Glutathione S-transferase epsilon 2, <i>GSTE2</i>
AFUN007291			2.0031114	Glutathione S-transferase, <i>GSTT2</i>
AFUN008239			2.3338351	Sulfotransferase
AFUN016367	1.8275834			Carboxylesterase, <i>COE/JHE4E</i>
AFUN016209	1.5197136			Sulfotransferase

### 3.1.4. The East African Population of Uganda

Here, the most overexpressed genes are cytochrome P450s, with *CYP4C26*, *CYP6P5*, *CYP6P4a*, *CYP306A1*, *CYP305A3* and *CYP315A1*. Some GST families are also significantly over-expressed when comparing R to C mosquitoes. These include *GSTD1*, *GSTD3* and *GSTe6*. However, not many GST epsilon genes are overexpressed in Uganda compared to other Africa countries, e.g., Cameroon and Ghana. Many other genes families, such as carboxyesterases, sulfotransferase, NADHP, and ATP-binding cassette transporter, are expressed in Uganda (Table 4).

**Table 4.** Detoxification genes differentially expressed in Uganda between different comparisons at FDR < 0.05 and FC > 1.5 for R-C or FC > 2 for C-S and R-S.

Genes ID	R-C	C-S	R-S	Description
AFUN019220		2.9239964	2.9306972	ABC transporter family A
AFUN000421		2.0856595	2.4146874	Carboxylesterase, <i>COEBE4C</i>
AFUN015777		3.8722458	3.1892729	Cytochrome P450, <i>CYP4C26</i>
AFUN015888		3.0184207	3.1936443	Cytochrome P450, <i>CYP6P5</i>
AFUN015839		2.9561374	2.1264198	Glutathione S-transferase, <i>GSTD3</i>
AFUN016008		3.5037928	2.787403	Glutathione S-transferase, <i>GSTE6</i>
AFUN016207		2.6702209	2.6851285	Sulfotransferase
AFUN002796		2.711219		ABC transporter sub-family G member 1;
AFUN019365		2.3760457		Cytochrome P450, <i>CYP6P4</i>
AFUN006858		2.0747128		Cytochrome P450, <i>CYP306A1</i>
AFUN011518		2.2290916		Cytochrome c oxidase assembly factor 5
AFUN015735	2.302202			Cytochrome P450, <i>CYP49A1</i>
AFUN007537	1.6417327			ABC transporter <i>ABCF3</i>
AFUN019517	1.9148197			Cytochrome P450, <i>CYP325J1</i>
AFUN019708	1.8381125			Sulfotransferase 2
AFUN019950	1.8083609			Carboxylesterase, <i>COE2580</i>
AFUN020232	1.5087312			Metalloproteinase domain-containing protein
AFUN020202	1.7750088			NADPH oxidase 5
AFUN015907			2.350208	Cytochrome P450, <i>CYP305A3</i>
AFUN005715			2.1279395	Cytochrome P450, <i>CYP315A1</i>
AFUN016010			2.034498	Glutathione S-transferase, <i>GSTD1</i>

Noticeably, the analysis of gene expression across Africa between DDT-resistant mosquito population revealed that GSTs are upregulated across the continent. The level of expression of GSTs is variable across the continent and three major families, the epsilon, the delta and the theta family, are the most overexpressed. Regarding the GST epsilon cluster specifically, we observed that all genes are up-regulated across Africa when comparing control mosquitoes versus DDT-resistant population, except for *GSTe8*.

### 3.1.5. Genes Differentially Expressed across Africa when Comparing DDT vs. Permethrin-Resistant Mosquitoes

- Cameroon (Central Africa):

Analysis of the genes significantly upregulated in DDT-resistant mosquitoes when comparing to permethrin-resistant mosquitoes revealed the presence of *CYP325A* (FC: 1.56), some eukaryotic large and small subunit ribosomal RNA (AFUN017765) (FC: 24), secretory phospholipase A2 (AFUN022209) (FC: 1.7), and D7 short form salivary protein (AFUN016457) (FC: 1.6). Some genes including the probable prefoldin subunit PFD6 (FC: −2.07), odorant-binding protein (AFUN002277) (FC: −2.6) and Hexamerin (AFUN018859) (FC: −2.51) are rather significantly downregulated in permethrin-resistant mosquitoes (Supplementary Table S1.1).

- Ghana (West Africa):

Analysis has shown that no upregulated detoxification enzyme family such as cytochrome P450s, glutathione-S-transferase or carboxylesterase is significantly over-expressed in DDT-resistant mosquitoes when compared to permethrin-resistant. However, some other genes with no known detoxification role including haemolymph protein (AFUN021325) *P27K* (FC 1.5), heat shock protein (AFUN019847) *HSP90* (FC: 1.62), and transcription initiation factor (AFUN019720) *TAF13* (FC 1.56) are upregulated in DDT-resistant mosquitoes. However, *CYP4H19* is downregulated in permethrin-resistant mosquitoes (FC: −1.54) (Supplementary Table S1.2).

- Malawi (Southern Africa):

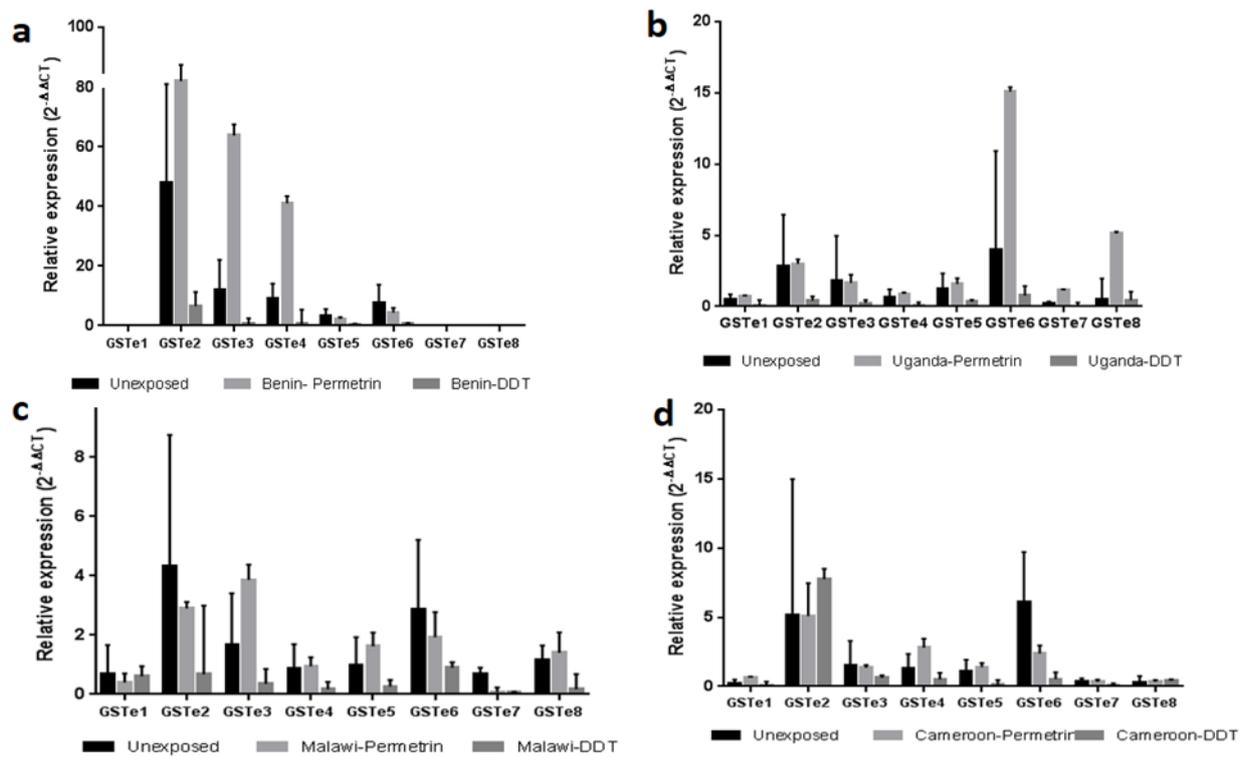
When comparing DDT vs. permethrin-resistant populations in Malawi some detoxification genes including *CYP6P9b* (FC: 1.99), *GSTU3* (FC: 1.67), glutathione peroxidase (AFUN022201) (FC: 1.8), as well as serine proteinase (AFUN022250) (FC: 5.9) and the probable prefoldin subunit 6 (AFUN021561) (FC: 3.4) are overexpressed in DDT-resistant mosquitoes. Other genes including carboxylic ester hydrolase *COEBE2C* (AFUN016052) (FC: −3.21), *CYP4H25* (FC: −1.74), *GSTD11* (FC: −1.80) and *GSTU2* (FC: −1.64) are downregulated in permethrin-resistant mosquitoes (Supplementary Table S1.3).

- Uganda (East Africa):

Comparison shows that some genes such as carboxylesterase (AFUN016265) (FC 1.77), Putative serine protease (AFUN016153) (FC 2.87), and the eukaryotic large and small subunit ribosomal RNA (AFUN017404, AFUN017328,) (with, respectively, fold change 47.04 and 3.20) are upregulated in DDT-resistant mosquitoes. Some detoxification genes including cytochromes P450 (*CYP325J1*, *CYP325Z1*, *CYP6Z4*), Zinc metalloproteinase nas-1 (AFUN021369) (FC 2.91), UDP-glucuronosyltransferase (AFUN000679) (FC: −1.75), Lactosylceramide 4- $\alpha$ -galactosyltransferase (AFUN020965) (FC: −3.27), and Heat shock protein 70 B2 (AFUN019513) (FC: −4.58) (Supplementary Table S1.4) are rather downregulated in permethrin-resistant mosquitoes.

### 3.2. qPCR Transcriptional Profiling of *GSTe* Genes in *An. funestus* across Africa

The validation of the expression profile of genes of the *GSTe* cluster across the continent was carried out using qPCR, comparing the expression level of *GSTes* between FANG, unexposed (control), permethrin-alive and DDT-alive mosquitoes after 24 h exposure. In Benin, the level of expression of *GSTe2*, *GSTe3* and *GSTe4* was significantly higher in mosquitoes resistant to DDT compared to the unexposed group and the permethrin-resistant mosquitoes (Figure 2). In Uganda, all the *GSTes* were expressed but at comparatively the same level, with the most over-expressed one being *GSTe6*, followed by *GSTe8*. As observed with Benin samples, these two genes were more expressed in mosquitoes surviving DDT exposure. In Malawi, it was observed in ascending order that the most expressed *GSTes* were *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe6*, *GSTe5* and *GSTe8*. However, except for the *GSTe6*, which was more overexpressed in mosquitoes resistant to permethrin, the level of expression of other *GSTes* was higher in DDT-resistant mosquitoes. For Cameroon, *GSTe2*, *GSTe4* and *GSTe3* were more overexpressed in DDT-alive females. Overall, these results showed that the *GSTes* are overexpressed mainly in DDT-resistant mosquitoes compared to permethrin and unexposed mosquitoes.

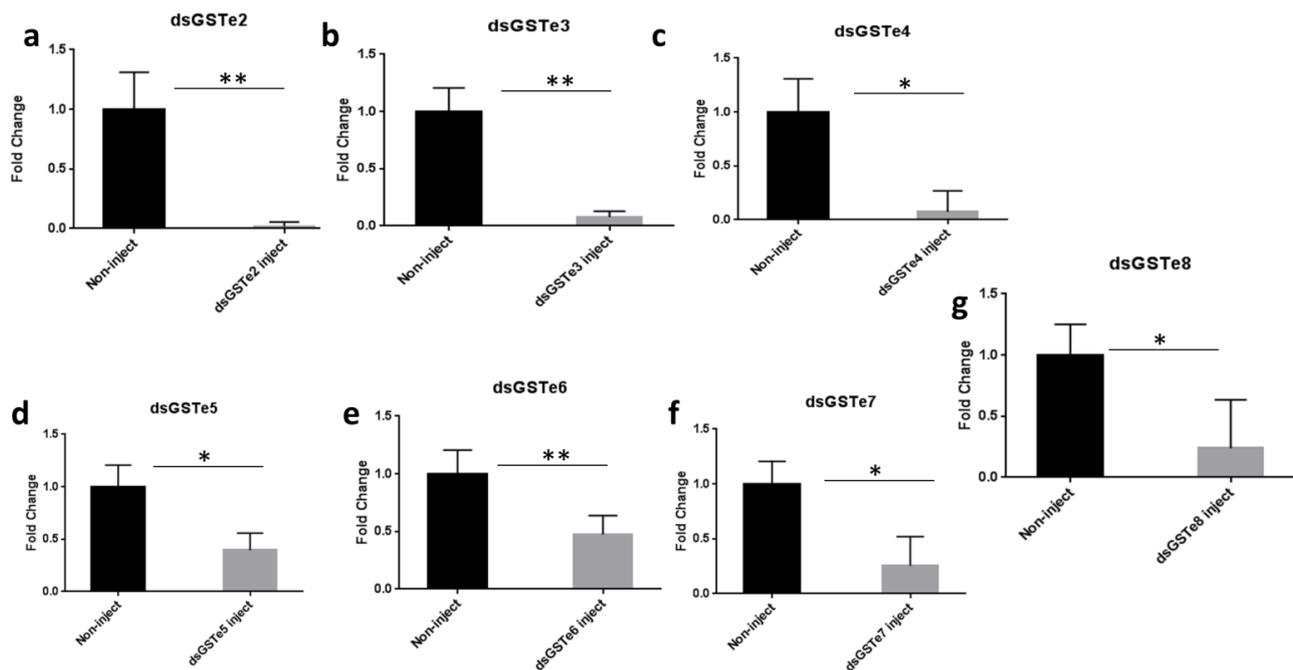


**Figure 2.** Evaluation of *GSTe* expression profile across Africa by qPCR. (a) *GSTe* expression profiles in Benin: *GSTe2*, 3 and 4 are the more expressed (b) *GSTes* expression profile in Uganda: *GSTe6*, 8, 2 and 3 are the more expressed; (c) *GSTes* expression profile in Malawi: *GSTe2*, 3, 6, 5 and 8 are the more expressed; (d) *GSTes* expression profile in Cameroon: *GSTe2*, 6, 4, 3 and *GSTe5* are the more expressed. Consistent with RNA-seq data, GST epsilons are differentially expressed, and expression level is higher in DDT-resistant mosquitoes than the control in general.

### 3.3. Functional Validation of the Role of *GSTe* Genes in Insecticide Resistance

#### 3.3.1. Confirmation of *GSTe* Knockdown Effect by qRT-PCR

To confirm whether the injection of ds*GSTes* did knock-down the expression of *GSTe* genes in vivo in mosquitoes, qPCR was performed using the cDNA from unexposed ds*GSTes* (injected) and non-injected mosquitoes with the primers of each *GSTes* cluster, using actin5C and RPS7 as housekeeping genes. As shown in Figure 3, we noticed a significant partial reduction in *GSTes* gene expression when comparing control non-exposed and double-strand *GSTe*-injected mosquitoes 4 days post-injection  $p = 0.0024$  (*GSTe2*), 0.0014 (*GSTe3*), 0.0377 (*GSTe4*), 0.0422 (*GSTe5*), 0.0014 (*GSTe6*), 0.0387 (*GSTe7*) and 0.0241 (*GSTe8*). This low expression of all the *GSTes* in mosquitoes injected compared to the non-injected supports that in vivo injection of dsRNA significantly reduces the expression of GST epsilon genes in the Mibellon *An. funestus* mosquitoes.



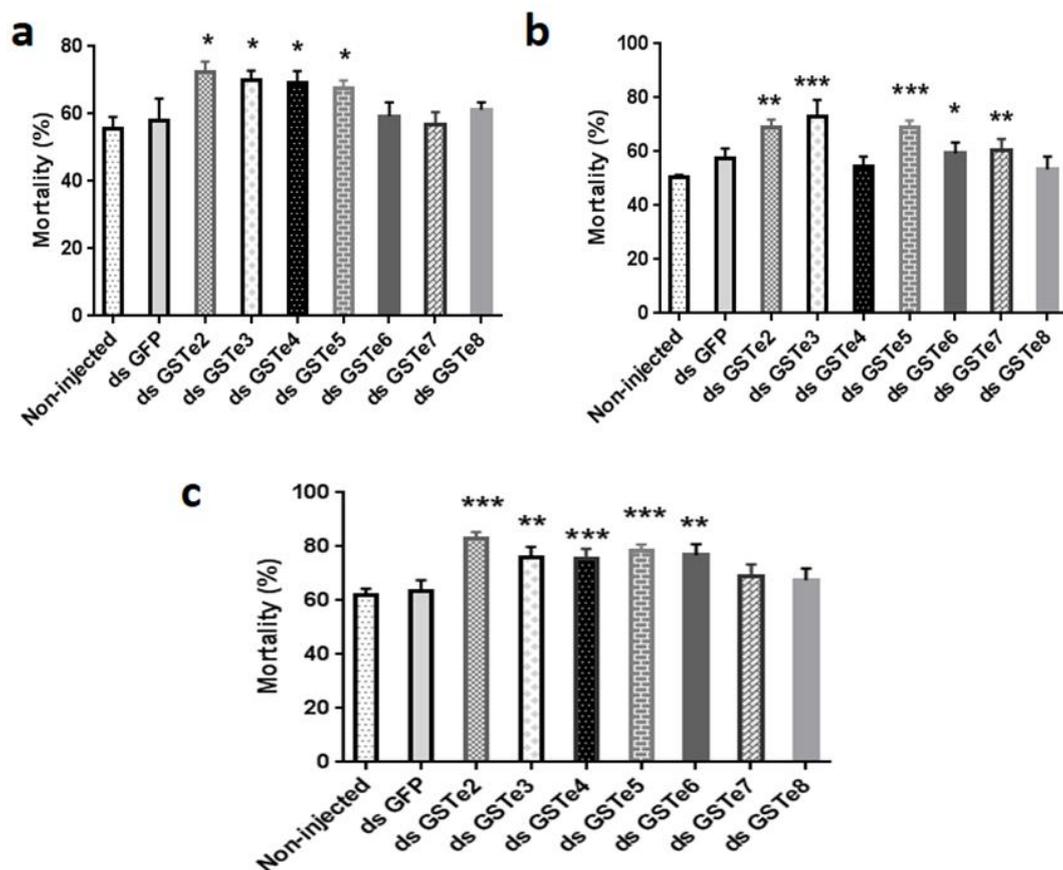
**Figure 3.** Confirmation of *GSTe* knockdown effect by quantitative RT-PCR between non-exposed double-strand injected and non-injected mosquitoes of the same age (a) dsGSTe2, (b) dsGSTe3, (c) dsGSTe4, (d) dsGSTe5, (e) dsGSTe6, (f) dsGSTe7, (g) dsGSTe8. There is low expression of all *GSTe* injected mosquitoes compared to the non-injected mosquitoes. dsRNA injection significantly reduces the expression of the *GSTe* epsilon genes. \* =  $p < 0.05$ , and \*\* =  $p < 0.01$ .

### 3.3.2. *GSTe* Knockdown Increases Susceptibility to Permethrin

Significantly higher mortalities were observed in dsGSTe2-injected mosquitoes (Mibellon *An. funestus*) exposed to permethrin ( $72.46\% \pm 3.09$ ;  $p = 0.0052$ ), compared with non-injected control mosquitoes, with mortalities of  $55.50\% \pm 3.59$  (Figure 4a). Similar patterns were seen with *GSTe3* (mortality in dsGSTe3 =  $70.09 \pm 2.75\%$ ;  $p = 0.009$ ), *GSTe4* ( $69.01 \pm 3.70\%$ ;  $p = 0.017$ ) and *GSTe5* ( $67.61 \pm 4.41\%$ ;  $p = 0.018$ ). Mortality with control mosquitoes injected with dsGFP is also  $58.09\% \pm 6.41$ . No significant difference was obtained between the mortality of mosquitoes injected with dsGSTe6 ( $59.28 \pm 4.14\%$ ;  $p = 0.25$ ), dsGSTe7 ( $56.93 \pm 3.63\%$ ;  $p = 0.39$ ) and dsGSTe8 ( $61.25 \pm 2.16\%$ ;  $p = 0.13$ ) compared to control mosquitoes exposed to permethrin. The mortality rate did not vary significantly between non-injected and mosquitoes injected with dsGFP, indicating that injection did not affect the survival of mosquitoes. These findings showed that *GSTe2*, 3, 4 and 5 are playing a major role in permethrin resistance in this *An. funestus* population.

### 3.3.3. *GSTe* Knockdown Increases Susceptibility to Deltamethrin

Exposure of dsGSTes-injected mosquitoes to deltamethrin (Figure 4b) revealed that the mortality rate was higher in dsGSTe2 ( $69.06 \pm 2.92\%$ ;  $p = 0.026$ ), dsGSTe3 ( $72.87 \pm 6.29\%$ ;  $p = 0.0001$ ), dsGSTe5 ( $68.92 \pm 2.58\%$ ;  $p = 0.000038$ ), dsGSTe6 ( $59.28 \pm 4.14\%$ ;  $p = 0.018$ ) and dsGSTe7-injected mosquitoes ( $60.53 \pm 1.63\%$ ;  $p = 0.00039$ ) compared to non-injected ( $50.25\% \pm 1.18$ ) and dsGFP-injected mosquitoes ( $57.40 \pm 3.78\%$ ). No significant differences were observed in *GSTe4* ( $54.41 \pm 3.68\%$ ;  $p = 0.11$ ) and *GSTe8*-injected mosquitoes ( $53.49 \pm 4.73\%$ ;  $p = 0.22$ ) compared to the control non-injected ones. This result showed that knock-down of *GSTes* increased mosquito susceptibility to deltamethrin except for *GSTe4* and *GSTe8* where no impact was observed.



**Figure 4.** GSTe knockdown increases susceptibility to insecticides; bioassay result of mosquitoes after injection and exposure to (a) permethrin, (b) deltamethrin and (c) DDT. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , and \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 3.3.4. GSTe Knockdown Increases Susceptibility to DDT

By exposing double-strand *GSTes*-injected mosquitoes to DDT, we observed a significant difference between the mortality rates of *GSTe2* ( $83.05 \pm 2.39\%$ ;  $p = 0.0001$ ), *GSTe3* ( $75.87 \pm 3.99\%$ ;  $p = 0.0036$ ), *GSTe4* ( $75.45 \pm 3.72\%$ ;  $p = 0.00052$ ), *GSTe5* ( $78.68 \pm 2.11\%$ ;  $p = 0.00038$ ) and *GSTe6* ( $76.78 \pm 4.19\%$ ;  $p = 0.003$ ) knocked-down mosquitoes compared to the non-injected mosquitoes ( $62.21 \pm 2.16\%$ ) and dsGFP-injected mosquitoes ( $63.52 \pm 4.01\%$ ) (Figure 4c). Knockdowns of *GSTes* genes family in Mibellon mosquitoes increased resistance to DDT excepted for *GSTe7* and *GSTe8*. From these results, we concluded that GST epsilon genes are playing a role in *An. funestus* insecticide resistance.

## 4. Discussion

Understanding of the dynamics of resistance development, the potential of some candidate genes to confer cross-resistance between insecticide classes and designing suitable diagnostic tools are crucial for malaria control. The major genes linked to metabolic insecticide resistance in the major malaria vector *An. funestus*, include CYP450s, GSTs and carboxylesterase. The characterisation of these major genes provides important information enabling the understanding and the dynamic of resistance development and how and where it spreads, facilitating its management.

In this study, comparative RNAseq-based transcriptomic profiling across Africa showed key differences in the level of expression of GSTs across Africa, including the epsilon, delta and the theta class. These genes are highly expressed in West and Central Africa, in contrast to southern Africa where GSTs are found to be less overexpressed, contrary to P450s, especially the duplicated *CYP6P9a* and *-b* genes, which are highly overexpressed in this region [32]. The greater over-expression of P450s genes observed when comparing transcriptomic profiling of DDT resistance across Africa do not necessarily

indicate that this enzyme family plays the major role in DDT resistance but could be a result of the multiple resistance observed in these mosquito population with pyrethroids and carbamate resistance as reported. This is supported by the fact that previous studies, such as in *An. gambiae*, have showed little difference in mortality between bioassays done with DDT alone or after pre-exposure to the synergist PBO [36], showing that P450s may not be the main drivers of DDT resistance but more likely, GSTs in the absence of *kdr* as seen in *An. funestus* [37]. The difference in gene expression pattern observed between *An. funestus* populations is in line with previous studies done in *An. funestus* [15,32,38,39]. Transcriptional profiling using microarrays/qPCR has established higher overexpression of GSTs in populations from West Africa (Benin) compared with populations from Uganda and Malawi [15]. Among GSTs, the epsilon and delta families are the most expressed as seen also in other mosquito species [13,40], but the GST epsilon cluster is more consistently over-expressed across Africa as previously reported in *An. funestus* permethrin resistance [32]. All genes of the GST epsilon cluster are observed to be overexpressed in Africa in resistant population of *An. funestus*, but at different levels, except for *GSTe8*. This association between overexpression of *GSTes* and DDT resistance could be explained by the fact that GST plays a role in oxidative stress and its expression is elevated in the response of oxidative damage caused by xenobiotic [41]. Besides cytochrome P450 and GSTs, other gene families were involved in DDT resistance including carboxylesterases, sulfotransferase, ATP-binding factor, UDP-glucuronosyltransferase, and metalloproteinase, and the same pattern were observed in *An. gambiae* using microarray [42,43].

Silencing of *An. funestus GSTe* genes supported the role that these genes played in DDT, as well as cross-resistance they confer to pyrethroids. This is in agreement with the findings of Riveron and colleagues [16] who also revealed a cross-resistance between these insecticide classes for *GSTe2* using GAL4/UAS transgenic expression in *Drosophila* and also the association studies of the *L119F-GSTe2* genotypes and resistance phenotypes [14,16]. While the work of Riveron and other researchers [18] characterized *GSTe2*, in particular, in this study, other epsilon GSTs were investigated, confirming their role in DDT and pyrethroid resistance. This cross-resistance could be either by directly metabolising the insecticides or conferring protection from oxidative stress induced by pyrethroids using a mechanism of sequestration [44]. It could also act by detoxifying/scavenging the secondary product generated by reactive oxygen species or by directly metabolizing 4-hydroxy-nonal, an end product of lipid peroxidation, through conjugation [45].

This study has shown that knockdown of *GSTes* in *An. funestus* significantly increase susceptibility to type I and II pyrethroids, suggesting that the overexpression of *GSTes* could confer permethrin and deltamethrin resistance. This observation agrees with the results of Lumjuan in 2011, where they proved that partial knockdown of *GSTe2* and *GSTe7* in *Aedes aegypti* significantly increased susceptibility to DDT and deltamethrin [46]. This study has also supported that gene silencing through RNAi technique is a good tool to validate the role of candidate genes in insecticide resistance notably for *GSTes*.

## 5. Conclusions

The results have identified genes associated with DDT resistance in the major malaria vector *An. funestus* Africa-wide. The gene families identified as overexpressed include the cytochrome P450s commonly known to confer resistance to wide range of public health insecticide in malaria vector, carboxylesterase and glutathione-S-transferase, which are the major focus of this study. This has established that *GSTe* genes are differentially overexpressed in resistant populations of *An. funestus* across Africa, with the genes consistently more overexpressed in Western and Central Africa compared to East and Southern Africa, consistent with the higher DDT resistance known in the *An. funestus* populations from West Africa. In addition, the *GSTe2*, *GSTe3*, *GSTe4*, *GSTe5* and *GSTe6* genes were shown to confer cross-resistance to permethrin, deltamethrin and DDT explaining the multiple resistance observed in the field, highlighting the complexity of resistance and challenges associated with malaria vector control. Further studies need to be performed to detect the

genetic variants associated with the resistance conferred by the GST epsilon genes as done previously for *GSTe2*.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12040561/s1>. Supplementary file 1: Genes differentially expressed when comparing DDT (dichlo-ro-diphenyl-trichloroethane) vs permethrin-resistant individuals using RNA-seq (RNA sequencing). Table S1.1: Genes differentially expressed in Cameroon when comparing DDT vs Perm resistant mosquitoes, Table S1.2: Genes differentially expressed in Ghana when comparing DDT vs Perm resistant mosquitoes, Table S1.3: Genes differentially expressed in Uganda when comparing DDT vs Perm resistant mosquitoes, Table S1.4: Genes differentially expressed in Malawi when comparing DDT vs Perm resistant mosquitoes, Table S1.5: List of genes differentially over-expressed across Africa when comparing resistant population against Permethrin and DDT using RNAseq. Supplementary file 2: List of primers used. Table S2.1: list of primers used to evaluate GSTes expression profile across Africa, Table S2.2: list of primers used for double-stranded RNA synthesis.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.F.M.K. and C.S.W.; data curation, S.S.I., J.H. and C.S.W.; formal analysis, M.F.M.K. and J.M.R.; funding acquisition, C.S.W.; investigation, M.F.M.K., M.K., T.E., W.T., M.J.W. and H.I.; methodology, M.F.M.K. and C.S.W.; software, M.F.M.K., J.H. and C.S.W.; supervision, J.M.R., M.K., T.B., F.F.B. and C.S.W.; validation, S.S.I. and J.H.; writing—original draft, M.F.M.K.; writing—review and editing, M.F.M.K., S.S.I., J.H., M.K., M.T., T.B., F.F.B. and C.S.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by a Wellcome Trust Senior Fellowship in Biomedical Sciences to CSW, grant number 217188/Z/19/Z.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Raw data from RNAseq is deposited on sequence archive, with the following link: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB24351>, accessed on 11 February 2021. All other data is present in the manuscript and supplemental files.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. WHO. *World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress and Challenges*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020.
2. Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.E.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**, *526*, 207–211. [[CrossRef](#)]
3. Riveron, J.M.; Huijben, S.; Tchapga, W.; Tchouakui, M.; Wondji, M.J.; Tchoupo, M.; Irving, H.; Cuamba, N.; Maquina, M.; Paaijmans, K.; et al. Escalation of Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* Induces a Loss of Efficacy of Piperonyl Butoxide-Based Insecticide-Treated Nets in Mozambique. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 467–475. [[CrossRef](#)]
4. Liu, N.; Li, T.; Reid, W.R.; Yang, T.; Zhang, L. Multiple Cytochrome P450 Genes: Their Constitutive Overexpression and Permethrin Induction in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Muleya, V.; Hayeshi, R.; Ranson, H.; Abegaz, B.; Bezabih, M.-T.; Robert, M.; Ngadjui, B.T.; Ngandeu, F.; Mukanganyama, S. Modulation of *Anopheles gambiae* Epsilon glutathione transferase activity by plant natural products in vitro. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 391–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Riveron, J.M.; Tchouakui, M.; Mugenzi, L.; Menze, B.D.; Chiang, M.-C.; Wondji, C.S. Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale. In *Towards Malaria Elimination-A Leap Forward*; IntechOpen: London, UK, 2018.
7. Ingham, V.A.; Anthousi, A.; Douris, V.; Harding, N.J.; Lycett, G.; Morris, M.; Vontas, J.; Ranson, H. A sensory appendage protein protects malaria vectors from pyrethroids. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *577*, 376–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ranson, H.; Rossiter, L.; Ortell, F.; Jensen, B.; Wang, X.; Roth, C.W.; Collins, F.; Hemingway, J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **2001**, *359*, 295–304. [[CrossRef](#)]
9. Ding, Y.; Ortell, F.; Rossiter, L.C.; Hemingway, J.; Ranson, H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: Annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genom.* **2003**, *4*, 35. [[CrossRef](#)]
10. Mitchell, S.N.; Rigden, D.J.; Dowd, A.J.; Lu, F.; Wilding, C.S.; Weetman, D.; Dadzie, S.; Jenkins, A.M.; Regna, K.; Boko, P.; et al. Metabolic and Target-Site Mechanisms Combine to Confer Strong DDT Resistance in *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e9266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Lucas, E.R.; Rockett, K.A.; Lynd, A.; Essandoh, J.; Grisales, N.; Kemei, B.; Njoroge, H.; Hubbard, C.; Rippon, E.J.; Morgan, J.; et al. A high throughput multi-locus insecticide resistance marker panel for tracking resistance emergence and spread in *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fonseca-González, I.; Quiñones, M.L.; Lenhart, A.; Brogdon, W.G. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67*, 430–437. [[CrossRef](#)]
13. Ranson, H.; Hemingway, J. Mosquito Glutathione Transferases. *Methods Enzymol.* **2005**, *401*, 226–241.
14. Riveron, J.M.; Ibrahim, S.S.; Mulamba, C.; Djouaka, R.; Irving, H.; Wondji, M.J.; Ishak, I.H.; Wondji, C.S. Genome-Wide Transcription and Functional Analyses Reveal Heterogeneous Molecular Mechanisms Driving Pyrethroids Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles funestus* across Africa. *G3: Genes Genomes Genet.* **2017**, *7*, 1819–1832. [[CrossRef](#)]
15. Riveron, J.M.; Irving, H.; Ndula, M.; Barnes, K.G.; Ibrahim, S.S.; Paine, M.J.I.; Wondji, C.S. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *110*, 252–257. [[CrossRef](#)]
16. Riveron, J.M.; Yunta, C.; Ibrahim, S.S.; Djouaka, R.; Irving, H.; Menze, B.D.; Ismail, H.M.; Hemingway, J.; Ranson, H.; Albert, A.; et al. A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol.* **2014**, *15*, R27. [[CrossRef](#)]
17. Wilding, C.S.; Weetman, D.; Rippon, E.J.; Steen, K.; Mawejje, H.D.; Barsukov, I.; Donnelly, M.J. Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid detoxification linked *GSTE4* of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Mol. Genet. Genom.* **2014**, *290*, 201–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tchouakui, M.; Riveron, J.M.; Djonabaye, D.; Tchapgga, W.; Irving, H.; Takam, P.S.; Njiokou, F.; Wondji, C.S. Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-*GSTe2*) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes* **2018**, *9*, 645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Menze, B.D.; Wondji, M.J.; Tchapgga, W.; Tchoupo, M.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in central Cameroon. *Malar. J.* **2018**, *17*, 317. [[CrossRef](#)]
20. Menze, B.D.; Kouamo, M.F.; Wondji, M.J.; Tchapgga, W.; Tchoupo, M.; Kusimo, M.O.; Mouhamadou, C.S.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. An Experimental Hut Evaluation of PBO-Based and Pyrethroid-Only Nets against the Malaria Vector *Anopheles funestus* Reveals a Loss of Bed Nets Efficacy Associated with *GSTe2* Metabolic Resistance. *Genes* **2020**, *11*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Agrawal, N.; Dasaradhi, P.V.N.; Mohammed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R.K.; Mukherjee, S.K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 657–685. [[CrossRef](#)]
22. Wang, Y.; Baker, N.; Amdam, G.V. RNAi-mediated Double Gene Knockdown and Gustatory Perception Measurement in Honey Bees (*Apis mellifera*). *J. Vis. Exp.* **2013**, *2013*, e50446. [[CrossRef](#)]
23. Lycett, G.J.; McLaughlin, L.A.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Kafatos, F.C.; Loukeris, T.G.; Paine, M.J.I. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 321–327. [[CrossRef](#)]
24. Lopez, S.B.G.; Guimarães-Ribeiro, V.; Rodriguez, J.V.G.; Dorand, F.A.P.S.; Salles, T.S.; Sá-Guimarães, T.E.; Alvarenga, E.S.L.; Melo, A.C.A.; Almeida, R.V.; Moreira, M.F. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4038. [[CrossRef](#)]
25. Isoe, J.; Koch, L.E.; Isoe, Y.E.; Rascón, A.A., Jr.; Brown, H.E.; Massani, B.B.; Miesfeld, R.L. Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Morgan, J.C.; Irving, H.; Okedi, L.M.; Steven, A.; Wondji, C.S. Pyrethroid Resistance in an *Anopheles funestus* Population from Uganda. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11872. [[CrossRef](#)]
27. Koekemoer, L.L.; Kamau, L.; Coetzee, M.; Hunt, R.H. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 804–811. [[CrossRef](#)]
28. Livak, K.J. Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* **1984**, *107*, 611–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hunt, R.H.; Brooke, B.D.; Pillay, C.; Koekemoer, L.L.; Coetzee, M. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Med. Veter. Entomol.* **2005**, *19*, 271–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Weedall, G.D.; Irving, H.; Hughes, M.A.; Wondji, C.S. Molecular tools for studying the major malaria vector *Anopheles funestus*: Improving the utility of the genome using a comparative poly(A) and Ribo-Zero RNAseq analysis. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 931. [[CrossRef](#)]
31. Mugenzi, L.M.J.; Menze, B.D.; Tchouakui, M.; Wondji, M.J.; Irving, H.; Tchoupo, M.; Hearn, J.; Weedall, G.D.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. Cis-regulatory CYP6P9b P450 variants associated with loss of insecticide-treated bed net efficacy against *Anopheles funestus*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Weedall, G.D.; Mugenzi, L.M.J.; Menze, B.D.; Tchouakui, M.; Ibrahim, S.S.; Amvongo-Adjia, N.; Irving, H.; Wondji, M.J.; Tchoupo, M.; Djouaka, R.; et al. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaat7386. [[CrossRef](#)]
33. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
34. Blandin, S.; Moita, L.F.; Köcher, T.; Wilm, M.; Kafatos, F.C.; Levashina, E.A. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: Targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 852–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. WHO. *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*; WHO: Geneva, Switzerland, 2016.

36. Djouaka, R.; Riveron, J.M.; Yessoufou, A.; Tchigossou, G.; Akoton, R.; Irving, H.; Djegbe, I.; Moutairou, K.; Adeoti, R.; Tamò, M.; et al. Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
37. Irving, H.; Wondji, C.S. Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ibrahim, S.S.; Riveron, J.M.; Bibby, J.; Irving, H.; Yunta, C.; Paine, M.J.I.; Wondji, C.S. Allelic Variation of Cytochrome P450s Drives Resistance to Bednet Insecticides in a Major Malaria Vector. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005618. [[CrossRef](#)]
39. Nardini, L.; Hunt, R.H.; Dahan-Moss, Y.L.; Christie, N.; Christian, R.N.; Coetzee, M.; Koekemoer, L.L. Malaria vectors in the Democratic Republic of the Congo: The mechanisms that confer insecticide resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malar. J.* **2017**, *16*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Lumjuan, N.; McCarroll, L.; Prapanthadara, L.-A.; Hemingway, J.; Ranson, H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *35*, 861–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wang, Y.; Qiu, L.; Ranson, H.; Lumjuan, N.; Hemingway, J.; Setzer, W.N.; Meehan, E.J.; Chen, L. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *J. Struct. Biol.* **2008**, *164*, 228–235. [[CrossRef](#)]
42. Vontas, J.; Blass, C.; Koutsos, A.C.; David, J.-P.; Kafatos, F.C.; Louis, C.; Hemingway, J.; Christophides, G.K.; Ranson, H. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* **2005**, *14*, 509–521. [[CrossRef](#)]
43. Mitchell, S.N.; Stevenson, B.J.; Müller, P.; Wilding, C.S.; Egyir-Yawson, A.; Field, S.G.; Hemingway, J.; Paine, M.J.I.; Ranson, H.; Donnelly, M.J. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6147–6152. [[CrossRef](#)]
44. Vontas, J.G.; Small, G.J.; Hemingway, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hassan, F.; Singh, K.P.; Ali, V.; Behera, S.; Shivam, P.; Das, P.; Dinesh, D.S. Detection and functional characterization of sigma class GST in *Phlebotomus argentipes* and its role in stress tolerance and DDT resistance. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lumjuan, N.; Rajatileka, S.; Changsom, D.; Wicheer, J.; Leelapat, P.; Prapanthadara, L.-A.; Somboon, P.; Lycett, G.; Ranson, H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 203–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

# An Experimental Hut Evaluation of PBO-Based and Pyrethroid-Only Nets against the Malaria Vector *Anopheles funestus* Reveals a Loss of Bed Nets Efficacy Associated with *GSTe2* Metabolic Resistance

Benjamin D. Menze <sup>1,2,\*</sup>, Mersimine F. Kouamo <sup>2,3</sup>, Murielle J. Wondji <sup>1,2</sup>, Williams Tchapgá <sup>2</sup>, Micareme Tchoupo <sup>2</sup>, Michael O. Kusimo <sup>2</sup> , Chouaibou S. Mouhamadou <sup>4</sup> , Jacob M. Riveron <sup>5</sup> and Charles S. Wondji <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Vector Biology Department, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK; Murielle.Wondji@lstmed.ac.uk

<sup>2</sup> Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), LSTM Research Unit, Yaoundé 13591, Cameroon; mersimine.kouamo@crid-cam.net (M.F.K.); William.tchapga@crid-cam.net (W.T.); micareme.tchoupo@crid-cam.net (M.T.); gkusimo@gmail.com (M.O.K.)

<sup>3</sup> Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé 337, Cameroon

<sup>4</sup> Centre Suisse de Recherches scientifiques (CSRS), Yopougon 1303, Abidjan, Cote d'Ivoire; mouhamadou.chouaibou@csrs.ci

<sup>5</sup> Syngenta UK Limited, CPC4 Capital Park, Fulbourn, Cambridgeshire CB21 5XE, UK; Jacob.Riveron\_Miranda@syngenta.com

\* Correspondence: Benjamin.Menze@lstmed.ac.uk (B.D.M.); charles.wondji@lstmed.ac.uk (C.S.W.)

Received: 28 October 2019; Accepted: 16 December 2019; Published: 29 January 2020



**Abstract:** Growing insecticide resistance in malaria vectors is threatening the effectiveness of insecticide-based interventions, including Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). However, the impact of metabolic resistance on the effectiveness of these tools remains poorly characterized. Using experimental hut trials and genotyping of a glutathione S-transferase resistance marker (L119F-*GSTe2*), we established that GST-mediated resistance is reducing the efficacy of LLINs against *Anopheles funestus*. Hut trials performed in Cameroon revealed that Piperonyl butoxide (PBO)-based nets induced a significantly higher mortality against pyrethroid resistant *An. funestus* than pyrethroid-only nets. Blood feeding rate and deterrence were significantly higher in all LLINs than control. Genotyping the L119F-*GSTe2* mutation revealed that, for permethrin-based nets, 119F-*GSTe2* resistant mosquitoes have a greater ability to blood feed than susceptible while the opposite effect is observed for deltamethrin-based nets. For Olyset Plus, a significant association with exophily was observed in resistant mosquitoes (OR = 11.7;  $p < 0.01$ ). Furthermore, *GSTe2*-resistant mosquitoes (cone assays) significantly survived with PermaNet 2.0 (OR = 2.1;  $p < 0.01$ ) and PermaNet 3.0 (side) (OR = 30.1;  $p < 0.001$ ) but not for Olyset Plus. This study shows that the efficacy of PBO-based nets (e.g., blood feeding inhibition) against pyrethroid resistant malaria vectors could be impacted by other mechanisms including GST-mediated metabolic resistance not affected by the synergistic action of PBO. Mosaic LLINs incorporating a GST inhibitor (diethyl maleate) could help improve their efficacy in areas of GST-mediated resistance.

**Keywords:** malaria; Long Lasting Insecticidal Nets; insecticide resistance; metabolic resistance; glutathione S-transferase; *Anopheles funestus*; piperonyl butoxide

## 1. Introduction

The scale-up of insecticide-based interventions including Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Indoor Residual Spraying (IRS) has significantly contributed to the considerable reduction of malaria burden in the past decade [1]. Unfortunately, growing insecticide resistance in malaria vectors beside drugs resistance, lack of vaccine and reduced donor funding are threatening these successes. However, the actual impact of resistance, notably metabolic resistance, on the effectiveness of vector control tools against pyrethroid resistant mosquito populations remains a topic of debate especially when using entomological outcomes. Indeed, some studies have suggested that pyrethroid resistance does not yet impact the effectiveness of LLINs [2] whereas others have revealed a negative impact [3]. Furthermore, to help manage resistance, novel LLINs with the piperonyl butoxide (PBO), an insecticide synergist, have been designed by various manufacturers [4–6]. A randomized control trial comparing PBO-based nets to pyrethroid-only nets [3] led WHO to recommend in 2017 that national malaria control programmes and their partners should consider the deployment of pyrethroid-PBO nets in areas where the main malaria vector(s) have pyrethroid resistance that is: (a) confirmed, (b) of intermediate level, and (c) conferred (at least in part) by a monooxygenase-based resistance mechanism [7]. However, it remains unclear how these pyrethroid-PBO nets will performed when other mechanisms such as GST-based metabolic resistance are driving the resistance. One of the key challenges of assessing the impact of such metabolic resistance on the effectiveness of insecticide-based interventions such as LLINs has been the lack of molecular markers for resistance, as this phenotype is not easily associated with the outcome of the interventions. Recent efforts have detected a key genetic marker in the glutathione S-transferase epsilon 2 gene (*GSTe2*). This marker confer metabolic-mediated resistance to pyrethroids and dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) in the major malaria vector *Anopheles funestus* in West and Central Africa [8]. Besides cytochrome P450s and esterases, GSTs are, one of the main enzyme families conferring metabolic resistance to insecticides [9] either through a direct metabolism or by catalyzing the secondary metabolism of substrates oxidized by cytochrome P450s [9]. Over-expression of GST epsilon 2 (*GSTe2*) has been associated with DDT and/or pyrethroids resistance in several mosquito species including *An. gambiae* [10], *An. funestus* [8] and *Aedes aegypti* [11]. In *An. funestus*, genomic and structural analyses revealed that a leucine to phenylalanine amino acid change (L119F) in *GSTe2*, has enlarged the substrate-binding pocket of the enzyme, conferring DDT/pyrethroid resistance in West and Central African populations [8]. This single amino acid change was used to design a simple field applicable DNA-based diagnostic tool [12] providing the opportunity to address questions regarding the direct impact of GST-mediated metabolic resistance on insecticide-based interventions such as LLINs.

The pyrethroid resistance in *An. funestus* across Africa is driven by metabolic resistance [13–15] as no knockdown resistance (*kdr*) has been reported so far for this species [16]. This predominance of the metabolic resistance mechanism in *An. funestus* through over-expression of detoxification genes such as GSTs or P450s makes this vector suitable to assess the impact of metabolic resistance on control interventions. The presence of the GST-mediated metabolic resistance in *An. funestus* populations such as in Cameroon [8,17,18] provides the opportunity to assess how the effectiveness of PBO-based nets is impacted when malaria vectors exhibit other type of metabolic resistance than cytochrome P450-based resistance which have been so far the only focus of synergists.

Experimental hut studies are the method of choice to evaluate the efficacy of LLINs against mosquito populations using entomological indices as a proxy for potential epidemiological impact [19,20]. It also provides relevant samples to assess how metabolic resistance impacts the effectiveness of LLINs as done previously to assess impact of target site mutations such as *kdr* [21].

Here, we assessed the performance of conventional pyrethroid-only nets versus PBO-based against a pyrethroid resistant *An. funestus* population from Cameroon using experimental huts. Furthermore, we took advantage of the L119F-*GSTe2* DNA-based diagnostic assay [8], to assess the impact of GST-mediated metabolic resistance on the performance of these five LLINs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Area

The experimental hut station was located in Mibellon (6°4'60'' N, 11°30'0'' E), a village in Cameroon located in the Adamawa Region; Mayo Banyo Division and Bankim Sub-division. The Adamawa region is in the mountainous zone forming a transition between Cameroon's forested south and savanna north. Malaria transmission is perennial with a high transmission as shown by very high infection rate of Plasmodium infection caused by *Plasmodium falciparum* but also *P. malariae* [12]. The village was located in close proximity to permanent water bodies including a lake and swamps which provide suitable breeding sites for *An. funestus* s.l. Human activities are mainly fishing, hunting and subsistence farming including maize, watermelon and coffee plantations. At the experimental station, 12 huts built following the World Health Organisation (WHO) standard [22], were available for a wide range of experimental hut trials. *An. funestus* s.s. was the main malaria vector in the area [18]. *Mansonia* sp., and *Culex* sp. were also present in the area. *Anopheles* mosquitoes in the area were highly resistant to pyrethroid and DDT [18]. The trial was carried out for 10 weeks during the rainy season between 10 July and 16 October 2016.

### 2.2. Experimental Hut Design

The huts are built following the prototype recommended by WHO for the West African region [22]. The hut is constructed on a concrete base surrounded by a drain channel to trap ants. The walls are made from concrete bricks and plastered inside and outside with a plaster made from a mixture of cement and sand. The roof is made from corrugated iron and the ceiling is made from plywood. The 4 windows located on three side of the hut are designed to create an angle with a 2 cm gap, which will facilitate the entry of mosquitoes flying upward and prevent the mosquitoes from escaping once they have entered the hut. A veranda trap is built at the back of the hut according to WHO protocol [23]. A curtain is used as a separation between the veranda and the rest of the hut. Before bedtime, each sleeper is required to raise the curtain to give mosquitoes the opportunity to take refuge in the veranda. In the morning, it is recommended that the sleeper lowers the curtain before starting the collection, to allow a separate collection of mosquitoes in the veranda and in the hut.

### 2.3. Net Treatment/Arm Comparison

During the experimental hut trial, four LLINs and one untreated net as negative control were compared (Table 1). These included two pyrethroid-only LLINs (PermaNet 2.0 and Olyset) and two PBO-based nets (PermaNet 3.0 and Olyset Plus) (Table 1). Each net was holed according to WHO protocol [23]. Six holes were generated (4 cm × 4 cm) per net, two on each of the long sides and one on each of the short sides.

**Table 1.** Description of the long-lasting insecticidal nets used.

Treatment Arm	Description	Manufacturer
Untreated	100% polyester with no insecticide	Local market
Olyset	$8.6 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (2%) of permethrin incorporated into polyethylene	Sumitomo Chemical
Olyset Plus	$8.6 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (2%) of permethrin and $4.3 \times 10^{-4}$ kg/m <sup>2</sup> (1%) of Piperonyl butoxide (PBO) incorporated into polyethylene	Sumitomo Chemical
PermaNet 2.0	100% polyester coated with 1.8 g/kg of deltamethrin	Vestergaard Frandsen
PermaNet 3.0	Combination of 2.8 g/kg of deltamethrin coated on polyester with strengthened border (side panels) and deltamethrin (4.0 g/kg) and PBO (25 g/kg)	Vestergaard Frandsen

#### 2.3.1. Hut Effect

Prior to the study, the hut effect was assessed to evaluate any specific attractiveness of huts. Untreated nets were hung in the six huts used for the study, and during 3 weeks, between the 10 and 29 May 2016, volunteers sleeping underneath collected mosquitoes each morning.

### 2.3.2. Bioassays and Cone Assays

Cone bioassays were performed at the beginning of the study using the *An. coluzzii* susceptible Ngousso laboratory strain. This was done to confirm the quality of the five bed nets used in the study. Cone bioassays were also done in the insectary using F1 progeny from field collected *Anopheles funestus* from Mibellon. For PermaNet 2.0, PermaNet 3.0 (side and top), Olyset and Olyset Plus beside an untreated control net, five batches of 10 unfed females, 2–5 days old, were exposed to each bed nets using WHO cone assays for three minutes [22]. They were then transferred into a holding paper cup containers and the knock down was checked after 60 min and the mortality after 24 h post-exposure during which mosquitoes were provided sugar solution. Bioassays were also performed to generate highly resistant (alive after 90 min exposure) and highly susceptible (dead after 30 min) mosquitoes against 0.75% permethrin, 0.05% deltamethrin and 4% DDT WHO papers. The 30 and 90 min exposure tests were performed in separate tubes then scored 24 h post-exposure. For each test 4 replicates of 25 mosquitoes were used. The samples were then used to assess the association between L119F-GSTe2 genotypes and resistance to these insecticides.

### 2.4. Experimental Hut Trial

The experimental hut trial was carried out during 60 night following the protocol described in the guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets [23]. To correct any specific attractiveness observed during the hut effect assessment, bed nets were rotated according to the Latin design square rotation [23] so that at the end of the study each net would have spent six days in each hut. The huts were cleaned weekly before the rotation of the nets. Six volunteer males were selected to sleep in the room from 20:00 GMT in the evening to 5:00 GMT in the morning. The sleepers were also rotated every day so that at the end of the week each sleeper would have spent one night in each hut. The rotation of the sleepers was done to correct any bias due to any specific attractiveness from the sleepers. In addition, the sleepers were blinded to the treatments.

#### 2.4.1. Mosquito Collection

Mosquitoes were collected every morning, using hemolysis tubes from: (i) inside the nets, (ii) in the room: floor, walls and roof, and (iii) in the veranda exit trap. Mosquitoes collected from each compartment were kept separately in a bag to avoid any mixing between samples from different compartments. Samples were then classified as dead, alive, blood fed or unfed. The 'alive' samples were kept in the paper cup and provided with sugar solution for 24 h and mortalities monitored.

The field-caught females were sorted according to morphological keys as previously described [24]. Mosquitoes belonging to the *An. funestus* group were species identified to species specific level using a cocktail PCR as previously described [25].

#### 2.4.2. Bed Nets Performance Assessment

The performance of the bed nets were expressed relative to control (untreated nets) in term of:

- i. Deterrence/entry rate: the reduction in hut entry relative to control. Deterrence (%) =  $100 \times (Du - Dt)/Du$ , where Du is the total number of mosquitoes found in untreated hut (control) and Dt is the total number of mosquitoes in the treated hut.
- ii. Entry rate (%) =  $100 \times (Ht/Hn)$  where Ht is the total number of mosquitoes found in the hut and Hn is the total number of mosquitoes collected in all the 5 huts.
- iii. Exophily (Excito-repellency): the proportion of mosquitoes found exited in the veranda trap Exophily (%) =  $100 \times (Ev/Et)$  where Ev is the total number of mosquitoes fund in veranda and Et is the total number of both inside the hut and veranda.
- iv. Blood feeding rate (BFR). This rate was calculated as follows: Blood feeding rate = (N mosquitoes fed)  $\times$  100/total N mosquitoes. Where "N mosquitoes fed" was the number of mosquitoes fed, and "total N mosquitoes" was the total number of mosquitoes collected.

- v. Blood-feeding inhibition (BFI): the reduction in blood-feeding in comparison with the control hut. Blood feeding inhibition is an indicator of personal protection (PP). More precisely, the personal protection effect of each bed net is the reduction of blood feeding percentage induced by the net when compared to control. The protective effect of each bed net can be calculated as follows:
- vi. Personal protection (%) =  $100 \times (Bu - Bt)/Bu$ , where Bu is the total number of blood-fed mosquitoes in the huts with untreated nets and Bt is the total number of blood-fed mosquitoes in the huts with treated nets [23].
- vii. Immediate and delay mortality: the proportion of mosquitoes entering the hut that are found dead in the morning (immediate mortality) or after being caught alive and held for 24 h with access to sugar solution (delay mortality) [23]. In this study we focused on the overall mortality calculated as follows: Mortality (%) =  $100 \times (Mt/MT)$  where Mt is the total number of mosquitoes found dead in the hut and MT is the total number of mosquitoes collected in the hut.

#### 2.4.3. Ethical Clearance

The National Ethics Committee for Health Research of Cameroon approved the protocol of the study (ID:2016/03/725/CE/CNERSH/SP). Written, informed and signed consent was obtained from sleepers before starting the trials. The consent form provided all the information and the evaluation process about the study. Information was translated in local language when needed. All the volunteers involved in the study were followed-up and treated when showing malaria symptoms. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

#### 2.5. Impact of the L119F-GSTe2 Mutation on Insecticide-Treated Nets

The samples collected during the investigation on the performance of nets were grouped in several categories: dead, alive, blood fed, unfed; room and veranda and inside nets. The L119F-GSTe2 mutation was genotyped in each group using an Allele Specific-PCR. This allows a direct measure of the relative survival and feeding success of resistant and susceptible insects in the presence of the different bed nets.

#### 2.6. Genotyping

Samples classified as dead, alive, blood fed, unfed, room and veranda were used for DNA extraction using the Livak protocol [26]. The L119F-GSTe2 mutation was genotyped to assess how the glutathione S-transferase gene, *GSTe2*, impacts the performance of the bed nets. An allele specific PCR [27,28] was used to detect the three genotypes of the L119F-GSTe2 mutation (homozygote resistant:RR, heterozygote resistant: RS and homozygote susceptible: SS). The PCR was carried out using 10 mM of each primer and 1  $\mu$ L of gDNA as template in 15  $\mu$ L reaction containing 10 $\times$  Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Kapa Taq (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Amplification was carried out using thermocyclic parameters: 95 °C for 5 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 45 s, and final extension at 72 °C for 10 min. The following primers were used: L119F-Fwd: ATG ACC AAG CTA GTT CTG TAC ACG CT; L119F-Rev: TTC CTC CTT TTT ACG ATT TCG AAC T; L119F-Res1: CGG GAA TGT CCG ATT TTC CGT AGA AtAA; L119F-Sus1: CAT TTC TTA TTC TCA TTT ACA GGA GCG TAaTC. PCR products were separated on 2% agarose gel by electrophoresis. The bands corresponding to different genotypes were interpreted as previously described [12,28].

## 2.7. Data Analysis

### 2.7.1. Experimental Hut Trial

To calculate the proportion of each entomological outcomes and the level of significance between the treatments and between the control for each entomological outcomes, the XLSTAT software (Addinsoft, Berkeley, CA, USA) was used, as done previously [29,30]. The numbers of mosquitoes collected in the huts with different treatments were analysed by negative binomial regression. The effects of the treatments on each of the main proportional entomological outcomes (exophily, blood feeding and mortality) were assessed using binomial generalized linear mixed models (GLMMs) with a logit link function, fitted using the 'lme4' package for R 3.6. (R Development Core Team, 2019). A separate model was fitted for each outcome and for each mosquito species. In addition to the fixed effect of each treatment, each model included random effects to account for the following sources of variation: between the five huts used in the studies; between the five sleepers who slept in the huts; between the ten weeks of the trial.

### 2.7.2. Test of Association between L119F-Mutation and the Entomological Outcomes

To investigate the association between the GSTe2 mutation and the ability of the mosquitoes to survive, blood feed or escape, Vassar stats was used to estimate the Odds ratio (OR) based on a fisher exact probability test with a  $2 \times 2$  contingency table.

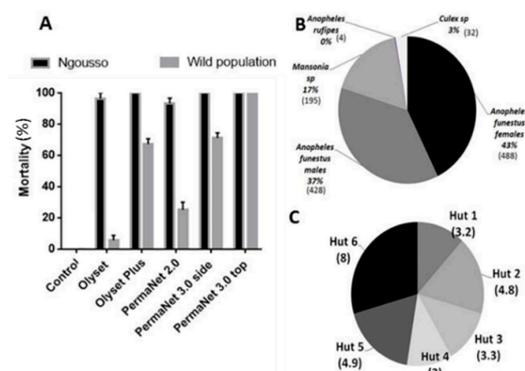
### 2.7.3. Hut Effect Analysis

The one-way analysis of variance (ANOVA) using Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used to determine whether there were any statistically significant differences between the means of the mosquitoes collected from the six huts. In this study, for all the analyses, an alpha of 0.05 was used as the cut off for significance.

## 3. Results

### 3.1. Cone Assays Using the *An. gambiae* Susceptible Lab Strain Ngousso

At the beginning of the study each bed net was exposed to the *An. coluzzii* susceptible lab strain Ngousso using WHO cone assays. Olyset plus and PermaNet 3.0 showed a mortality of  $100 \pm 00\%$ , PermaNet 2.0 showed  $93.3 \pm 3.33\%$  mortality and Olyset gave mortality rate of  $96.97 \pm 3.33\%$  whereas no mortality was recorded for the untreated net (Figure 1A).



**Figure 1.** Quality control before the experimental hut trial in Mibellon: Species composition in Mibellon: (A) Quality control of the efficacy of all the four nets checked against the susceptible laboratory strain of *Anopheles gambiae* Ngousso and LLINs efficacy testing using cone assays against the pyrethroid resistant *An. funestus* population from Mibellon, Cameroon; (B) Number of mosquitoes collected during the hut effect assessment; (C) Average of *Anopheles funestus*. ss collected by hut during the 18 days of the hut effect investigation.

### 3.2. Cone Assays with *An. Funestus* from the Field (Mibellon)

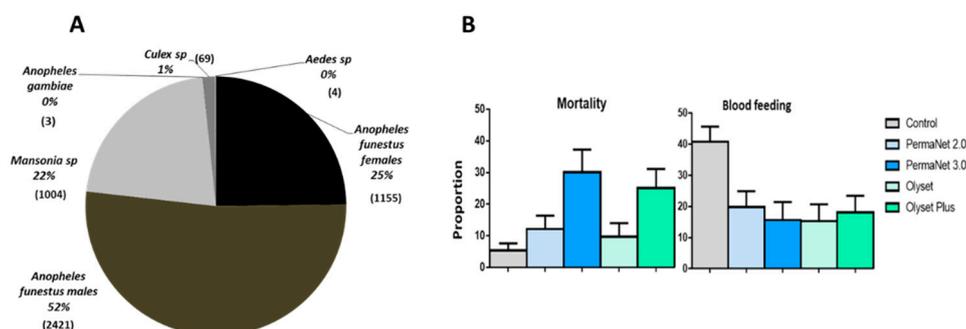
Olyset and Olyset plus showed mortality of  $5.63 \pm 3.2\%$ , and  $67.23 \pm 3.4\%$  respectively when exposed to the F<sub>1</sub> population of *An. funestus* from Mibellon using WHO cone assays. PermaNet 2.0 showed  $25.06 \pm 5.06\%$  mortality and PermaNet 3.0 side and PermaNet 3.0 top gave  $71.04 \pm 3.33\%$  and  $100 \pm 0\%$  respectively whereas no mortality was recorded for the Yorkool and the untreated net (Figure 1A).

### 3.3. Hut Effect

After 18 days collections, a total of 1147 mosquitoes were collected in the huts with untreated net. Out of the 1147, 488 were females *An. funestus*, 428 *An. funestus* males, 195 *Mansonia* spp., 32 *Culex* sp., and four *An. rufipes*. The average of *An. funestus* females collected per room after 18 days ranged from 3 to 8 per day (Figure 1C). No significant difference ( $p = 0.09$ ; DF = 5) between the numbers of mosquitoes collected in the different huts was observed (Figure 1C).

### 3.4. Mosquito Abundance

A total of 4656 mosquitoes were collected in five huts by human volunteers sleeping in the huts for 10 weeks corresponding to 360 man-nights. Out of the mosquitoes collected 1155 (25%) were *An. funestus* s.s. females, 2421 (52%) were *An. funestus* males, 1004 (22%) were *Mansonia* spp., 03 (0.06%) were *An. gambiae* ss., 66 (1%) were *Culex* sp. and 04 (0.08%) were *Aedes* sp. (Figure 2A). However, only female *An. funestus* and *Mansonia* sp., due to its significant nuisance in this area, were considered for analysis (Tables 2 and 3).



**Figure 2.** Performance of the four LLINs in experimental hut trials against pyrethroid resistant *An. funestus* in Cameroon. (A) Mosquito species composition during the experimental hut study. (B) Proportion of mortality and blood feeding rate for the four LLINs against *An. funestus*.

**Table 2.** Results of the performance of the five brands of LLINs against wild *An. funestus* females in experimental huts.

	Treatments				
	Control	PermaNet 2.0	PermaNet 3.0	Olyset	Olyset Plus
Females caught	390	237	153	176	199
Exophily%	6.9	17.7 ***	17.0 ***	29.0 ***	22.1 ***
95% Confidence limits	4.40–9.44)	(12.85–22.58)	(11.04–22.94)	(22.27–35.68)	(16.34–27.88)
Blood fed (%)	40.8	19.8 ***	15.7 ***	15.3 ***	17.2 ***
95% Confidence limits	(35.89–45.65)	(14.75–24.91)	9.92–21.45)	10.02–20.67)	(12.74–23.44)
Blood feed inh. (%)	0.0	51.36	61.52	62.37	55.63
Personal protection (%)	0.0	70.44	84.90	83.01	77.35
Overall mortality (%)	5.4	12.2 **	30.1 ***	9.7 *	25.1 ***
95% Confidence limits	(31.14–7.62)	(8.06–16.41)	(22.80–37.33)	(5.29–14.02)	(19.10–31.15)
Immediate mortality entry rate	2.6	5.4	27.6 ***	6.1 *	18.3 ***
Deterrence (%)	33.7	20.5 *	13.2 ***	15.2 ***	13.6 ***
Deterrence (%)	0.0	39.2	60.8	54.9	49.0

\* =  $p < 0.05$  \*\* =  $p < 0.01$  \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Table 3.** Results of the performance of the four brands of LLINs against wild *Mansonia* spp. in experimental huts.

	Control	PermaNet 2.0	PermaNet 3.0	Olyset	Olyset Plus
Total	342	142	216	141	163
Exophily%	42.4	37.3 *	31.9 **	28.4 **	31.3 **
95% Confidence limits	(37.16–47.64)	(29.37–45.28)	(25.73–38.16)	(20.93–35.81)	(24.17–38.41)
Blood feeding (%)	30.1	16.2 **	9.3 ***	15.6 ***	20.2 **
95% Confidence limits	(25.25–34.98)	(10.14–22.26)	(5.39–13.12)	(9.61–21.59)	(14.08–26.41)
Blood feeding inh. (%)	0.0	46.22	69.26	48.19	32.78
Personal protection (%)	0.0	77.66	80.53	78.64	67.96
Overall mortality (%)	37.4	51.4 **	65.5 ***	40.4 **	68.1 ***
Immediate mortality	36.8	46.5	62.0 ***	39.0 ***	65.0 ***
Entry rate	34.0	14.1 ***	21.5 **	14.0 ***	16.2 ***
Deterrence (%)	0.0	58.5	36.8	58.8	52.3

\* =  $p < 0.05$  \*\* =  $p < 0.01$  \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 3.5. Performance of the Nets against *An. Funestus* s.s. Population

#### 3.5.1. Deterrent Effect/Entry Rate

In comparison to control, the entry rate was significantly reduced in all the huts for the five LLINs with the deterrence rates ranging from 39.2% for PermaNet 2.0 to 60.8% for PermaNet 3.0. PermaNet 3.0 had a significantly higher deterrence compared to PermaNet 2.0 but this was not the case for Olyset Plus (49%) over Olyset (54.9%) (Table 2).

#### 3.5.2. Induced Exophily Rate

A low exophily rate was recorded in the control hut for *An. funestus* s.s. (6.9%). However, the exophily rate was significantly higher in the hut with Olyset (29.0%;  $p < 0.001$ ), Olyset Plus (22.1%;  $p < 0.001$ ), PermaNet 2.0 (17.7%;  $p < 0.001$ ) and PermaNet 3.0 (17.0%;  $p < 0.001$ ) compared to the control hut (Figure 2A and Table 2). No significant difference is observed between the five tested LLINs. A significant high exophily activity was observed during week 2 and week 9 ( $p < 0.05$ ) (Table S1).

#### 3.5.3. Mortality (Overall Mortality)

Low mortality rates were recorded in the control hut for *An. funestus* s.s. (5.4%). However, the mortality rate was significantly higher in the hut with Olyset Plus (25.1%;  $p < 0.01$ ), PermaNet 2.0 (12.2%;  $p < 0.01$ ) and PermaNet 3.0 (30.1%;  $p < 0.001$ ) compared to the control hut. The mortality rate was significantly higher with the two PBO-based nets than all the pyrethroid-only nets ( $p < 0.001$ ). However, no significant variation was observed between the mortality in the huts with Olyset (9.7%;  $p > 0.05$ ) compared to control (Figure 2B and Table 2). It is also clear from our analysis that mortalities obtained were not influenced by the sleepers ( $p > 0.05$ ), by the huts ( $p > 0.05$ ) and by the weeks ( $p > 0.05$ ) (Table S2).

#### 3.5.4. Blood Feeding Inhibition (BFI)

High blood feeding rates were recorded in the control hut (40.8%). However, the blood feeding rate (BFR) was significantly lower in the hut with Olyset (BFR = 15.3; BFI = 62.3%;  $p < 0.001$ ), Olyset Plus (BFR = 18.1%; BFI = 55.6%;  $p < 0.001$ ), PermaNet 2.0 (BFR = 19.8%; BFI = 51.3%;  $p < 0.001$ ) and PermaNet 3.0 (BFR = 15.7%; BFI = 61.5%;  $p < 0.001$ ) compared to the control hut (Figure 2B and Table 2). PermaNet 3.0 had a higher BFI than PermaNet 2.0 but this was not the case with Olyset Plus compared to Olyset although the differences were not significant. We noticed a significant reduction of the blood feeding in hut 4 ( $p < 0.05$ ) (Table S3).

#### 3.5.5. Personal Protection (PP)

The lowest performance in terms of PP was recorded with PermaNet 2.0 (70.44%). PermaNet 3.0 provided a higher PP when compared to PermaNet 2.0 but not significant (84.9% vs. 70.4%;  $p > 0.05$ ).

No significant difference was observed when comparing the PP provided by Olyset and Olyset Plus (83 vs. 77.3%;  $p > 0.05$ ) (Table 2).

### 3.6. Performance of the Nets against *Mansonia* spp. Population

#### 3.6.1. Deterrent Effect

In comparison to control, the entry rate was significantly reduced for the four LLINs with deterrence rates ranging from 36.8% for PermaNet 3.0 to 58.8% for Olyset. Contrary to *An. funestus*, PermaNet 2.0 had a higher deterrence rate (58.5%) compared to PermaNet 3.0 (36.8%) and similar for Olyset (58.8%) compared to Olyset Plus (52.3%) (Table 3).

#### 3.6.2. Induced Exophily Rate

A higher exophily rate was recorded in the control hut for *Mansonia* spp. (42.4%) than *An. funestus* (6.9%). However, the exophily rate of *Mansonia* spp., was significantly lower in the hut with Olyset (28.4%;  $p < 0.01$ ), Olyset Plus (31.3%;  $p < 0.01$ ) and PermaNet 3.0 (31.9%;  $p < 0.01$ ) compared to the control hut. For PermaNet 2.0 no significant difference was observed when compared to control (37.3%;  $p > 0.05$ ) (Table 3).

#### 3.6.3. Mortality

The overall mortality rate recorded in the control hut for *Mansonia* spp. was 37.4%. However, this rate was significantly higher in the hut with Olyset Plus (68.1%;  $p < 0.001$ ), PermaNet 2.0 (51.4%;  $p > 0.05$ ) and PermaNet 3.0 (65.3%;  $p < 0.001$ ) compared to the control. No significant variation was observed between the mortality in the huts with Olyset (40.4%;  $p > 0.05$ ) compared to control (Table 3). The two PBO nets PermaNet 3.0 and Olyset Plus had a significantly higher mortality rate than the pyrethroid-only nets PermaNet 2.0 and Olyset (Table 3).

#### 3.6.4. Blood Feeding Inhibition (BFI)

The blood feeding rate recorded in the control hut for *Mansonia* spp. was 30.1%. However, this rate was significantly lower in the hut with Olyset (15.6%; BFI = 48.1%;  $p < 0.01$ ), Olyset Plus (20.2%; 32.7%;  $p < 0.001$ ), PermaNet 2.0 (16.2%; BFI = 46.2%;  $p < 0.01$ ) and PermaNet 3.0 (9.3%; BFI = 69.26%;  $p < 0.001$ ) compared to the control hut. PermaNet 3.0 had higher BFI than all the other nets but this was not significant when compared to PermaNet 2.0 and Olyset Plus.

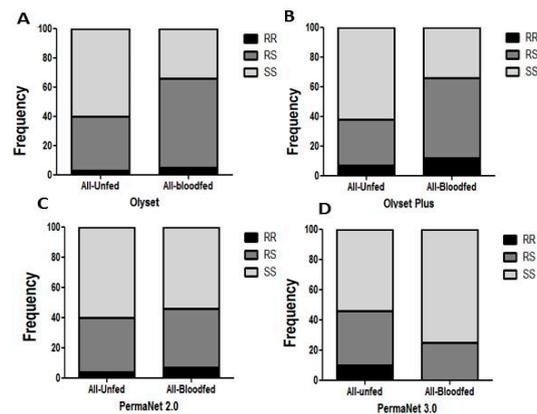
#### 3.6.5. Personal Protection (PP)

The lowest PP was recorded with Olyset Plus (67.96%) whereas PermaNet 3.0 provided a higher PP but not significant when compared to PermaNet 2.0 (80.5% vs. 77.6%;  $p > 0.05$ ) but higher than the Olyset nets. No significant difference was observed when comparing the PP provided by Olyset and Olyset Plus (78.6% vs. 67.9%;  $p > 0.05$ ) (Table 3).

### 3.7. Comparative Analysis of the Impact of L119F-GSTe2 Mutation on the Efficacy of Conventional and PBO-Based Nets

#### Impact on Mortality

Due to the low number of dead mosquitoes (5) the impact on mortality could not be assessed for Olyset net. No correlation was observed between the L119F-GSTe2 mutation and the ability to survive exposure to Olyset Plus (26 dead and 110 alive) when comparing the allelic frequency (OR = 0.85;  $p > 0.05$ ; CI 0.45–1.59). A similar result was observed for the genotypic frequencies including between RR vs. SS (OR = 0.61;  $p > 0.05$ ; CI 0.22–1.66), RS vs. SS (OR = 1.02;  $p = 1$ ; CI 0.56–1.8) and RR vs. RS (OR = 0.59;  $p > 0.05$ ; CI 0.21–1.68) (Figure 3A and Table 4).



**Figure 3.** Impact of the L119F-*GSTe2* mediated metabolic resistance on bednet efficacy for blood feeding ability: (A) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between blood fed and unfed mosquitoes after exposure to Olyset showing a significant increased ability to blood feed for resistant mosquitoes; (B) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between blood fed and unfed mosquitoes after exposure to Olyset Plus showing a significant increased ability to blood feed for resistant; (C) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between blood fed and unfed mosquitoes after exposure to PermaNet 2.0 showing an inverse marginal increased ability to blood feed for homozygote susceptible SS compared to homozygote resistant RR ( $p < 0.05$ ); (D) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between blood fed and unfed mosquitoes after exposure to PermaNet 3.0 showing an increased ability to blood feed of susceptible mosquitoes compared to resistant mosquitoes (R vs. S: OR = 0.29  $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Impact of L119F-*GSTe2* mutation on the ability of various insecticide-treated nets to kill mosquitoes.

		Mortality		
	Genotype	OR	PV	CI
Olyset Plus	RR vs. SS	0.61	>0.05	0.22–1.66
	RR vs. RS	0.59	>0.05	0.21–1.68
	RS vs. SS	1.02	1	0.56–1.8
	R vs. S	0.85	>0.05	0.45–1.59
PermaNet 3.0	RR vs. SS	3.47	>0.05	1–11.9
	RR vs. RS	3.56	>0.05	1–12.7
	RS vs. SS	0.97	1	0.53–1.76
	R vs. S	1.42	>0.05	0.74–2.7
PermaNet 2.0	RR vs. SS			
	RR vs. RS			
	RS vs. SS	1.1	1	0.6
	R vs. S	1.18	>0.05	0.6–2.2

Similarly, no significant association was observed for PermaNet 2.0 between the mutation and the ability to survive (24 dead and 89 alive mosquitoes) when comparing the allelic frequency (OR = 1.18;  $p > 0.05$ ; CI 0.6–2.2) (Table 4) as well as the genotypic frequency of RS vs. SS (OR = 1.1;  $p = 1$ ; CI 0.6–6.6) (Figure S1B and Table 4).

For PermaNet 3.0, no significant association was observed between the mutation and the ability to survive when comparing the allelic frequency (OR = 1.42;  $p > 0.05$ ; CI 0.74–2.7) (Table 4) but comparing the genotypic frequency of RR vs. SS provided a higher Odds ratio close to significance (OR = 3.47;  $p > 0.05$ ; CI 1–11.9) (Figure S1C).

### 3.8. Impact on Blood Feeding

For Olyset net, a significant association was observed between the 119F\_GSTe2 resistance allele and an increased ability to blood feed (21 blood fed and 92 unfed) when comparing the allelic frequencies (OR = 2;  $p < 0.05$ ; CI 1.06–3.7) and the genotypic frequency of RS v SS (OR = 2.97;  $p < 0.001$ ; CI 1.6–5.3) (Figure 3A and Table 5).

**Table 5.** Impact of L119F-GSTe2 mutation on the efficacy of various bed nets to prevent blood feeding.

	Genotype	OR	PV	CI	
Olyset Plus	RR vs. SS	3.3	<0.05	1.19–9.2	
	RR vs. RS	1.07	>0.05	0.38–3.02	
	RS vs. SS	3.08	<0.01	1.67–5.66	
	R vs. S	2.23	<0.05	1.2–4.1	
	<b>Mosquitoes in Room</b>				
	RR vs. SS	12.3	<0.001	2.5–60.4	
	RR vs. RS	1.46	>0.05	0.29–7.2	
	RS vs. SS	8.42	<0.001	4.37–16.2	
R vs. S	4.56	<0.001	2.26–9.2		
Olyset	RR vs. SS	2.6	>0.05	0.6–11.7	
	RR vs. RS	0.89	>0.05	0.2–3.9	
	RS vs. SS	2.97	<0.001	1.65–5.35	
	R vs. S	2	<0.05	1.06–3.7	
	<b>Blood feeding in Room</b>				
	RS vs. SS	3	<0.001	1.67–5.4	
	R vs. S	1.71	>0.05	0.89–3.3	
	PermaNet 3.0	RR vs. SS	inf		
RR vs. RS		inf			
RS vs. SS		0.5	<0.05	0.26–0.92	
R vs. S		0.35	<0.05	0.17–0.73	
<b>Blood feeding in Room</b>					
RS vs. SS		0.41	>0.05	0.21–0.77	
R vs. S		0.29	>0.05	0.14–0.63	
PermaNet 2.0		RR vs. SS	0.4	>0.05	0.1–1.56
	RR vs. RS	0.48	>0.05	0.12–1.9	
	RS vs. SS	0.8	>0.05	0.47–1.5	
	R vs. S	1.31	>0.05	0.6–2.5	

For Olyset Plus net, when considering the blood feed and unfed samples from the room only (23 blood fed and 49 unfed) a significant association was found between L119F-GSTe2 and an increased ability to blood feed when comparing the allelic frequencies (OR = 4.5;  $p < 0.001$ ; CI 2.26–9.2). An even stronger association was observed when comparing the genotype frequencies between RR vs. SS (OR = 12.3;  $p < 0.001$ ; CI 2.5–60.4) and RS vs. SS (OR = 8.42;  $p < 0.001$ ; CI 4.37–16.2). But no association was established when comparing RR v RS (OR = 1.46;  $p > 0.05$ ; CI 0.29–7.2) (Figure 3B and Table 5). No association was also obtained when comparing RR v RS (OR = 1.07;  $p > 0.05$ ; CI 0.38–3.02) when genotyping all the mosquitoes fed and unfed collected in in the hut treated with Olyset (33 blood fed and 103 unfed).

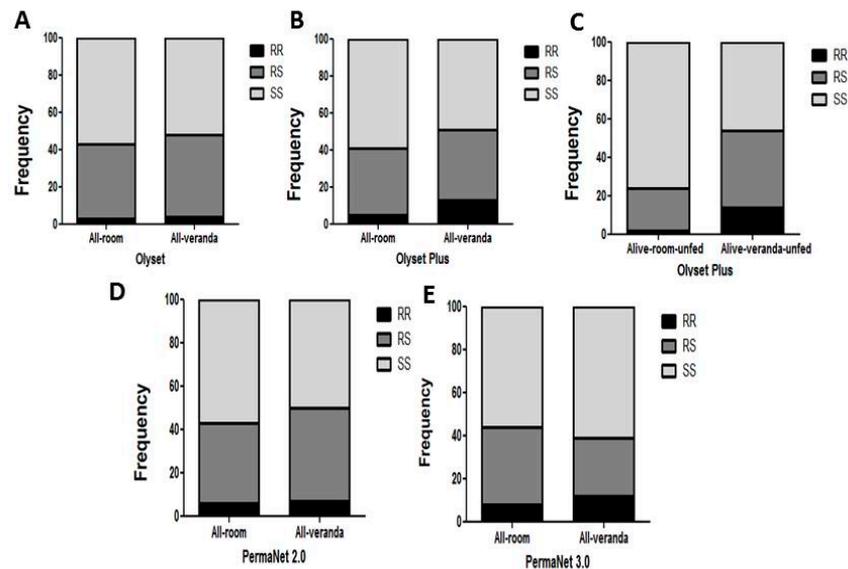
For PermaNet 2.0, no association was observed when comparing the allelic frequency R vs. S (OR = 1.31;  $p > 0.05$ ; CI 0.55–2.01) (Figure 3C and Table 5). But an association was observed when comparing genotypic frequency RS vs. SS (OR = 1.4;  $p < 0.001$ ; CI 0.77–2.53).

For PermaNet 3.0, a negative association was observed between the mutation and the ability to blood feed as resistant mosquitoes significantly blood fed less than susceptible when comparing the

allelic frequency (OR = 0.35;  $p < 0.05$ ; CI 0.17–0.73) and the genotypic frequency of RS vs. SS (OR = 0.5;  $p < 0.05$ ; CI 0.26–0.92) (Figure 3D and Table 5).

### 3.9. Impact on Exophily

For Olyset, no association was observed between the L119F-*GSTe2* mutation and exophily (67 in room and 48 in veranda) when comparing the allelic frequency (OR = 1.17;  $p > 0.05$ ; CI 0.6–2.2) (Table 4) and the genotypic frequency RS vs. SS (OR = 1.18;  $p > 0.05$ ; CI 0.6–2.1) (Figure 4A and Table 6).



**Figure 4.** Impact of the L119F-*GSTe2* mediated metabolic resistance on bednet efficacy -exophily: (A) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between indoor (Room) and outdoor (verandah) mosquitoes after exposure to Olyset showing no association; (B) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between indoor (Room) and outdoor (verandah) mosquitoes after exposure to Olyset Plus showing a significant increased ability to exit the room when considering all mosquitoes; (C) A greater association is observed with exophily with Olyset Plus when only analyzing unfed mosquitoes; (D) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between indoor (Room) and outdoor (verandah) mosquitoes after exposure to PermaNet 2.0 showing a significant association (RS vs. SS: OR = 1.35;  $p < 0.01$ ); (E) Genotype distribution of L119F-*GSTe2* between indoor (Room) and outdoor (verandah) mosquitoes after exposure to PermaNet 3.0 showing no association.

For Olyset Plus, an association was observed between the mutation and the ability to escape to the veranda when considering the allelic frequency (OR = 3.4;  $p < 0.001$ ; CI 1.67–6.9) (Table 6). An even stronger association was observed between the mutation and a preference for the veranda when comparing RR vs. SS (OR = 11.76;  $p < 0.01$ ; CI 2.59–53.4), RS vs. SS (OR = 2.99;  $p < 0.01$ ; CI 1.58–5.65). But no significant association was observed between RR vs. RS (OR = 3.9;  $p = 1$ ; CI 0.8–18.59) (Figure 4B,C and Table 6). For PermaNet 2.0, an association was observed between the L119F-*GSTe2* mutation and the ability to exit the room when comparing the genotypic frequency RS vs. SS (OR = 1.35;  $p < 0.01$ ; CI 0.75–2.3). A stronger association was observed when assessing the impact only among the unfed mosquitoes for RS vs. SS (OR = 3.37;  $p < 0.001$ ; CI 0.84–6.17) but not at the allelic level (Figure 4D and Table 6). For PermaNet 3.0, no association was observed between the L119F-*GSTe2* mutation and a preference for the room or the veranda when comparing the allelic frequency (OR = 0.94;  $p = 1$ ; CI 0.5–1.8) (Table 6). The same trend was observed when comparing the genotypic frequency RR vs. SS (OR = 1.22;  $p = 1$ ; CI 0.46–3.2), RS vs. SS (OR = 0.59;  $p > 0.05$ ; CI 0.31–1.12) RR vs. RS (OR = 1.68;  $p > 0.05$ ; CI 0.6–4.7) (Figure 4E and Table 6).

**Table 6.** Impact of L119F-GSTe2 mutation on the efficacy of various bed nets in repellency.

		<b>Exophily</b>			
		Genotype	OR	PV	CI
		RR vs. SS	3.1	>0.05	1.1–9
		RR vs. RS	2.48	>0.05	0.83–7.42
		RS vs. SS	1.25	>0.05	0.67–2.26
		R vs. S	1.1	>0.05	0.6–2.2
<b>Olyset Plus</b>	<b>Unfed Alive</b>				
		RR vs. SS	11.76	<0.01	2.59–53.4
		RR vs. RS	3.9	1	0.8–18.59
		RS vs. SS	2.99	<0.01	1.58–5.6
		R vs. S	3.4	<0.001	1.67–6.9
		RS vs. SS	1.18	>0.05	0.6–2.1
<b>PermaNet 3.0</b>		R vs. S	1.17	>0.05	0.62–2.2
		RR vs. SS	1.22	1	0.46–3.2
		RR vs. RS	1.68	>0.05	0.6–4.7
		RS vs. SS	0.59	>0.05	0.31–1.12
<b>PermaNet 2.0</b>		R vs. S	0.94	1	0.5–1.8
		RS vs. SS	1.35	<0.01	0.75–2.43
		R vs. S	1.22	>0.05	0.65–2.3
<b>PermaNet 2.0</b>	<b>Unfed Alive</b>				
		RS vs. SS	3.37	<0.001	1.84–6.17
	R vs. S	1.8	>0.05	0.99–3.38	

### 3.10. Correlation between L119F-GSTe2 and Mortality from Cone Assays

Due to the low number of dead mosquitoes obtained from the experimental huts, the impact of the L119F-GSTe2 on the ability of mosquitoes to survive exposure to various nets was assessed using samples from cone assays. Only a few dead were obtained for Yorkool and Olyset, preventing the assessment of these nets.

#### 3.10.1. Olyset Plus

No association was observed between the mutation and the mortality (40 dead vs. 40 alive mosquitoes) at both allelic level (OR = 1.04;  $p = 1$ ; CI 0.5–1.8) and genotypic for RR vs. SS (OR = 1.1;  $p > 0.05$ ; CI 0.4–2.7) (Figure 5A and Table 7).

#### 3.10.2. PermaNet 2.0

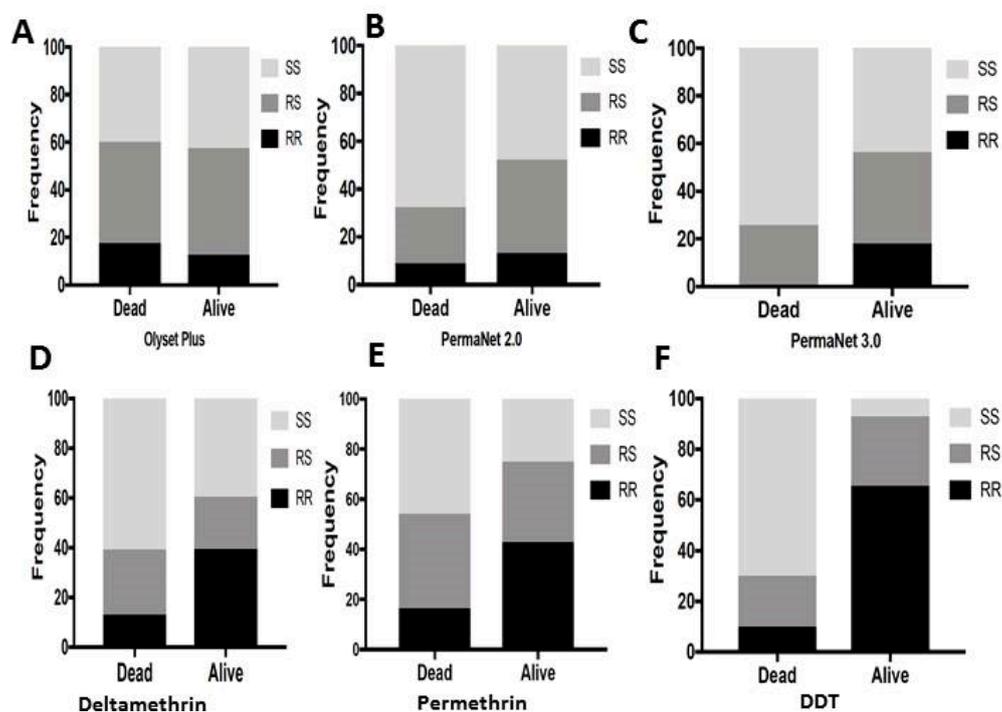
Resistant 119F-GSTe2 mosquitoes exhibited a greater ability to survive than susceptible mosquitoes (34 dead and 46 alive) at both allelic level (OR = 1.8;  $p < 0.01$ ; CI 0.9–3.5) and genotypic frequency RR vs. SS (OR = 2.09;  $p < 0.01$ ; CI 1.1–4.2) (Figure 5B and Table 7).

#### 3.10.3. PermaNet 3.0

Resistant 119F-GSTe2 mosquitoes when exposed to PermaNet 3.0 showed a greater ability to survive than susceptible mosquitoes even than with PermaNet 2.0 at allelic level (OR = 3.8;  $p < 0.001$ ; CI 1.8–7.7). A higher correlation was further observed when comparing the genotypic frequencies for RR vs. SS (OR = 30.1;  $p < 0.001$ ; CI 3.8–234), RS vs. SS (OR = 2.4;  $p < 0.01$ ; CI 1.3–4.5) and RR vs. RS (OR = 12.3;  $p < 0.001$ ; CI 1.8–7.7) (Figure 5C and Table 7). This result applies only to PermaNet 3.0 side net as no mosquito survived exposure to PermaNet top containing PBO.

### 3.11. Validation of the Association between L119F-GSTe2 and Resistance to Pyrethroids and DDT in Mibellon

To further validate the impact of L119F-GSTe2 on LLINs, we established the association between this marker and the ability to survive exposure to the pyrethroids used for Olyset (permethrin) and PermaNet (deltamethrin) nets besides DDT. Correlation analysis between L119F genotypes and deltamethrin revealed that homozygote resistant mosquitoes were significantly more likely to survive exposure to deltamethrin than both homozygote susceptible SS (OR = 4.6;  $p < 0.001$ ) and heterozygotes (OR = 3.75;  $p < 0.001$ ). However, there was no significant difference between RS and SS (Figure 5D). A similar pattern was observed for permethrin (Figure 5E and Table 5). Analysis of the correlation with DDT revealed a much stronger association between L119F and DDT resistance as RR exhibited a greater ability to survive exposure to DDT than SS (OR = 66.7;  $p < 0.001$ ) and also more than RS (OR = 4.8;  $p < 0.001$ ). Contrary to both pyrethroids heterozygote RS mosquitoes are also more able to survive exposure to DDT than homozygote susceptible (OR = 14.0;  $p < 0.001$ ) (Figure 5F and Table 7).



**Figure 5.** Association between L119F-GSTe2 mutation and ability to survive exposure to LLINs (cone assays) and WHO papers (bioassays): (A) Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive and dead mosquitoes after exposure to Olyset Plus showing no association; (B) Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive and dead mosquitoes after exposure to PermaNet 2.0 showing a significantly increased ability of resistant mosquitoes to survive (R vs. S:  $p < 0.01$ ); (C) Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive and dead mosquitoes after exposure to PermaNet 3.0 showing a significantly greater ability of resistant mosquitoes to survive than that seen for PermaNet 2.0 (RR vs. SS: OR = 30.1;  $p < 0.001$ ); (D) Genotype distribution of L119F-GSTe2 between alive (90 min) and dead (30 min) mosquitoes after exposure to deltamethrin showing a significantly greater ability of homozygote resistant mosquitoes to survive (RR vs. SS: OR = 4.6;  $p < 0.001$ ); (E) Similarly for permethrin, homozygote resistant mosquitoes exhibit a significantly greater ability of to survive (RR vs. SS: OR = 4.8;  $p < 0.001$ ); (F) For DDT, a much greater ability of mosquitoes with the resistance allele to survive exposure to DDT papers (RR vs. SS: OR = 66.7;  $p < 0.001$ ).

**Table 7.** Impact of GSTe2 on the ability of field population *An. funestus* to survive using samples from cone assays.

Cone Assays				
		OR	PV	CI
<b>Olyset Plus</b> 40 alive vs. 40 dead	RR vs. SS	1.1	>0.05	0.4–2.7
	RS vs. SS	0.9	1.0	0.5–1.8
	RR vs. RS	1.1	>0.05	0.4–2.7
	R vs. S	1.04	1.0	0.5–1.8
<b>PermaNet 2.0</b> 46 alive vs. 34 dead	RR vs. SS	2.09	<0.01	1.1–4.2
	RS vs. SS	2.3	<0.001	1.2–4.4
	RR vs. RS	0.8	>0.05	0.3–2.4
	R vs. S	1.8	<0.01	0.9–3.5
<b>PermaNet 3.0</b> 39 alive vs. 31 dead	RR vs. SS	30.1	<0.001	0.8–5.3
	RS vs. SS	2.4	<0.01	1.3–4.5
	RR vs. RS	12.3	<0.001	1.5–98.6
	R vs. S	3.8	<0.001	1.8–7.7
WHO Bioassays				
		OR	PV	CI
<b>Deltamethrin</b> 38 alive vs. 38 dead	RR vs. SS	4.6	<0.001	2.5–8.4
	RS vs. SS	1.22	>0.05	0.69–2.15
	RR vs. RS	3.75	<0.001	2.1–6.8
	R vs. S	2.80	<0.01	1.54–5.1
<b>Permethrin</b> 28 alive vs. 37 dead	RR vs. SS	4.8	<0.001	2.66–8.8
	RS vs. SS	1.6	>0.05	0.86–2.8
	RR vs. RS	3.1	<0.001	1.7–5.5
	R vs. S	2.99	<0.001	1.7–5.3
<b>DDT</b> 29 alive vs. 30 dead	RR vs. SS	66.7	<0.001	27.1–164
	RS vs. SS	14.0	<0.001	6.3–31.2
	RR vs. RS	4.8	<0.001	2.4–9.5
	R vs. S	15.3	<0.001	7.7–30.5

OR, Odds ratio; PV, *p* value; CI, Confidence interval.

## 4. Discussion

This study has taken advantage of the predominant presence of metabolic resistance in *An. funestus* and the recent availability of a simple DNA-based diagnostic tool for *GSTe2*, to establish the impact of GST-mediated metabolic resistance on the effectiveness of both pyrethroid-only and PBO-based LLINs against *An. funestus*.

### 4.1. PBO plus pyrethroid-Based Nets are More Effective than Pyrethroid-Only Nets against Pyrethroid Resistant *An. funestus*

#### 4.1.1. Mortality

The mortality rates obtained in this study with experimental huts were generally low (7.3 to 30.1%), but such mortality levels are similar to those observed in other experimental hut studies including in Benin [5], or recently in Burkina Faso where the mortality rates ranged from 9.5% to 46.1% in two locations of high pyrethroid resistance in *An. gambiae* [31]. However, higher mortality has been observed for another highly resistant pyrethroid resistant population of *An. gambiae* in Ivory Coast (Yaokoffikro) for PermaNet 3.0 (54%) and PermaNet 2.0 (34.7%) [32] than seen here for the *An. funestus* population in Mibellon, which could potentially be associated with differences in resistance mechanisms. The low level of mortality observed is likely due to the level of pyrethroid resistance in *An. funestus* in Mibellon with permethrin mortality around  $48.88 \pm 5.76\%$  and deltamethrin

mortality around  $38.34 \pm 5.79\%$  [18]. Nevertheless, despite the ongoing resistance both PBO-based nets induced a significantly higher mortality than the pyrethroid-only LLINs against both *An. funestus* and *Mansonia* spp. This higher mortality of PermaNet 3.0 and Olyset Plus with *An. funestus* is also in line with the cone assay results although PermaNet 3.0 (Top) presented a higher mortality for both huts and cone assays than Olyset Plus as also seen for *An. gambiae* in Burkina Faso [31]. Overall, the higher mortality with both PBO-nets suggests that, in areas of pyrethroid resistance, these new generation LLINs (PermaNet 3.0 and Olyset Plus) provide a better protection against both malaria vectors and nuisance mosquitoes such as *Mansonia* spp.

#### 4.1.2. Blood Feeding

The blood feeding rate of all the five nets, an indicator of the personal protection, provided by the net was significantly lower ( $\leq 23.8\%$ ;  $p < 0.001$ ) compared with the untreated control (40.8%). However, the blood feeding inhibition rate was higher for PermaNet 3.0 (61.5%) than PermaNet 2.0 (51.4%) this was not the case between Olyset Plus (55.6%) and Olyset (62.4%). Similar results have been obtained for *An. gambiae* in Benin [6] where comparable blood feeding inhibition rates were observed for Olyset Plus (85%) and Olyset (82%) despite the greater mortality rate with Olyset Plus (81%) vs. 42% for Olyset. The same pattern of blood feeding inhibition was observed here for *An. funestus* and *Mansonia* spp. with PermaNet 3.0 providing the highest inhibition level in *Mansonia* spp. whereas Olyset Plus was even lower than Olyset.

#### 4.1.3. Exophily

The excito-repellency effect of all the nets was at least twice higher compared to control showing that *An. funestus* mosquitoes were affected by the repellent effect of pyrethroids. These results are in line with previous results demonstrating the repellent effect of pyrethroid nets against *Anopheles* mosquitoes [19,32]. No significant difference was observed in the level of exophily between the conventional nets compared to synergist suggesting that PBO did not impact the repellent effect of pyrethroids. Comparing *An. funestus* to *Mansonia* spp., revealed a significant difference in term of exophily with only 6.9% of *An. funestus* exiting the hut with untreated net whereas 42.4% *Mansonia* spp. exited the room with control net. This is different from the previous observation in Ivory Coast where a similar exophily (~35%) was observed for both *An. gambiae* and *Mansonia* spp. in experimental huts [32]. Furthermore, while all the 5 LLINs significantly increased the exophily rate for *An. funestus*, this was not the case in *Mansonia* spp. with no significant change observed probably as *Mansonia* spp. are more exophilic [33].

### 4.2. GSTe2 Mediated Metabolic Resistance Is Reducing Efficacy of LLINs

With the design of the L119F-GSTe2 diagnostic tool [8], this study has investigated for the first time the impact of GST-mediated metabolic resistance on the efficacy of LLINs.

#### 4.2.1. Experimental Hut Study

A significant association was observed between the blood feeding ability of *An. funestus* and the L119F-GSTe2 mutation as mosquitoes with the 119F resistance allele have significantly higher blood feeding rate compared to those with L119 susceptible allele against Olyset Net ( $p < 0.001$ ) and Olyset plus ( $p < 0.001$ ). This is similar with observations for the cytochrome P450s *CYP6P9a* and *CYP6P9b* for which the resistant alleles *CYP6P9a\_R* and *CYP6P9b\_R* were recently shown, in a release-recapture experimental hut study, to also provide a greater ability to blood feed and to survive exposure to pyrethroid-only LLIN (PermaNet 2.0) [14,34]. This suggests that L119F-GSTe2 mutation likely contributes to an increased malaria transmission as every additional bite increases the chance of sporozoite to be passed to the populations. This is particularly a concern as 119F-RR resistant mosquitoes have also been shown to live longer [27,28] and to have a greater vectorial capacity to transmit *Plasmodium* [12]. However, it is noticeable that the impact of L119F-GSTe2 on blood feeding

ability is mainly seen for Olyset Plus and Olyset LLINs impregnated with permethrin but present an opposite effect for PermaNet 3.0 and 2.0 both impregnated with deltamethrin. The cause of such difference between permethrin- and deltamethrin-based nets is unclear at this point since the greater blood feeding in Olyset net is not associated with greater survivorship. Functional analyses with transgenic *Drosophila*, In vitro metabolism assays with recombinant *GSTe2* enzyme combined with genotype/phenotypes analyses had shown that *GSTe2* was able to confer resistance to both permethrin and deltamethrin but more so to permethrin [35,36]. This could partly explain the differences observed between permethrin- and deltamethrin-based nets although further studies will be needed to fully establish the underlying reason. Similar genotype/phenotype studies performed to assess the impact of the knockdown target-site resistance (*kdr*) on resistance did not reveal such a significant association with blood feeding potentially due to the fact that *kdr* frequency was already very high in tested *An. gambiae* population [21]. However, indirect comparison of *kdr* effect in two separate populations of *An. gambiae* in Benin; one with high *kdr* frequency (Ladji) and another with low frequency (Malanville) did suggest that *kdr* could also impact the efficacy of LLINs [19].

Interestingly, the L119F-*GSTe2* mutation was also associated with an increased exophily for Olyset Plus and PermaNet 2.0 suggesting that the increased expression of *GSTe2* could impact mosquito's behavior helping them avoid exposure to insecticides. Similarly, over-expression of carboxylesterase in *Culex pipiens* [37] has been previously associated with a behavioral change as resistant mosquitoes were found to have a reduced mobility [37] supporting that metabolic resistance could impact mosquitoes' behavior in the presence of insecticide-based interventions.

No significant association was observed between L119F-*GSTe2* and mortality in the experimental hut's samples for all LLINs potentially due to the low number of dead mosquitoes which did not provide statistical power coupled with lower frequency of RR in this location. However, a trend was observed for PermaNet 3.0 with an increased proportion of 119F homozygote resistant mosquitoes able to survive exposure to this LLIN than both homozygote susceptible L119-SS (OR = 3.47;  $p > 0.05$ ) and heterozygotes (OR = 3.46;  $p > 0.05$ ).

However, other mechanisms than GSTs are also at play in this location of Mibellon, as shown recently [14], revealing the over-expression of cytochrome P450 genes such as CYP6P5 and CYP325a. Unfortunately, there is not yet a molecular marker to help assess the impact of these genes with the different samples collected after experimental huts. Generating more DNA-based markers as done for the CYP6P9a/b [14] and for L119F-*GSTe2* [8] will further help to gain a more complete picture of the impact of resistance as a whole. No *kdr* target-site resistance has yet been detected in *An. funestus* (Irving et Wondji 2017) including in Mibellon [18].

#### 4.2.2. Impact from Cone Assays

The trend for a correlation between *GSTe2* and reduced mortality with LLINs was supported by results from cone assays where a very strong association was observed between L119F-*GSTe2* and ability to survive exposure to PermaNet 3.0 (side) (OR = 30.1) and PermaNet 2.0 although at lower extent (OR = 2.09). The lack of association observed with Olyset Plus could be explained by the effect of PBO which for this net is incorporated on the entire net whereas for PermaNet 3.0 PBO is only on the top. The PermaNet 3.0 (side) used here does not contain PBO. One reason why a greater association is found with PermaNet 3.0 (side) could be the fact that with higher deltamethrin concentration than PermaNet 2.0, mosquitoes surviving exposure to PermaNet 3.0 are those likely to be much more resistant because of a greater expression of *GSTe2* and other cytochrome P450s. So the higher dose of deltamethrin in PermaNet 3.0 has further selected mosquitoes with 119F-*GSTe2* resistant allele than with the lower dose in PermaNet 2.0. This is also the likely reason why a trend of a greater ability to survive was seen in the experimental hut for PermaNet 3.0. This suggests that mosquitoes displaying several resistance mechanisms than just P450-based resistance could avoid even PBO-based nets as when cytochrome P450 enzymes are inhibited by PBO, mosquitoes bearing other mechanisms, as in this case the 119F resistance allele, are able to better survive exposure to PBO-based nets. However,

this cannot explain why such results were not observed with Olyset Plus the other PBO-net. However, the spread of a *GSTe2*-mediated metabolic resistance conferring the ability of mosquitoes to survive exposure to synergist LLINs will constitute a concern at a time when such nets are gradually being introduced to fight pyrethroid resistant mosquitoes. GST resistance will also need to be taken into consideration than just cytochrome P450 resistance. Nevertheless the greater efficacy seen with the roof of PermaNet 3.0 in cone bioassays shows that P450 role remains important. Future studies will need to also perform synergist assays with DEM and PBO to establish the contribution of both GSTs and cytochrome P450s to better inform of the likely efficacy of LLINs.

## 5. Conclusions

This study has revealed a loss of efficacy of LLINs against pyrethroid resistant populations of *An. funestus* in Cameroon using experimental huts. However, PBO based nets (PermaNet 3.0 and Olyset Plus) are more efficient than conventional pyrethroid-only nets. It is the reason why as suggested by WHO 2017 report we recommend the deployment of PBO nets in area where pyrethroid resistance is confirmed and at least partly conferred by P450. Noticeably, the GST-mediated metabolic resistance not impacted by PBO could threaten the continued effectiveness of the PBO-based LLINs and the impact of this mechanism needs also to be considered to maximize the effectiveness of LLINs. One option could be to generate new mosaic LLINs also incorporating the Diethyl Maleate (DEM) beside PBO to inhibit GST metabolic activity and further increase the efficacy of these nets. However, further studies will need to be performed before including establishing the extent of synergism provided by DEM in various mosquito populations and the most suitable position on the net (either on top as PBO or on the entire net).

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/2/143/s1>, Figure S1: Impact of the *L119F-GSTe2* mediated metabolic resistance on bednet efficacy looking at the mortality rate after exposure to LLINs, Table S1: Linear mixed effect model analysis showing different sources of variations that may influenced the exophily, Table S2: Linear mixed effect model analysis showing different sources of variations that may influenced the mortality, Table S3: Linear mixed model effect analysis showing different sources of variations that may influenced the Blood feeding.

**Author Contributions:** C.S.W. conceived, designed and coordinated the research. B.D.M., M.F.K., J.M.R. and W.T. carried out the sample collection and bioassays. B.D.M., M.F.K., M.J.W. and M.T. performed the PCR and TaqMan. C.S.M. contributed in the design and building of experimental huts; B.D.M. and C.S.W. performed data analysis; B.D.M., J.M.R., M.O.K. and C.S.W. wrote the manuscript with contribution from all the authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Funded by the Wellcome Trust Senior Research Fellowship in Biomedical Sciences to C.S.W. (101893/Z/13/Z).

**Acknowledgments:** The authors will like to thank the inhabitants of Mibellon for their support during the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.E.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**, *526*, 207–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kleinschmidt, I.; Bradley, J.; Knox, T.B.; Mnzava, A.P.; Kafy, H.T.; Mbogo, C.; Ismail, B.A.; Bigoga, J.D.; Adechoubou, A.; Raghavendra, K.; et al. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: A WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 640–649. [[CrossRef](#)]
3. Protopopoff, N.; Mosha, J.F.; Lukole, E.; Charlwood, J.D.; Wright, A.; Mwalimu, C.D.; Manjurano, A.; Mosha, F.W.; Kisinza, W.; Kleinschmidt, I.; et al. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: A cluster, randomised controlled, two-by-two factorial design trial. *Lancet* **2018**, *391*, 1577–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Corbel, V.; Chabi, J.; Dabire, R.K.; Etang, J.; Nwane, P.; Pigeon, O.; Akogbeto, M.; Hougard, J.M. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet® 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: A multi centre study in Western and Central Africa. *Malar. J.* **2010**, *9*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. N'Guessan, R.; Asidi, A.; Boko, P.; Odjo, A.; Akogbeto, M.; Pigeon, O.; Rowland, M. An experimental hut evaluation of PermaNet® 3.0, a deltamethrin-piperonyl butoxide combination net, against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in southern Benin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 758–765. [[CrossRef](#)]
6. Pennetier, C.; Bouraima, A.; Chandre, F.; Piameu, M.; Etang, J.; Rossignol, M.; Sidick, I.; Zogo, B.; Lacroix, M.N.; Yadav, R.; et al. Efficacy of Olyset® Plus, a new long-lasting insecticidal net incorporating permethrin and piperonyl-butoxide against multi-resistant malaria vectors. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75134. [[CrossRef](#)]
7. World Health Organization (WHO). *World Malaria Report 2017*; WHO: Geneva, Switzerland, 2017; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
8. Riveron, J.M.; Yunta, C.; Ibrahim, S.S.; Djouaka, R.; Irving, H.; Menze, B.D.; Ismail, H.M.; Hemingway, J.; Ranson, H.; Albert, A.; et al. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically-based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol.* **2014**, *15*, R27. [[CrossRef](#)]
9. Hemingway, J.; Ranson, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **2000**, *45*, 369–389. [[CrossRef](#)]
10. Mitchell, S.N.; Rigden, D.J.; Dowd, A.J.; Lu, F.; Wilding, C.S.; Weetman, D.; Dadzie, S.; Jenkins, A.M.; Regna, K.; Boko, P.; et al. Metabolic and target-site mechanisms combine to confer strong DDT resistance in *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92662. [[CrossRef](#)]
11. Lumjuan, N.; Rajatileka, S.; Changsom, D.; Wicheer, J.; Leelapat, P.; Prapanthadara, L.A.; Somboon, P.; Lycett, G.; Ranson, H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 203–209. [[CrossRef](#)]
12. Tchouakui, M.; Chiang, M.C.; Ndo, C.; Kuicheu, C.K.; Amvongo-Adjia, N.; Wondji, M.J.; Tchoupo, M.; Kusimo, M.O.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher Plasmodium infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Riveron, J.M.; Watsenga, F.; Irving, H.; Irish, S.R.; Wondji, C.S. High Plasmodium Infection Rate and Reduced Bed Net Efficacy in Multiple Insecticide-Resistant Malaria Vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J. Infect. Dis.* **2017**, *217*, 320–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Weedall, G.D.; Mugenzi, L.M.; Menze, B.D.; Tchouakui, M.; Ibrahim, S.S.; Amvongo-Adjia, N.; Irving, H.; Wondji, M.J.; Tchoupo, M.; Djouaka, R. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaat7386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Riveron, J.M.; Irving, H.; Ndula, M.; Barnes, K.G.; Ibrahim, S.S.; Paine, M.J.; Wondji, C.S. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 252–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Irving, H.; Wondji, C.S. Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Menze, B.D.; Riveron, J.M.; Ibrahim, S.S.; Irving, H.; Antonio-Nkondjio, C.; Awono-Ambene, P.H.; Wondji, C.S. Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163261. [[CrossRef](#)]
18. Menze, B.D.; Wondji, M.J.; Tchoupo, W.; Tchoupo, M.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in central Cameroon. *Malar. J.* **2018**, *17*, 317. [[CrossRef](#)]
19. N'Guessan, R.; Corbel, V.; Akogbeto, M.; Rowland, M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 199. [[CrossRef](#)]
20. World Health Organization (WHO). *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors*; WHO: Geneva, Switzerland, 2012.

21. Ngufor, C.; Chouaibou, M.; Tchicaya, E.; Loukou, B.; Kesse, N.; N'Guessan, R.; Johnson, P.; Koudou, B.; Rowland, M. Combining organophosphate-treated wall linings and long-lasting insecticidal nets fails to provide additional control over long-lasting insecticidal nets alone against multiple insecticide-resistant *Anopheles gambiae* in Cote d'Ivoire: An experimental hut trial. *Malar. J.* **2014**, *13*, 396. [[CrossRef](#)]
22. World Health Organization (WHO). *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*; WHO: Geneva, Switzerland, 2013.
23. World Health Organization (WHO). *Guidelines for Laboratory and Field-Testing of Long-Lasting Insecticidal Nets*; WHO: Geneva, Switzerland, 2013.
24. Gillies, M.; Coetzee, M. A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.* **1987**, *55*, 1–143.
25. Koekemoer, L.L.; Kamau, L.; Hunt, R.H.; Coetzee, M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 804–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Livak, K.J. Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* **1984**, *107*, 611–634. [[PubMed](#)]
27. Tchouakui, M.; Riveron, J.M.; Djonabaye, D.; Tchapgá, W.; Irving, H.; Takam, P.S.; Njiokou, F.; Wondji, C.S. Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes* **2018**, *9*, 645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tchouakui, M.; Fossog, B.T.; Ngannang, B.V.; Djonabaye, D.; Tchapgá, W.; Njiokou, F.; Wondji, C. Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector. *Wellcome Open Res.* **2019**, *4*, 13.
29. Badolo, A.; Guelbéogo, W.M.; Tiono, A.B.; Traoré, A.; Sirima, S.B. Laboratory evaluation of Fendona 6SC<sup>®</sup> treated bednets and Interceptor<sup>®</sup> long-lasting nets against *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1069–1075. [[CrossRef](#)]
30. Chouaibou, M.; Simard, F.; Chandre, F.; Etang, J.; Darriet, F.; Hougard, J.M. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in North Cameroon. *Malar. J.* **2006**, *5*, 77. [[CrossRef](#)]
31. Toe, K.H.; Muller, P.; Badolo, A.; Traore, A.; Sagnon, N.; Dabire, R.K.; Ranson, H. Do bednets including piperonyl butoxide offer additional protection against populations of *Anopheles gambiae* s.l. that are highly resistant to pyrethroids? An experimental hut evaluation in Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
32. Koudou, B.G.; Koffi, A.A.; Malone, D.; Hemingway, J. Efficacy of PermaNet<sup>®</sup> 2.0 and PermaNet<sup>®</sup> 3.0 against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* in experimental huts in Cote d'Ivoire. *Malar. J.* **2011**, *10*, 172. [[CrossRef](#)]
33. Kumar, N.P.; Sabesan, S.; Panicker, K. The resting and house frequenting behavior of *Mansonia annulifera*, *Ma. uniformis* and *Ma. indiana*, the vectors of Malayan filariasis in Kerala State, India. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1992**, *23*, 324–327.
34. Mugenzi, L.M.; Menze, B.D.; Tchouakui, M.; Wondji, M.J.; Irving, H.; Tchoupo, M.; Hearn, J.; Weedall, G.D.; Riveron, J.M.; Wondji, C.S. Cis-regulatory CYP6P9b P450 variants associated with loss of insecticide-treated bed net efficacy against *Anopheles funestus*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)]
35. Riveron, J.M.; Ibrahim, S.S.; Chanda, E.; Mzilahowa, T.; Cuamba, N.; Irving, H.; Barnes, K.G.; Ndula, M.; Wondji, C.S. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Riveron, J.M.; Osaé, M.; Egyir-Yawson, A.; Irving, H.; Ibrahim, S.S.; Wondji, C.S. Multiple insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in southern Ghana: Implications for malaria control. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Berticat, C.; Duron, O.; Heyse, D.; Raymond, M. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet. Res.* **2004**, *83*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

