

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTÉ DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

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

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ÉCOLOGIE
LABORATORY OF PARASITOLGY AND ECOLOGY

Détection des marqueurs moléculaires de la résistance métabolique aux pyréthrinoïdes chez des vecteurs de paludisme à Yaoundé, Cameroun

THÈSE

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

Option : Parasitologie et Écologie

Par

FOTSO TOGUEM Yvan Gaétan

Matricule : 11Q0235

Maître ès-Sciences

et

Soutenue publiquement le 09 décembre 2024 devant le jury composé de :

FOMENA Abraham, Professeur, Université de Yaoundé I	Président
NJIOKOU Flobert, Professeur, Université de Yaoundé I	Rapporteur
WONDJI Charles Sinclair, Professeur, Liverpool School of Tropical Medicine	Rapporteur
TCHUINKAM Timoléon, Professeur, Université de Ngaoundéré	Membre
DJIETO Lordon Champlain, Professeur, Université de Yaoundé I	Membre
TOMBI Jeannette, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I	Membre



Année 2024

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE ANIMALES
BP 812 – Tél : (237) 222-56-59
Fax : (237) 233-46-96
CAMEROUN



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

ATTESTATION DE CORRECTION

Conformément à l'autorisation de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D V/L N°189-2024/Uyi/CRFD-SVSE/URFD-SV/Ad du 05 septembre 2024 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Détection des marqueurs moléculaires de la résistance métabolique aux pyréthriinoïdes chez des vecteurs de paludisme à Yaoundé, Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **vendredi 09 décembre 2024** par l'étudiant **FOTSO TOGUEM Yvan Gaétan**, Matricule **11Q0235**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

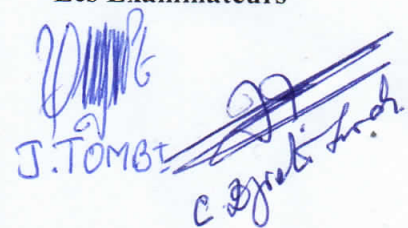
En foi de quoi la présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **20 MARS 2025**

Le Président du Jury


A. FONTENA

Les Examineurs


J. TOMBE
C. Djoué

Le Chef de Département





Pr. Sévilor KEKEUNOU
Faculté des Sciences
Université de Yaoundé I

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTÉ DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

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

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ÉCOLOGIE
LABORATORY OF PARASITOLGY AND ECOLOGY

**Détection des marqueurs moléculaires de la résistance
métabolique aux pyréthriinoïdes chez des vecteurs de
paludisme à Yaoundé, Cameroun**

THÈSE

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

Option : Parasitologie et Écologie

Par

FOTSO TOGUEM Yvan Gaétan

Matricule : 11Q0235

Maître ès-Sciences

et

Soutenue publiquement le 09 décembre 2024 devant le jury composé de :

FOMENA Abraham , Professeur, Université de Yaoundé I	Président
NJIOKOU Flobert , Professeur, Université de Yaoundé I	Rapporteur
WONDJI Charles Sinclair , Professeur, Liverpool School of Tropical Medicine	Rapporteur
TCHUINKAM Timoléon , Professeur, Université de Ngaoundéré	Membre
DJIETO Lordon Champlain , Professeur, Université de Yaoundé I	Membre
TOMBI Jeannette , Maître de Conférences, Université de Yaoundé I	Membre

Année 2024

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

BP 812 – Tél : (237) 222-56-59

ATTESTATION DE CORRECTION

Conformément à l'autorisation de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D V/L N°189-2024/Uyi/CRFD-SVSE/URFD-SV/Ad du 05 septembre 2024 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Détection des marqueurs moléculaires de la résistance métabolique aux pyréthrinoides chez des vecteurs de paludisme à Yaoundé, Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **vendredi 09 décembre 2024** par l'étudiant **FOTSO TOGUEM Yvan Gaétan**, Matricule **11Q0235**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

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


Fait à Yaoundé, le

Le Président du Jury

Les Examineurs

Le Chef de Département

ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDÉ I

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2024/2025

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 16 janvier 2025

ADMINISTRATION

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

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	BEBEE Fadimatou	Maître de Conférences	En poste
11.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Maître de Conférences	En poste
12.	FONKOUA Martin	Maître de Conférences	En poste
13.	AKINDEH MBUH NJI	Maître de Conférences	En poste
14.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
15.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
16.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
17.	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
19.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
20.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
21.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
22.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
23.	KENGNE NOUEMSI Anne Pascale	Maître de Conférences	En poste
24.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
25.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
26.	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste
27.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
28.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
29.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
30.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
31.	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste

32.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Maître de Conférences	En poste
33.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
34.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Chargé de Cours	En poste
35.	ELLA Fils Armand	Chargé de Cours	En poste
36.	EYENGA Eliane Flore	Chargée de Cours	En poste
37.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
38.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
39.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Chargée de Cours	En poste
40.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
41.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargée de Cours	En poste
42.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
43.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste
44.	WOGUIA Alice Louise	Chargée de Cours	En poste

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

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En poste
3.	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En poste
4.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeure	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
5.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	MEGNEKOU Rosette	Professeure	En poste
7.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
8.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
11.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
12.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
13.	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
14.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste

16.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
17.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Maître de Conférences	En poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
23.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
24.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
25.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Maître de Conférences	En poste
26.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
27.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
28.	TADU Zephyrin	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
31.	YEDE	Maître de Conférences	En poste
32.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Chargée de Cours	En poste
33.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
34.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
35.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
36.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargée de Cours	En poste
37.	FOSSI TANKOUA Olivia Epse DJEUTCHOUANG SAYANG	Chargée de Cours	En poste
38.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
39.	KOGA MANG Dobara	Chargé de Cours	En poste
40.	LEME BANOCK Lucie	Chargée de Cours	En poste
41.	MAPON NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
42.	METCHI DONFACK Mireille Flaure EPSE GHOUMO	Chargée de Cours	En poste
43.	NDENGUE Jean De Matha	Chargé de Cours	En poste
44.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
45.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Cheffe Div. U. Bamenda</i>

46.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48.	ZEMO GAMO Franklin	Chargé de Cours	En poste
49.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (37)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	BIYE Elvire Hortense	Professeure	En poste
3.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4.	MBOLO Marie	Professeure	En poste
5.	NDONGO BEKOLO	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	DJEUANI Astride Carole	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT/MINRESI</i>
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA Jean Michel	Maître de Conférences	En poste
17.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE Christelle	Chargé de Cours	En poste
19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargée de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargée de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL Annie Claude	Chargée de Cours	<i>En détachement/ UNESCO MALI</i>
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste

28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargée de Cours	En poste
31.	BOLIE Hubert	Assistant	En poste
33.	MACHE NKOUANDEU Pasma	Assistante	En poste
34.	MAFFO FOKOU Adèle	Assistante	En poste
35.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste
36.	NTONMEN YPNKEU Amandine Flore	Assistante	En poste
37.	ONANA EBODE Clotaire	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
5.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Professeur	En poste
6.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste
7.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
8.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
9.	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
10.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
11.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
12.	MBEY Jean Aimé	Maître de Conférences	En poste
13.	NDI Julius NSAMI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
14.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
15.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
16.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
17.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
18.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
19.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
20.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

21.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
22.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
23.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
24.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
25.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
26.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste
27.	DANTIO NGUELA Christian Brice	Assistant	En poste
28.	LEKENE NGOUATEU Reine	Assistant	En poste

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

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

24	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
25	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
26	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
27	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
28	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
29	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
30	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	TSAMO TONTSA Armelle	Chargée de Cours	En poste
32	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
34	NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)

1.	BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	---------------	------------	----------------------------

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

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division des SI/MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général Académique/MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Professeur	En poste
4.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Maître de Conférences	<i>CTI/MINFOPRA</i>
5.	MELATAGIA YONTA Paulin	Maitre de Conférences	En poste
6.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
7.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
8.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargée de Cours	En Poste
9.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
10.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
11.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Chargé de Cours	En poste
12.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
13.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
14.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
15.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	<i>Chef de Département/</i>

			<i>Génie Info./U Ebolowa</i>
16.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
17.	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Chargé de Cours	En poste
18.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
19.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
20.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22.	MAXWELL NDOGNKON MANGA	Assistant	En poste
23.	NDOM Francis Rollin	Assistant	En poste
24.	NGUIMEYA TSOFAK Baudoin	Assistant	En poste
25.	NKONDOCK. MI BAHANACK. N.	Assistant	En poste
8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (34)			
1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département/D. ENSPY</i>
2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	<i>Chef de Division/ENSPY</i>
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>VDRC/FS/UYYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Chargé de Cours	En poste
13.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17.	KOKOMO AYISSI Eric Brice	Chargé de Cours	En poste (transfert de l'université de Douala)
18.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste

19.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
20.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
21.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
22.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
23.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
24.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
25.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
26.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
27.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
29.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
30.	EBODE ATANGANA Pie Désiré	Assistant	En poste
31.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
32.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
33.	MAMA ASSANDJE Prosper	Assistant	En poste
34.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
35.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
36.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste

9 - DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Professeure	En poste
3.	MUNE MUNE Martin Alain	Professeur	En poste
4.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeure	<i>Vice-Doyen / DSSE</i>
5.	RIWOM Sara Honorine	Professeure	En poste
6.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste
7.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	<i>Doyen/FASA/UDs</i>
8.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10.	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
11.	EHETH Jean Samuel	Chargé de Cours	En poste

12.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
13.	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Chargé de Cours	En poste
14.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
15.	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
16.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargée de Cours	<i>Cheffe de service/DAAC/UIYI</i>
17.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18.	NKOUE TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
19.	NGOUEENAM Romial Joël	Chargé de Cours	En poste
20.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Chargé de Cours	En poste
21.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
22.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargée de Cours	En poste
23.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
24.	ZO'O EZO'O Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
25.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistante	En poste

10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (45)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
3.	DJUIDJE KENMOE ép. ALOYEM	Professeur	En poste
4.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOU DA Jean sire	Professeur	En poste
7.	FEWO Serge Ibraïd	Professeur	En poste
8.	HONA Jacques	Professeur	En poste
9.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
10.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	<i>Chef de Département/ Uni. Bertoua</i>
11.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
12.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
13.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>

14.	SIEWE SIEWE Martin	Professeur	En poste
15.	SIMO Elie	Professeur	En poste
16.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FS/Univ/Bda</i>
17.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
18.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
19.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
20.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Professeur	En poste
21.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	<i>Cheffe de Div./ENSPY</i>
22.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	<i>Chef Cell/MINADER</i>
23.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
26.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
27.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
28.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Secrétaire Générale /UYII</i>
29.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>Absente de son poste</i>
30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
33.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
34.	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
35.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
36.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
37.	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
38.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Chef de Div./DIPD/UYI</i>
39.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Chargé de Cours	En poste
40.	TCHAPET NJAFA Jean-Pierre	Chargé de Cours	<i>Chef Ser. Adj./FLASH/UYI</i>
41.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
42.	TOGUEU MOTCHEYO Alain Bertrand	Chargé de Cours	En poste
43.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
44.	ETEME Armand Sylvain	Assistant	En poste

45.	NGO MOUELLAS épouse LOTHIN	Assistante	En poste
46.	TCHODIMOU Carole	Assistant	En poste
47.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

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

1.	BISSO Dieudonné	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	EKOMANE Emile	Professeur	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
3.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
4.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Vice-Doyen /DPSAA</i>
5.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Professeur	<i>CEA/MINRESI</i>
6.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
7.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
9.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>
10.	TCHOUANKOUE Jean Pierre	Professeur	En poste

11.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
12.	EYONG John TAKEM	Maître de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)</i>
14.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Maitre de Conférences	En poste
15.	MBIDA YEM	Maître de Conférences	En poste
16.	MBESSE Cécile Olive	Maitre de Conférences	En poste
17.	METANG Victor	Maître de Conférences	En poste
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
20.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Maître de Conférences	En poste
21.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
22.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Maître de Conférences	En poste
23.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste

26.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Chargé de Cours	En poste
27.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
28.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
29.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
30.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
31.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Chargée de Cours	En poste
32.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
33.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	08 (01)	25 (15)	11 (05)	00 (00)	44 (21)
BPA	12 (02)	18 (06)	16 (06)	01 (01)	47 (15)
BPV	08 (02)	10 (03)	14 (06)	06 (03)	39 (14)
CI	06 (01)	14 (02)	05 (01)	03 (01)	28 (05)
CO	06 (01)	14 (05)	12 (03)	02 (00)	33 (09)
ER	01 (00)	/	/	/	01 (0)
IN	03 (00)	03 (00)	13 (01)	06 (00)	24 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	20 (01)	07 (01)	36 (02)
MIB	05 (03)	05 (01)	13 (06)	01 (01)	24 (11)
PHY	17 (01)	11 (04)	15 (01)	04 (02)	45 (08)
ST	10 (00)	14 (05)	09 (02)	00 (00)	33 (07)
Total	67 (11)	122 (41)	128 (32)	30 (09)	342 (88)

Soit un total de **360 (94)** dont :

Professeurs **67 (11)**

Maîtres de Conférences **122 (41)**

Chargés de Cours **128 (32)**

Assistants **30 (09)**

() = Nombre de Femmes **94**

ENSEIGNANTS SOUS CONTRAT DE COLLABORATION

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	MATRICULE	SEXE	PISE DE SERVICE	OBSERVATIONS
1.	BELL JOSEPH MARTIN	PR	547019U	M	10/11/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
2.	DJOUFAC WOUMFO EMMANUEL	PR	547069Z	M	04/05/1990	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
3.	FOMENA ABRAHAM	PR	546778X	M	01/12/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
4.	GHOGOMU TIH RAPH	PR	547004-K	M	13/10/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
5.	KAMTCHOUING PIERRES	PR	143299X	M	01/10/1988	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
6.	NGADJUI TCHALEU BONAVENTURE	PR	546959-G	M	12/08/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
7.	NGO BILONG ANASTASIE épouse TIH	PR	546164-I	F	28/07/2000	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
8.	NKENGFACK EPHRAIM AUGUSTIN	MC	546948-F	M	01/09/1983	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION
9.	NDIKONTAR MAURICE KOR	PR	169784G	M	10/01/1991	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION-
10.	NJIOKOU FLOBERT	PR	547321H	M	03/05/1993	EN COURS DE SIGNATURE
11.	BENG NEE NINTCHOM PENLAP VERONIQUE	PR	546643B	F	02/10/1992	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION
12.	FOKOU ELIE	PR	546725J	M	01/04/1988	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION EN
13.	TCHOUANKEU JEAN CLAUDE	PR	547295-E	M	01/12/1989	COURS DE FINALISATION

14.	BOYOMO ONANA	PR				CONTRATS TRAITES LORS DU CONSEIL D'UNIVERSITE DU 12 JUILLET 2024
15.	WANDJI JEAN	MC	162242M	M		
16.	YOUMBI EMMANUEL	UYI	547332Z	M	Bangou	
17.	NGODO MELINGUI JEAN	PR	500475X		20/10/2005	
18.	KOFANE TIMOLEON CREPIN	MC				
19.	NGAMENI EMMANUEL	PR	547277-C	M		
20.	BITOM DIEUDONNE	PR	547050X	M		

DÉDICACE

À mes parents,

mon papa M. FOTSO TOGUEM Pierre Covington **et ma regrettée** Maman Mme DJOMO
Solange Camille

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué conjointement au Laboratoire du « Centre for Research in Infectious Diseases » et au Laboratoire de Parasitologie et Ecologie de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet PIIVeC, intitulé « Partnership for Increasing the Impact of Vector control » (MR/P027873/1) financé par le « UK Medical Research Council » (MRC) et le « Global Challenges Research Fund » (GCRF) accordé au Dr TENE FOSSOG Billy.

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

- au Professeur NJIOKOU Flobert, pour sa grande disponibilité, ses conseils et sa collaboration productive. Ma rencontre avec lui a été un déclic vers l'excellence scientifique. Qu'il en soit remercié ;
- au Professeur WONDJI Charles Sinclair, Directeur Exécutif du Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), le centre de recherche qui a hébergé le projet PIIVeC au Cameroun. Il a accepté de codiriger cette thèse et guider mes pas dans le monde de la biologie moléculaire dans un cadre chaleureux et convivial. Ses multiples orientations, conseils, sa rigueur et surtout son sens du travail bien fait ont été pour moi une vraie source d'encouragement et de motivation ;
- au Docteur TENE FOSSOG Billy, pour le suivi quotidien apporté tout au long de ce travail en tant que principal investigateur du projet, mais surtout pour la confiance qu'il m'a accordée. Etant novice dans le domaine de la biologie moléculaire, il a su me guider de la collecte, analyses des données à la rédaction scientifiques des articles ;
- aux Experts et Membres du Jury de pré-soutenance, qui ont bien voulu évaluer ce travail dont les corrections et les commentaires ont amélioré la qualité de cette thèse ;
- à tout le corps enseignant du département de Biologie et Physiologie Animales (DBPA) et particulièrement aux Professeurs BILONG BILONG Charles Felix, Chef de Département, FOMENA Abraham et MIMPFOUNDI Rémy, pour leur contribution à ma formation académique, mais également pour l'évaluation de ce travail depuis le projet de thèse ;
- aux Professeurs KEKEUNOU Sévilor et MAHOB Raymond Joseph, pour leurs contributions multiformes ;
- au Professeur NDO Cyrille, Drs ELANGA Emmanuel, KAMGANG Basile, MELACHIO Trésor, SANDEU Marcel, SIMO Huguette, DJUICY Delia, TCHOUAKUI Magellan,

MUGENZI Léon, MENZE Benjamin, AMEN Fadel, NGUETE Daniel, KAMDEM Colince, FOUET Caroline, NCHOUTPOUEN Elysée, pour le soutien et leurs conseils et encouragements ;

- à Mme WONDJI Murielle, Chef du laboratoire de biologie moléculaire du CRID, pour l'accueil chaleureux et l'initiation aux différentes techniques de biologie moléculaire, mais également pour ses conseils permanents ;
- aux techniciens de laboratoire : MM.TCHAPGA Williams, EBAI Térance, MBAKAM Bertrand et Mme TCHOUPPO Mi-carême, pour leur franche collaboration ;
- à toute l'administration du CRID, MM. TAPOKO Guy et KONTCHOU Isaïe, Mmes NGUEMENI Carine, YINIKI Falenne, NYANGO Laetitia et à tout le personnel logisticien, MM. TEHNA Felix, TSEYEP Rodrigue, DAOUDA Robert, WIRSIY Charles, et Mme WIRSIY Elisabeth, pour le travail quotidien qu'il abatte pour nous permettre d'avoir un cadre agréable de travail ;
- à tous mes camarades des projets PIIVeC : Mmes SADO Francine, MAFFO Claudine et M. BOUAKA Calmes et mes camarades de laboratoire : Drs TEDJOU Armel, WAMBA Amelie, YOUGANG Aurelie, KOUAMO Mersimine ; Mmes MAE Marylène, DJOUNKWA Lynda, ASSATSE Tatiane, NGONGANG LAMO Sonia, NGANNANG Vanessa, SANDEU Ruth, TCHATCHOUA Nelly, DJONDJI Fleuriane, et MM. NKEMNGO Francis, WILSON-BAHUN Theodel, BINYANG Achille, ASHU Fred, GADJI Mahamat, TAZOKONG Hervé, DJOKO Carlos, TEPA Arnaud et TAGNE Darius, pour leur soutien multiforme ;
- à tous mes camarades de promotion, singulièrement Drs. DJUIDEU Christian, FEUDJIO Bienvenu, MM. NDONGO Ivan, FEUDJIO Riccado, NATCHEMA Brice, et Mmes BANLOCK Agnès, NGOUFACK Tatiana, pour leur franche collaboration ;
- à mes frères Isaac et James, mes grands-parents M. et Mme FOTSO, mes beaux-parents Dr KOUGANG Paule-Marie, Mme KENGNI Thérèse et Dr DZOGANG et Mme, pour leur amour inconditionnel et leur soutien permanent ;
- à ma douce et tendre épouse Mme ASSONG ELOMBAT épouse FOTSO TOGUEM Danielle Cynthia et Mon fils M. FOTSO TOGUEM Luc-Ambroise Covington, dont la présence dans ma vie a été une excellente source d'encouragement et de motivation.

Je ne saurais clore ce chapitre sans dire merci à tous ceux qui, de près ou de loin, ont prié et/ou contribué à l'aboutissement de ce travail et dont les noms n'ont pas été susmentionnés ; qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

SOMMAIRE

ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDÉ I.....	i
DÉDICACE.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xix
SOMMAIRE	xxi
LISTE DES FIGURES.....	xxiv
LISTE DES TABLEAUX	xxvii
LISTE DES ANNEXES	xxix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxx
RÉSUMÉ.....	xxxi
ABSTRACT	xxxiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
I.1. Généralités sur le paludisme : épidémiologie, agents pathogènes et vecteurs.....	7
I.1.1. Situation épidémiologique et conséquences économiques du paludisme.....	7
I.1.2. Agents pathogènes et cycle biologique des plasmodiums.....	8
I.1.3. Vecteurs de paludisme.....	11
I.2. Lutte antivectorielle et gestion intégrée des vecteurs	17
I.2.1. Amélioration de l'environnement de l'habitat.....	17
I.2.2. Méthode de lutte à base d'insecticides	18
I.2.3. Méthodes de lutte biologique	23
I.2.4. Méthodes de lutte génétique	23
I.2.5. Gestion intégrée des vecteurs	24
I.3. Résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides	24
I.3.1. Situation de la résistance aux insecticides au Cameroun.....	26
I.3.2. Mécanismes de résistance aux insecticides	26
I.4. Détection de la résistance métabolique	36
I.4.1. Détection phénotypique	36
I.4.2. Identification des gènes impliqués dans la résistance métabolique.....	36
I.4.3. Utilisation des marqueurs moléculaires.....	37
I.5. Quelques techniques moléculaires permettant d'explorer la diversité génétique chez les anophèles	40

I.5.1. Extraction des acides nucléiques	41
I.5.2. Réactions de polymérisation en chaîne et révélation des produits amplifiés	42
I.5.3. Séquençage de l'ADN	46
CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
II.1. Cadre géographique	48
II.1.1. Description des localités Ngoussou et d'Etoa-Meki	50
II.1.2. Description de la localité Nkolondom.....	50
II.1.3. Description du laboratoire d'accueil	51
II.2. Matériel et méthodes.....	51
II.2.1. Échantillonnage, identification morphologique et élevage des moustiques.....	51
II.2.2. Evaluation du profil de sensibilité des spécimens sauvages d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. aux insecticides	53
II.2.3. Identification des mécanismes et des gènes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes	56
II.2.4. Analyse du polymorphisme des gènes surexprimés et associés à la résistance à la perméthrine chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	63
II.2.5. Développement d'outils diagnostiques à base d'ADN pour les gènes surexprimés et association avec le phénotype de résistance chez <i>Anopheles gambiae</i>	67
II.2.6. Exploitation et analyses des données	70
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
III.1. Résultats	75
III.1.1. Niveau de sensibilité aux insecticides et dynamique saisonnière de la sensibilité à la perméthrine des échantillons sauvages d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	75
III.1.2. Mécanisme et gènes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	79
III.1.3. Niveaux de diversité des gènes surexprimés associés à la résistance aux pyréthrinoïdes chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	84
III.1.4. Validation des outils diagnostiques à base ADN et association avec le phénotype de résistance à la perméthrine chez <i>Anopheles gambiae</i>	102
III.2. Discussion.....	112
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124
ANNEXES.....	152

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
Figure 2 : Cycle biologique de développement des anophèles	13
Figure 3 : Principales caractéristiques morphologiques permettant de différencier les Anophelinae des Culicinae	14
Figure 4 : Évolution de la résistance des espèces d' <i>Anopheles</i> aux pyréthrinoïdes de 1995 à 2006 (a) et de 2015 à 2022 (b)	25
Figure 5 : Représentation schématique de la PCR multiplexe allèle spécifique	43
Figure 6 : Représentation schématique du principe de génotypage et des courbes d'amplification des échantillons d'ADN par la méthode TaqMan	45
Figure 7 : Situation géographique des différents sites de collectes.....	49
Figure 8 : Photographies illustrant la collecte des stades immatures d' <i>Anopheles</i> dans les différents sites de collecte : (a) Ngouso, (b) Etoa-Meki et (c) Nkolondom	53
Figure 9 : Procédure de la méthode des tests en tube de l'OMS.....	54
Figure 10 : Déroulement d'un test d'efficacité des moustiquaires à l'aide des cônes	56
Figure 11 : Exemple de chromatogramme généré par le séquenceur automatique.....	66
Figure 12 : Niveau de sensibilité des spécimens d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i> à la perméthrine en fonction des saisons aux différentes concentrations discriminantes de l'OMS	78
Figure 13 : Photographie des bandes révélées après migration des produits d'amplification du locus S200 X6.1 d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. sur un gel d'agarose 1,5%	80
Figure 14 : Expression des gènes <i>CYP6M2</i> , <i>CYP6P3</i> , <i>CYP6P4</i> , <i>CYP6Z1</i> , <i>CYP6Z2</i> , <i>CYP9K1</i> chez les spécimens d' <i>Anopheles coluzzii</i> de Ngouso (a) et ceux d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s de Nkolondom (b)	82
Figure 15 : Photographie des bandes révélées après migration des produits d'amplification de la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> et de son locus à partir des spécimens de <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	87
Figure 16 : Séquence nucléotidique d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> montrant les motifs constitutifs de la séquence (a) et les sites potentiels de liaison des facteurs de transcription (b) chez <i>Anopheles gambiae</i>	88

Figure 17 : Diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> au sein des échantillons hyper-résistants et hypersensibles d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i>	90
Figure 18 : Diversité génétique des séquences d'un fragment du locus <i>CYP6M2</i> au sein des échantillons d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i> hyper-résistants et hypersensibles	93
Figure 19 : Photographie des bandes révélées suite à la migration des produits d'amplification du gène <i>CYP6P4</i> et de sa région promotrice chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	95
Figure 20 : Séquence nucléotidique d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> montrant les motifs constitutifs de la séquence (a) et les sites potentiels de liaison des facteurs de transcription (b) chez <i>Anopheles gambiae</i>	96
Figure 21 : Diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> sein des échantillons d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i> hyper-résistants et hypersensibles.....	98
Figure 22 : Diversité génétique des séquences d'un fragment du locus du gène <i>CYP6P4</i> au sein des échantillons hyper-résistants et hypersensibles d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i>	101
Figure 23 : Outil de détection de la mutation A/G présente dans la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> chez <i>Anopheles gambiae</i>	103
Figure 24 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN de la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> et le phénotype de résistance aux insecticides	104
Figure 25 : Outil de détection de la mutation A392S du gène <i>CYP6M2</i> chez <i>Anopheles gambiae</i>	105
Figure 26 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN du gène <i>CYP6M2</i> et le phénotype de résistance aux insecticides	105
Figure 27 : Outil de détection de la mutation A/T présente dans un site de fixation du nrf2/MAF de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> chez <i>Anopheles gambiae</i>	106
Figure 28 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> et le phénotype de résistance aux insecticides.....	107
Figure 29 : Outil de détection de la mutation synonyme C/T codon 144 du gène <i>CYP6P4</i> chez <i>Anopheles gambiae</i>	108
Figure 30 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN du gène <i>CYP6P4</i> et le phénotype de résistance aux insecticides.....	109

Figure 31 : Outil de détection de la mutation C168S-CYP6P4 chez <i>Anopheles gambiae</i>	110
Figure 32 : Association entre l’outil diagnostique à base d’ADN du gène <i>CYP6P4</i> (C168S) et le phénotype de résistance aux insecticides.....	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Insecticides recommandés par l'OMS dans l'étude de sensibilité des moustiques, et leur usage pour l'imprégnation des moustiquaires imprégnées ou pour les pulvérisations intra-domiciliaires	19
Tableau II : Principaux mécanismes impliqués dans la résistance des moustiques aux différentes classes d'insecticides utilisées en santé publique	28
Tableau III : Caractéristiques des marqueurs génétiques	39
Tableau IV : Séquence des amorces/sondes utilisées pour le génotypage des mutations de type « knockdown » chez <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	59
Tableau V : Séquences des amorces utilisées pour l'évaluation par RT-qPCR du niveau d'expression des gènes associés à la résistance métabolique chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	62
Tableau VI : Séquences d'amorces, températures d'hybridation et enzymes de restriction utilisées dans la conception des tests diagnostiques révélés par PCR-RFLP	68
Tableau VII : Séquences d'amorces utilisées et les tailles attendues dans la conception des outils diagnostiques révélés par PCR-AS	69
Tableau VIII : Niveau de sensibilité aux insecticides des spécimens sauvages d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. provenant des zones urbaine et péri-urbaine de Yaoundé	75
Tableau IX : Efficacités de deux types de moustiquaires sur les spécimens sauvages d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. provenant des zones urbaines et de celle péri-urbaine	79
Tableau X : Niveau de sensibilité au synergiste PBO des spécimens d' <i>Anopheles coluzzii</i> Ngouso et d' <i>Anopheles gambiae</i> de Nkolondom	81
Tableau XI : Effectifs des génotypes et fréquences alléliques de la mutation kdr-L1014F chez les spécimens sauvages d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i>	84
Tableau XII : Effectifs des génotypes et fréquences alléliques de la mutation kdr-L1014F chez les moustiques de la génération F ₄ issus des différents croisements	85
Tableau XIII : Association entre les génotypes au locus du kdr-L1014F et le phénotype de résistance à la perméthrine 1× des moustiques de la génération F ₄ issus des croisements	86
Tableau XIV : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6M2</i> chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i>	89

Tableau XV : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment du locus du gène <i>CYP6M2</i> chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d' <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	92
Tableau XVI : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d' <i>Anopheles coluzzii</i> et d' <i>Anopheles gambiae</i>	97
Tableau XVII : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment du locus <i>CYP6P4</i> Chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i>	100

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Clairance éthique.....	153
Annexe 2 : Table des codes d'ambiguïté des nucléotides de l'ADN	155
Annexe 3 : Taux de mortalités enregistrées pour les pyréthriinoïdes au cours des quatre saisons à Etoa-Meki (<i>A. coluzzii</i>) et Nkolondom (<i>A. gambiae</i>) en 2019 et 2020.	156
Annexe 4 : Séquence et température d'hybridation des amorces spécifiques des régions promotrices et géniques de <i>CYP6M2</i> et <i>CYP6P4</i>	157
Annexe 5 : Photographie de l'alignement des séquences d'une portion du locus du gène <i>CYP6M2</i> couvrant la mutation A392S au sein des échantillons d' <i>A. gambiae</i>	158
Annexe 6 : Réseau d'haplotypes de la mutation A392S-CYP6M2 par allèle dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i>	159
Annexe 7 : Réseau d'haplotypes de la mutation A/T, position 273 de la région promotrice du gène <i>CYP6P4</i> par allèle dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i>	160
Annexe 8 : Photographie de l'alignement des séquences d'une portion du locus du gène <i>CYP6P4</i> couvrant la mutation C168S au sein des échantillons d' <i>A. gambiae</i>	161
Annexe 9 : Réseau d'haplotypes de la mutation C168S-CYP6P4 par allèle dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i>	162
Annexe 10 : Listes des présentations orales présentées à différentes conférences.....	163
Annexe 11 : Listes des posters présentées à différentes conférences	164
Annexe 12 : Articles publiés en relation avec la thèse	167

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

AhR : « Aryl hydrocarbon receptor »

Arnt : « Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator »

ARN : Acide ribonucléique

CRID : « Centre for Research in Infectious Diseases »

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DC : Dose discriminante

FC : Facteur de transcription ou « Fold-change » en anglais

GABA : Acide Gamma-aminobutyrique

G₀ : Generation G₀

kdr : « knockdown resistance »

Keap-1 : « Kelch-like ECH-associated protein 1 »

Maf : « Muscle Aponeurosis Fibromatosis protein »

MII : Moustiquaire imprégnée d'insecticides

Nrf-2 : « Nuclear factor erythroid-2 related factor-2 »

PBO : Pypéronyl butoxide

PID : Pulvérisation intra domiciliaire

PIIVeC : « Partnership for Increasing the Impact of Vector Control »

RT – qPCR : « Real-Time Quantitative PCR » (en français PCR quantitative en temps réel)

SINE : « Short INterspersed Elements »

RÉSUMÉ

Le développement rapide du phénomène de résistance aux insecticides chez les vecteurs de paludisme est un obstacle pour le maintien de l'efficacité des outils de lutte. Toutefois, malgré une association récurrente entre les cytochromes P450 et la résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique, les mutations et/ou les variations génétiques sous-jacentes capables de moduler l'expression de cette famille de gènes chez *Anopheles gambiae* s.l. restent peu documentées. C'est pour combler ce vide que des marqueurs moléculaires susceptibles de permettre l'identification rapide de la résistance métabolique chez *A. gambiae* et *A. coluzzii* de Yaoundé-Cameroun ont été identifiés ; ceci en vue de mettre sur pied un outil de diagnostic simple pour surveiller et détecter précocement ce type de résistance sur le terrain. Pour ce faire, les moustiques adultes du genre *Anopheles*, ont été collectés de décembre 2018 à décembre 2020 dans deux aires de la ville de Yaoundé (urbaine et périurbaine). Après avoir évalué leur niveau de résistance aux insecticides, les différents mécanismes de résistance impliqués ont été recherchés par des techniques moléculaires. Les moustiques survivants à une exposition à la perméthrine ont par la suite été croisés avec une souche de laboratoire sensible, et les individus de la quatrième génération obtenus ont été groupés en moustiques hyper-résistants (R_{90}) et hyper-sensibles (S_{20}). Par la suite, deux des gènes les plus surexprimés ainsi que leurs régions promotrices ont été amplifiés puis séquencés pour l'analyse du polymorphisme. Les résultats des bio-essais ont révélé une résistance confirmée à presque tous les insecticides testés indépendamment de la saison de collecte, avec une restauration partielle de la sensibilité après une préexposition au synergiste Piperonyl butoxide (PBO), suggérant une implication des enzymes métaboliques. Cette hypothèse a été confirmée par les résultats de la PCR quantitative (RT-qPCR), qui ont révélé un niveau de surexpression des gènes qui variait significativement en fonction de l'espèce, mais aussi d'une saison à une autre, avec toutefois une surexpression des gènes *CYP6M2* ($FC = 4,39 \pm 0,49$ pour *A. coluzzii* ; $FC = 9,69 \pm 2,58$ pour *A. gambiae*) et *CYP6P4* ($FC = 4,39 \pm 0,49$ pour *A. coluzzii* ; $FC = 18,77 \pm 7,49$ pour *A. gambiae*). Par la suite, les résultats du polymorphisme ont révélé une faible diversité pour la région promotrice du gène *CYP6M2* chez les moustiques R_{90} et les S_{20} (Hd global = 0,49, $\pi = 0,018$), alors que dans sa région génique, des variations alléliques ont été détectées mais sans signe de sélection d'un haplotype. Pour le gène *CYP6P4*, une diversité plus faible a été observée chez les moustiques R_{90} ($Hd = 0,48$) comparée aux S_{20} ($Hd = 0,86$), avec une mutation candidate A/T en position 273 située dans un site de fixation du nrf2/MAF chez *A. gambiae*, suggérant une sélection en cours. Cette mutation a été retrouvée à une fréquence de 100% chez les R_{90} , 44% dans le S_{20} . Une mutation synonyme dans le codon 168 (TGC → AGC) a également été trouvée dans le locus du gène *CYP6P4* avec une fréquence de 70% dans le R_{90} , 28% dans le S_{20} . Par ailleurs, aucune association

significative n'a été observée entre l'une ou l'autre des allèles identifiés dans cette étude et le phénotype de la résistance aux pyréthroïdes. Ce travail fournit deux marqueurs moléculaires intéressants pour le gène *CYP6P4* chez *A. gambiae* qui devraient être pris en compte dans la surveillance moléculaire annuelle de la résistance, et dans toute étude sur les marqueurs de la résistance métabolique. Des travaux supplémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer leur impact sur les différents outils de lutte antivectorielle utilisée sur le terrain.

Mots clés : *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, résistance métabolique, polymorphisme génétique, marqueurs de résistance, *CYP6M2*, *CYP6P4*.

ABSTRACT

The rapid spay of insecticide resistance among malaria vectors is an obstacle to maintaining the effectiveness of control tools. However, despite a recurrent association between cytochrome P450s and pyrethroid resistance in Africa, the underlying mutations and/or genetic variations capable of modulating the expression of this gene family in *Anopheles gambiae* s.l. remain poorly documented. To fill this gap, molecular markers that can be used to rapidly identify metabolic resistance have been identified in *A. gambiae* and *A.s coluzzii* from Yaoundé, Cameroon, in order to develop a simple diagnostic tool for monitoring and early detection of this type of resistance in the field. To do this, adult mosquitoes of the *Anopheles* genus were collected from December 2018 to December 2020 in two areas of the city of Yaoundé (urban and peri-urban). After evaluating their level of resistance to insecticides, the different mechanisms of resistance involved were investigated using molecular techniques. The mosquitoes that survived exposure to permethrin were subsequently crossed with a sensitive laboratory strain, and the individuals of the fourth generation obtained were grouped into hyper-resistant (R90) and hyper-sensitive (S20) mosquitoes. Subsequently, two of the most overexpressed genes along with their promoter regions were amplified and then sequenced for polymorphism analysis. The results of the bioassays revealed confirmed resistance to almost all the tested insecticides regardless of the collection season, with a partial restoration of sensitivity after pre-exposure to the synergist piperonyl butoxide (PBO), suggesting the involvement of metabolic enzymes. This hypothesis was confirmed by the results of quantitative PCR (RT-qPCR), which revealed a level of gene overexpression that varied significantly depending on the species, but also from one season to another, with overexpression of the *CYP6M2* gene (FC = 4.39 ± 0.49 for *A. coluzzii*; FC = 9.69 ± 2.58 for *A. gambiae*) and *CYP6P4* (FC = 4.39 ± 0.49 for *A. coluzzii*; FC = 18.77 ± 7.49 for *A. gambiae*). Subsequently, the polymorphism results revealed low diversity for the promoter region of the *CYP6M2* gene in R₉₀ and S₂₀ mosquitoes (global Hd = 0.49, π = 0.018), while in its gene region, allelic variations were detected but without any sign of haplotype selection. For the *CYP6P4* gene, lower diversity was observed in R₉₀ mosquitoes (Hd = 0.48) compared to S₂₀ (Hd = 0.86), with a candidate A/T mutation at position 273 located in nrf2/MAF binding site in *A. gambiae*, suggesting ongoing selection. This mutation was found at a frequency of 100 % in R₉₀, 44 % in S₂₀. A synonymous mutation in codon 168 (TGC- \rightarrow AGC) was also found in the locus of the *CYP6P4* gene with a frequency of 70 % in R₉₀ and 28 % in S₂₀. Moreover, no significant association was observed between any of the alleles identified in this study and the pyrethroid resistance phenotype. This work provides two interesting molecular markers for the *CYP6P4* gene in *An. gambiae* that should be considered in the annual molecular surveillance of resistance and in any study

on markers of metabolic resistance. However, further work is needed to determine their impact on the various vector control tools used in the field.

Keywords: *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, metabolic resistance, genetic polymorphism, resistance based-markers, *CYP6M2*, *CYP6P4*.

INTRODUCTION

Dans les zones tropicales et particulièrement en Afrique subsaharienne, le paludisme demeure un problème de santé publique majeur en termes de morbidité et de mortalité, singulièrement chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (INS/ICF, 2020 ;WHO, 2023a). En 2022, en Afrique subsaharienne par exemple, près de 608 000 cas de décès dus au paludisme ont été enregistrés dans les populations humaines, ce qui représente 95,4 % du nombre de décès du fardeau mondial (WHO, 2023a). Cette pathologie est causée par un protozoaire du genre *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885, dont l'espèce *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 est la plus répandue en zone sub-saharienne suivie de *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890 (WHO, 2022a). La transmission parasitaire d'une personne infectée à une autre se fait par une piqûre d'une femelle de moustique vecteur appartenant au genre *Anopheles* Meigen, 1868 (Twohig *et al.*, 2019). La lutte contre cette parasitose repose sur trois grands piliers à savoir : l'utilisation de médicaments antipaludiques pour le traitement et la prévention de la maladie, l'interruption de la transmission en contrôlant les moustiques vecteurs (WHO, 2015), et plus récemment l'utilisation du vaccin antipaludique (RTS, S/AS01) chez l'enfant dans les zones de niveau de transmission modérée à forte du paludisme à *P. falciparum* (WHO, 2021).

Le contrôle des vecteurs, couramment appelé lutte antivectorielle, repose principalement sur les interventions à base d'insecticides à savoir : les pulvérisations intradomiciliaires (PID) et les moustiquaires imprégnées d'insecticides en abrégé MII (OMS, 2017). Entre les années 2000 et 2015, ces outils, composants essentiels des programmes de lutte contre le paludisme en Afrique, ont permis d'éviter plus de 663 millions de cas cliniques, soit une réduction de près de 78% de l'incidence et de la mortalité dues au paludisme, c'est-à-dire 68% pour les MII et 10% pour les PID (Bhatt *et al.*, 2015). Malheureusement, l'utilisation continue des mêmes insecticides dans le secteur agricole combinée à une utilisation parfois incontrôlée des moustiquaires imprégnées à base de pyréthrinoïdes (WHO, 2022a) ont eu pour effet une immense pression de sélection sur les populations d'insectes vecteurs, avec pour corollaire une émergence de souches résistantes de vecteurs dans les zones endémiques (Hemingway, 2014; Ranson & Lissenden, 2016; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Au Cameroun, une augmentation progressive des profils de résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902, seule classe d'insecticides recommandée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires, a été rapportée depuis les années 2000 tant pour les pyréthrinoïdes de type I (perméthrine) que ceux de type II (deltaméthrine) (Etang *et al.*, 2003; Nwane *et al.*, 2009; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017; Bamou *et al.*, 2019). La généralisation de plus en plus observée de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes a conduit l'OMS à

élaborer, en 2012, un plan mondial de gestion de la résistance aux insecticides (WHO, 2012a). Dans ce plan, la compréhension des mécanismes par lesquels les moustiques deviennent résistants aux insecticides constitue un prérequis crucial pour le développement à terme d'une bonne stratégie d'utilisation des insecticides en santé publique.

Le développement de la résistance aux insecticides est un processus complexe qui dépend directement de facteurs génétiques, physiologiques et éthécologiques (Zhu *et al.*, 2016). Chez les moustiques du genre *Anopheles* Meigen, 1818, la résistance leur est principalement conférée par deux grands mécanismes : la modification du site cible et les mécanismes métaboliques (Hemingway & Ranson, 2000). La résistance par la modification du site cible se produit lorsque le site d'action d'un insecticide (généralement dans le système nerveux) subit une mutation génétique au niveau du canal sodique de l'acétylcholinestérase et/ou des récepteurs GABA (Hemingway *et al.*, 2004). Cela a été démontré chez le vecteur du paludisme *A. gambiae* où la résistance aux pyréthrinoïdes est due à des mutations ponctuelles dans le canal sodium voltage-dépendant, plus connues sous le nom de mutations kdr (« knock-down »). Ces mutations ont servi, il y a plus de 20 ans, à la conception des tous premiers outils diagnostiques à base d'ADN (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000), qui ont permis par la suite une détection rapide de ce type de résistance dans les populations sauvages (Etang *et al.*, 2006 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Fadel *et al.*, 2019 ; Talom *et al.*, 2020). La résistance métabolique implique une augmentation de la production d'enzymes de détoxification, ou des formes plus efficaces, capables de dégrader l'insecticide avant qu'il n'atteigne sa cible (Hemingway *et al.*, 2004), la famille des cytochromes P450 étant considérée comme la plus importante dans la détoxification des insecticides.

Cependant, du fait de la difficulté de sa détection qui repose sur des essais biologiques laborieux (utilisation des synergistes), des méthodes biochimiques non spécifiques (essais métaboliques), et des approches transcriptomiques sophistiquées et coûteuses (puces à ARN, séquençage de l'ARN) (Mavridis *et al.*, 2019), cette résistance métabolique constitue un risque élevé pour les interventions de lutte contre le paludisme (WHO, 2012a). Elle peut toutefois être inversée par l'utilisation de synergistes tels que le butoxyde de pipéronyle (PBO), qui inhibe l'activité des P450. En effet, des essais à grande échelle sur le terrain, réalisés par Protopopoff *et al.* (2018) et Staedke *et al.* (2020), ont montré que les moustiquaires incorporant ce synergiste sont efficaces contre la résistance médiée par les cytochromes P450. Les membres de la famille des cytochromes P450 ont toujours été associés à la résistance aux insecticides chez *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson 2013, *A. gambiae* et *Anopheles arabiensis* Patton, 1905, à l'instar des gènes *CYP6P3* (Muller *et al.*, 2008) et du *CYP6M2* (Stevenson *et al.*, 2011) [considérés

comme les principales enzymes métabolisant les pyréthriinoïdes chez *A. gambiae* (Adolfi *et al.*, 2019)], le *CYP6Z1* (Chiu *et al.*, 2008), le *CYP6P4* (Ibrahim *et al.*, 2016b) et le *CYP9K1* (Vontas *et al.*, 2018). De même, des études menées par « *Anopheles gambiae* Genomes Consortium » (Ag1000g) ont identifié de forts balayages sélectifs au sein des P450 (Ag1000g, 2017).

Un marqueur génétique est, selon De Meeûs (2012), une portion de l'ADN de l'organisme étudié, ou un sous-produit codé par cet ADN (comme une protéine) permettant de détecter et de suivre l'évolution d'un caractère (par exemple, la résistance aux insecticides) au sein d'une population donnée. Chez l'espèce *A. gambiae* s.l., de tels outils ne sont que progressivement développés, avec très récemment le cas d'un haplotype triple mutant dont l'un du gène *CYP6P4* en Afrique de l'Est (Njoroge *et al.*, 2022). La difficulté actuelle à suivre et/ou à anticiper la résistance métabolique chez ce principal vecteur du paludisme, contrairement à la résistance au site cible telle que la résistance « knockdown » (kdr), représente un obstacle majeur à la conception de stratégies durables de gestion de la résistance. Cependant, l'investigation des bases moléculaires de cette résistance métabolique et la détection des marqueurs moléculaires associés s'avèrent difficiles. Ceci est dû à plusieurs facteurs : la présence de multiples mécanismes de résistance chez ce vecteur, la taille, la redondance génétique des familles de gènes impliquées dans le processus de détoxification et la multitude de mécanismes par lesquels les activités enzymatiques sont stimulées (Liu, 2015).

Ainsi, la pertinence de cette thèse est de mieux comprendre l'adaptation génétique et physiologique des moustiques face à une pression de sélection (ici l'insecticide) en combinant les approches de séquençage direct et de croisement génétique réciproque dans le but d'évaluer le rôle joué par ces gènes pris individuellement et les changements capables d'influencer leur expression chez *A. coluzzii* et *A. gambiae*. Au Cameroun, des analyses transcriptomiques ont permis d'associer certains cytochromes P450 à la résistance à au moins deux classe d'insecticides dans les populations d'*A. gambiae* s.l. (Tene-Fossog *et al.*, 2013; Bamou *et al.*, 2019; Piameu *et al.*, 2021a). De plus, l'implication des P450 dans la résistance des moustiques aux insecticides a également été associée à la perte d'efficacité des moustiquaires (Menze *et al.*, 2018; 2020), principalement grâce à la détection de marqueurs génétiques spécifiques chez l'espèce *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Mugenzi *et al.*, 2019; Weedall *et al.*, 2019). La question de recherche qui se dégage est la suivante : Existe-t-il, chez *A. gambiae* s.l., des marqueurs à base d'ADN associés à ces gènes surexprimés et susceptibles d'être utilisés pour surveiller cette résistance ?

Cette question nous a conduit à émettre des hypothèses de recherche qui se décline ainsi que suit : i) la saisonnalité a un impact sur le profil de sensibilité aux pyréthriinoïdes des

moustiques sauvages car les variations des conditions environnementales influencent pression de sélection au niveau de gîtes de reproduction ; ii) la saisonnalité influence l'expression des gènes associés à la résistance aux pyréthrinoïdes des moustiques sauvages en raison d'une adaptation de ces derniers aux changements environnementaux influençant par exemple la concentration en xénobiotique au niveau de gîtes de reproduction ; iii) le polymorphisme des gènes associés au phénotype de résistance chez *A. gambiae* s.l. est peu connue au Cameroun, compte tenu du nombre d'étude limitée dans ce sens ; iv) des variations alléliques dans le locus de ces gènes surexprimés ainsi que leurs régions promotrices, comme celle précédemment décrits dans les gènes dupliqués *CYP6P9a/b* chez *A. funestus* s.s. ; confèrent la résistance aux insecticides chez les moustiques.

Pour vérifier ces hypothèses, l'objectif général cette étude était d'élucider les bases moléculaires de la résistance métabolique aux insecticides chez *A. gambiae* s.l. au Cameroun et contribuer à l'identification de ce type de résistance en vue de mettre sur pied un outil de diagnostic simple qui permettra le suivi et la détection précoce de cette résistance sur le terrain. Plus spécifiquement, notre étude consiste à :

- établir le profil de sensibilité aux insecticides des échantillons sauvages d'*A. gambiae* s.l., collectés dans la ville de Yaoundé ;
- identifier les mécanismes et les gènes impliqués dans la résistance observée aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* ;
- analyser le polymorphisme des gènes sur-exprimés associés à la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* et détecter de potentiels allèles de résistance ;
- concevoir des outils diagnostiques à base d'ADN et évaluer leur association avec le phénotype de résistance aux insecticides chez *A. gambiae*.

Outre l'introduction, la conclusion, les recommandations et les perspectives, ce document est subdivisé en trois chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur : les généralités sur le paludisme, la résistance des vecteurs aux insecticides et son impact dans la lutte contre le paludisme, et l'utilisation des marqueurs moléculaires dans le cadre de la gestion de la résistance des moustiques aux insecticides. Dans le deuxième chapitre, après une présentation du cadre géographique d'étude, nous décrivons les protocoles et/ou les méthodes utilisées dans ce travail. Le troisième chapitre présente les résultats et leur discussion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. Généralités sur le paludisme : épidémiologie, agents pathogènes et vecteurs

I.1.1. Situation épidémiologique et conséquences économiques du paludisme

Le paludisme reste la maladie à transmission vectorielle la plus répandue dans le monde ; il constitue un problème de santé publique majeur en termes de morbidité et de mortalité dans 84 pays endémiques. Ainsi, la morbidité liée au paludisme, dans ces pays, est passée de 245 millions en 2020 à 249 millions de 2022 (WHO, 2023a). La mortalité a légèrement diminué passant de 625 000 à 608 000 (WHO, 2023a). Il est cependant important de noter qu'entre les années 2000 et 2015, une réduction de la mortalité a été observée, passant respectivement de 897 000 à 577 000 (WHO, 2019a). Ce succès a été attribué à l'amélioration des méthodes diagnostiques, thérapeutiques et principalement à la généralisation de la lutte antivectorielle dans les zones à forte pression parasitaire (Bhatt *et al.*, 2015). Cependant, entre les années 2015 et 2021, une augmentation du nombre de cas de paludisme a été enregistrée, passant de 230 millions à 247 millions, avec deux pics en 2017 (237) et en 2021 (247 millions) (WHO, 2022a). Près de 70 % des cas et décès liés à cette pathologie furent attribués à un petit groupe de pays africains à forte charge parasitaire ; il s'agit du Nigeria, de la République démocratique du Congo, de l'Ouganda, du Mozambique, de l'Angola, du Burkina Faso, du Niger, de la République de Tanzanie, du Mali, de la Côte d'Ivoire, du Cameroun et du Ghana (WHO, 2019a). Ces forts taux de mortalité observés en Afrique subsaharienne indiquent à suffisance que le paludisme est un fléau pour les populations africaines en général et camerounaises en particulier. Au Cameroun, le paludisme est endémique et représente une des causes majeures de morbidité, avec des taux de morbidité et/ou mortalité variant entre 2,3 % et 2,7 % du total mondial (WHO, 2022a). De 2011 à 2017, la morbidité proportionnelle hospitalière due au paludisme est passée de 30,7 % à 24,3 %, soit une baisse relative de 6,4 %. Durant cette même période, le nombre de cas de paludisme enregistrés dans les formations sanitaires du pays a évolué de 1 829 266 à 2 093 009, soit une augmentation de 14,41 %, tandis que le nombre de consultations pour cette cause passait de 5 957 438 à 8 622 922, soit une hausse de 44,74 % (PNLP, 2018). Dans les populations affectées, la prévalence parasitaire chez les enfants âgés de 6 à 59 mois est estimée à 30 % pour l'ensemble du pays (INS/ICF, 2020). Toutefois, des disparités régionales sont importantes. Ainsi, l'on note des prévalences :

- dans la zone forestière du pays comme la région du Centre de 52,4 %, à l'Est de 48,2 %, au Sud-Ouest de 46,1 %, au Sud de 43,1 % ;
- dans la zone soudano-sahélienne à l'instar de l'Adamaoua de 47,4 % et du Nord de 34,3 %. Les statistiques relatives aux prévalences parasitaires du paludisme révèlent clairement que l'intensité de la transmission de cette pathologie dans

les populations hôtes étudiées varie suivant les faciès éco-épidémiologiques (PNLP, 2018).

Selon Gallup & Sachs (2001), les conséquences du paludisme vont au-delà des mesures de mortalité et de morbidité. Les économistes pensent que le paludisme serait responsable d'une pénalité de croissance microéconomique, allant jusqu'à 1,3 % du produit intérieur brut annuel de certains pays africains. Ceci prend en compte les coûts des soins et ceux d'invalidités temporaires ou définitives (Carter *et al.*, 2005), la baisse de productivité due aux lésions causées par le paludisme cérébral, ainsi que la réduction du tourisme. Il est à noter que sur un ensemble de pays bénéficiaires de l'aide extérieure pour la santé, 46 % du total des fonds extérieurs et 20 % du total des fonds publics intérieurs pour la santé ont été consacrés à la lutte contre le VIH/sida, le paludisme et la tuberculose (OMS, 2021). Ainsi en 2018, 2,7 milliards de dollars ont été investis dans la lutte contre le paludisme (WHO, 2019a). Même si l'idée d'éradication complète du paludisme semble ne plus être réalisable à court terme (Ferguson *et al.*, 2010), elle reste un objectif à long terme pour les chercheurs qui, de nos jours, travaillent pour un meilleur contrôle de cette maladie. Pour y faire face, de nombreuses stratégies mondiales de lutte ont été mises en place. La dernière stratégie de lutte contre le paludisme a été élaborée en 2015 et couvre la période 2016-2030 (WHO, 2015). Elle fait intervenir différents partenaires en charge des questions sanitaires tels que : l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les gouvernements des pays endémiques, les instituts de recherche, les professionnels de santé, ou les bailleurs de fonds. Les objectifs actuels de lutte contre le paludisme consistent : (i) à réduire de 90 % d'ici 2030, le nombre de cas et la mortalité liés à cette maladie, (ii) à éliminer le paludisme au minimum dans 35 pays sur les 84 endémiques et à empêcher la réémergence de la maladie dans les pays où elle a été éliminée (WHO, 2015). La stratégie d'éradication du paludisme repose essentiellement sur la lutte contre les anophèles et une prise en charge des patients associant un diagnostic fiable suivi de traitements médicamenteux efficaces visant à tuer les plasmodies (WHO, 2022a).

I.1.2. Agents pathogènes et cycle biologique des plasmodiums

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire qui ne peut survivre en dehors de son hôte. Selon Wéry (1995), il appartient à l'embranchement des Apicomplexa, à la classe des Haemosporidea, à la sous-classe des Haemotozoae, à l'ordre des Haemosporida, à la famille des Plasmodiidae et au genre *Plasmodium* Marchiafava & Celi, 1895. Plus de 200 espèces du genre *Plasmodium* sont reconnues (Perkins & Austin, 2009) ; parmi elles, seules 6 sont responsables du paludisme chez l'homme. Il s'agit de *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 ;

Plasmodium malariae Laveran, 1881 ; *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 ; *Plasmodium vivax* Grassi et Felletti, 1890, *Plasmodium knowlesi* Sinton et Mulligan, 1932 et *Plasmodium cynomolgi* (Gething *et al.*, 2016 ; Kojom Foko *et al.*, 2023). Récemment, *Plasmodium ovale* a été séparé en deux sous-espèces différentes connues sous les noms de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* (Sutherland *et al.*, 2010). Au Cameroun, *Plasmodium falciparum* a été à l'origine de 95 % de cas du paludisme et/ou de décès dus à cette pathologie ; la fraction restante étant attribuée aux autres espèces à savoir : *P. malariae* (1 %), *P. ovale* (3 %) et *P. vivax* (\approx 1 %) (PNLP, 2018 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019).

Les Apicomplexa sont des eucaryotes unicellulaires, intracellulaires obligatoires. Ils se développent et se répliquent dans une cellule hôte à l'intérieur d'une vacuole parasitophore (Morrisette & Sibley, 2002). Cette vacuole est formée lors de l'invasion parasitaire de la cellule hôte grâce à l'intervention du complexe apical composé d'anneaux polaires, de rhoptries, de micronèmes, de granules denses, ainsi que des organites sécréteurs spécialisés. Ces organites contiennent les éléments nécessaires à la motilité du parasite à la surface de la membrane plasmique de la cellule hôte et à son invasion par invagination de cette dernière pour former la vacuole parasitophore contenant le parasite (Morrisette & Sibley, 2002). Les Apicomplexa sont également caractérisés par la présence d'un apicoplaste ; celui-ci est apparenté au chloroplaste présent chez les végétaux, et résulterait d'une endosymbiose secondaire entre une algue et un procaryote (cyanobactérie). L'apicoplaste participe à la biosynthèse des lipides et de l'hème (Ralph *et al.*, 2004), essentiels à la réplication du parasite (Van Dooren *et al.*, 2012).

Le cycle de développement des Plasmodiums est hétéroxène ; il comprend un hôte intermédiaire, l'homme, chez qui se déroule la multiplication asexuée appelée schizogonie, et un hôte définitif, le moustique femelle du genre *Anopheles*, siège de la multiplication sexuée appelée gamogonie (figure 1). Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle aspire les gamétocytes mâles et femelles matures présents dans le sang de l'Homme. Ces gamétocytes fusionnent pour former un zygote mobile dans le repas sanguin ; ce zygote qui pénètre dans l'intestin moyen du moustique pour y former un oocyste au niveau de la paroi externe de cet organe (environ 4 à 5 jours après le repas sanguin). Dans chaque oocyste, plusieurs milliers de parasites au stade sporozoïte se développent. Ces sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe du moustique puis migrent vers les glandes salivaires, et seront injectés dans l'hôte vertébré lors de la prochaine prise de sang (Hillyer *et al.*, 2007). Le temps nécessaire aux parasites pour passer des gamètes aux sporozoïtes (stade infectant) varie en fonction de la température du milieu, de l'espèce de *Plasmodium* et/ou de certaines interactions parasite-moustique. Cette

période d'incubation extrinsèque varie de 9 à 10 jours pour *P. falciparum*, de 12 à 14 jours pour *P. ovale* et de 14 à 16 jours pour *P. malariae* quand la température quotidienne est de 27 °C (Ohm *et al.*, 2018).

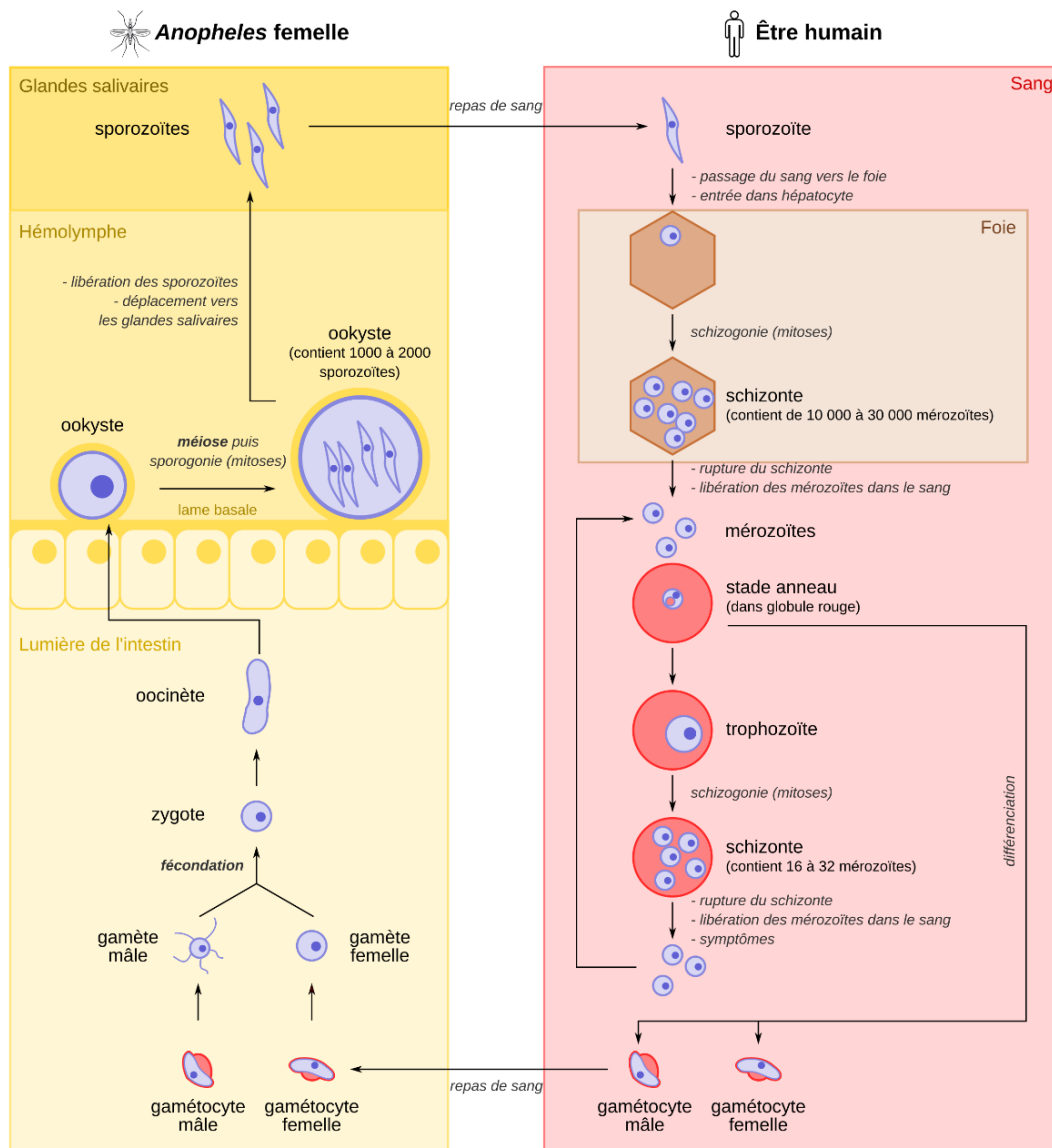


Figure 1 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* selon Combemorel (2019)

Une fois à l'intérieur de l'hôte vertébré (l'homme), le parasite suit plusieurs phases de développement en commençant par une schizogonie exo-érythrocytaire à l'intérieur des cellules hépatiques (Carnevale *et al.*, 1984). Pendant la phase exo-érythrocytaire, les mérozoïtes sont produits et libérés des schizontes dans la circulation sanguine entre cinq et huit jours. Ces mérozoïtes pénètrent ensuite dans les globules rouges et subissent un développement pour former des trophozoïtes, puis des schizontes dans un processus cyclique appelé schizogonie érythrocytaire (Cox, 2010). Toutes les espèces de *Plasmodium* n'ont pas le même cycle de vie, mais pendant les stades exo-érythrocytaires, certains parasites tels que *P. vivax* et *P. ovale*

passent par un stade dormant appelé hypnozoïte qui peut persister dans le foie pendant des années avant de réapparaître et provoquer la maladie (White, 2011).

I.1.3. Vecteurs de paludisme

Seuls les anophèles femelles transmettent les plasmodies chez les mammifères. Cosmopolite, le genre *Anopheles* regroupe de 483 espèces formellement reconnues (Harbach, 2013), avec seulement 40 à 60 espèces vectrices du paludisme dans des conditions naturelles (Harbach, 2016). Même au sein d'une population de moustiques anophèles, la capacité vectorielle des individus est très variable (Neafsey *et al.*, 2013).

I.1.3.1. Position systématique et taxinomie

La position systématique des moustiques du genre *Anopheles* (Harbach, 2013) dans le règne animal est la suivante :

Embranchement des Arthropodes

- corps à symétrie bilatérale et pourvu d'une cuticule chitineuse (exosquelette) ;
- présence d'appendices articulés ;

Sous-embranchement des Hexapodes

- corps divisé en 3 tagmes (tête-thorax-abdomen) ;
- présence de 3 paires de pattes thoraciques ;

Classe des Insectes

- respiration trachéenne ;
- présence de trois paires d'appendices locomoteurs ;
- appareils buccaux de types ectognathes ;

Sous-classe des Pterygota

- présence de deux paires d'ailes ;

Ordre des Diptera

- présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers ;
- tarsi pentamères ;

Sous-ordre des Nématocères

- antennes longues et multiarticulées ;
- pronotum séparée du mésonotum par une suture transverse ;

Famille des Culicidae Meigen, 1818

- appareil buccal constitué d'une trompe allongée ;
- présence d'écailles sur les nervures alaires ;

Sous-famille des Anophelinae Grassi, 1900

- trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête ;
- scutellum régulièrement courbé au bord postérieur ;

Genre *Anopheles* Meigen, 1818

- taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa.

Bien que les moustiques anophèles soient le plus souvent présents dans les régions tropicales ou subtropicales, on les trouve également dans les climats tempérés (Sinka *et al.*, 2010; Coetzee, 2020). Les principaux vecteurs du paludisme appartiennent aux complexes *Anopheles gambiae* et *Anopheles nili* (Theobald, 1904), au groupe *Anopheles funestus*, et à *Anopheles moucheti* Evans, 1925.

I.1.3.2. Cycle de développement des vecteurs de paludisme

Les anophèles sont des insectes dont le cycle de vie comporte une métamorphose complète ; ce sont des holométaboles. Les larves ont une morphologie et un mode de vie très différents de ceux des adultes ; les stades pré-imaginaux (œuf, larve et nymphe) sont aquatiques alors que les adultes sont aériens (figure 2). Les femelles adultes pondent environ 50 à 200 œufs dans les plans d'eau, qui éclosent en 2 à 3 jours pour donner des larves de premier stade (Service, 2012). Celles-ci subissent 4 mues en passant par 4 stades larvaires au cours desquels les larves se nourrissent de débris et de micro-organismes (Service, 2012). Bien qu'étant des stades aquatiques, les larves et les nymphes ont une respiration aérienne. Le développement des moustiques de la larve L1 à l'adulte, et la maturation de l'adulte dépendent de la température et varient selon les espèces (Christiansen-Jucht *et al.*, 2015). En moyenne, le développement larvaire d'*A. gambiae* s.l. dure 12,35 et 10,92 jours respectivement à 23 °C et 31 °C (Christiansen-Jucht *et al.*, 2015) ; les larves se transforment en nymphes (pendant 2 à 3 jours) avant d'émerger comme adultes (Service, 2012). Les adultes des deux sexes se nourrissent initialement du nectar de plantes après leur émergence à la surface du plan d'eau (Service, 2012) ; ensuite, les femelles se nourrissent du sang de l'individu hôte. Les mâles et les femelles s'accouplent dans les deux jours suivant leur émergence (Charlwood *et al.*, 2003) ; ce qui déclenche le début du cycle gonotrophique chez les femelles.

Le cycle gonotrophique (figure 2) commence par l'alimentation sanguine, suivi du développement des œufs, et se termine par la ponte des œufs dans des habitats aquatiques (Gillies, 1953 ; Robert & Carnevale, 1984). La durée de ce cycle peut atteindre cinq jours pour les femelles nullipares (n'ayant pas encore effectué une ponte) contre deux à trois jours pour les femelles pares (c'est-à-dire ayant effectué au moins une ponte). Deux à trois jours après la

prise du repas de sang, l'anophèle femelle pond des œufs sur l'eau. Chez les vecteurs africains du paludisme, on pense que cette période de ponte se répète tous les 2 à 4 jours (Gillies, 1953).

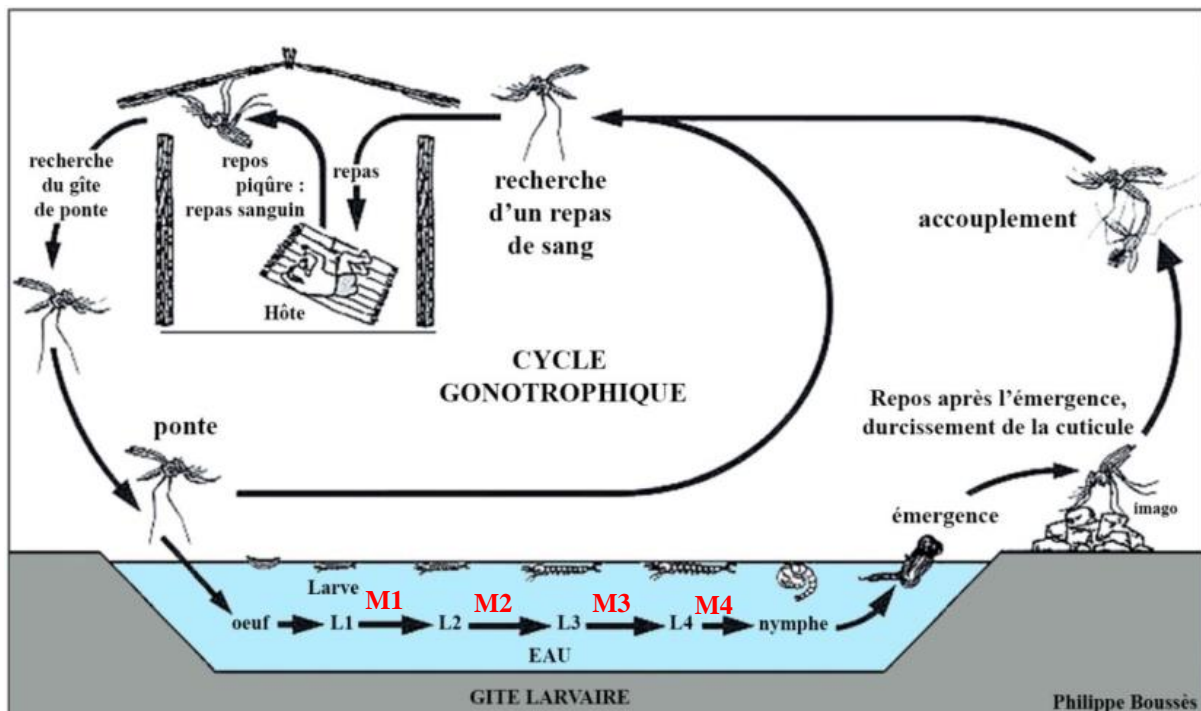


Figure 2 : Cycle biologique de développement des anophèles (Carnevale & Robert, 2009)

Certains critères permettent de faire une distinction rapide entre les sous membres de la famille des Culicidae (figure 3) aux stades larvaires et chez l'adulte (Foote & Cook, 1959; Danis & Mouchet, 1991). Ainsi :

- les œufs d'Anophelinae possèdent des flotteurs latéraux et sont pondus isolement contrairement à ceux des Culicinae qui sont en radeaux ;
- les larves d'Anophelinae ont une position parallèle à la surface de l'eau et respirent grâce à des spiracles dorsaux ; elles ne possèdent pas de siphon respiratoire, tandis que les Culicinae ont une position oblique et respirent à l'aide d'un siphon respiratoire plus ou moins long et trapu ;
- les palpes maxillaires présentent une extrémité renflée en massue chez les Anophelinae mâles et effilée chez les Culicinae. Chez les anophèles femelles, ces palpes sont aussi longs que le proboscis mais chez les culicinés elles sont plus courtes ;
- au repos, les Anophelinae adultes ont une position oblique par rapport au support contre une position parallèle pour les Culicinae. Les ailes des anophèles présentent des zones claires dont les dispositions et les amplitudes sont caractéristiques de différentes espèces.

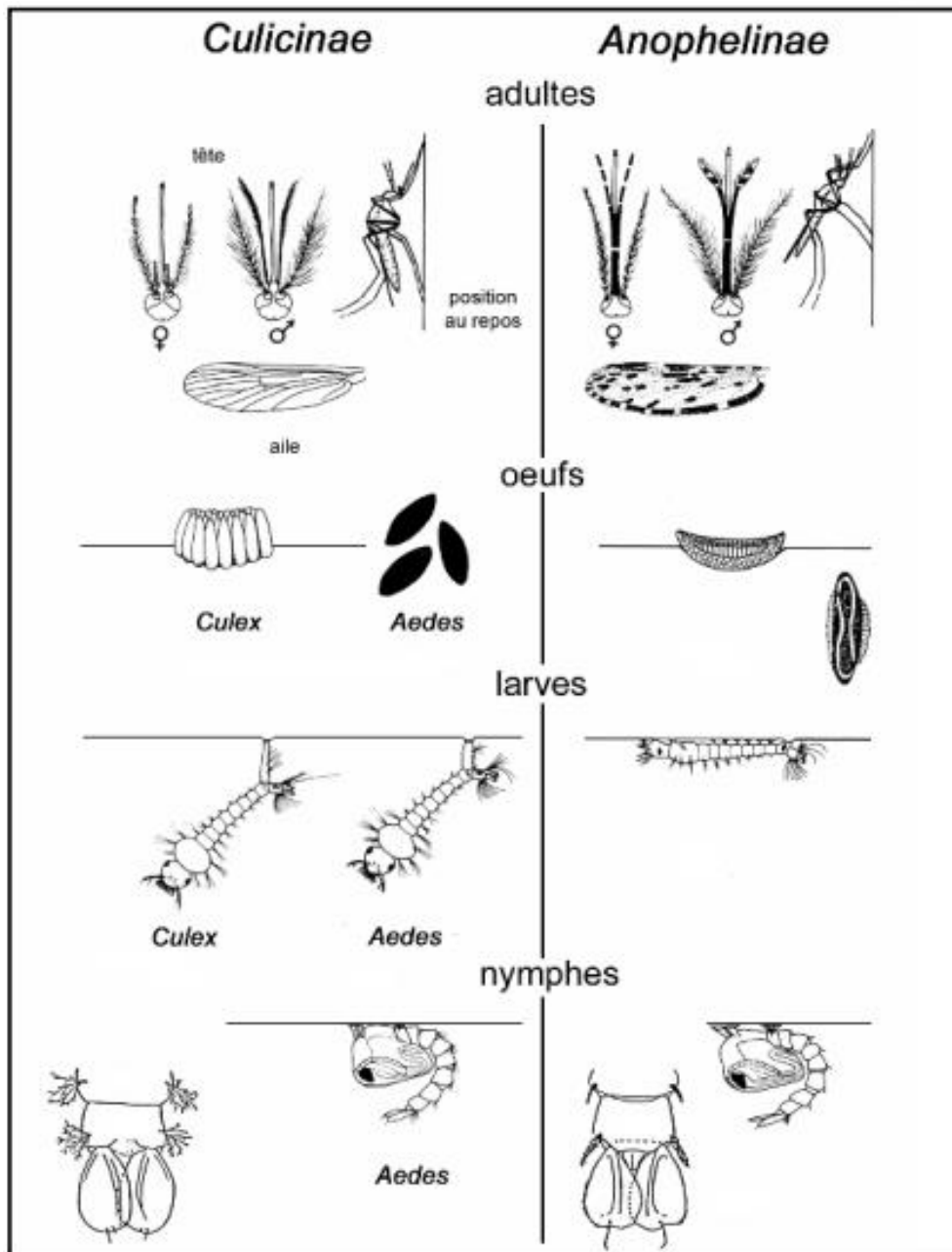


Figure 3 : Principales caractéristiques morphologiques permettant de différencier les Anophelinae des Culicinae (Lane & Crosskey, 2012)

I.1.3.3. Vecteurs de paludisme au Cameroun

Au Cameroun, la présence des vecteurs du paludisme a été signalée dans de nombreuses études mettant en évidence une faune anophélienne, qui pourrait être considérée comme l'une des plus diversifiées d'Afrique avec plus de 54 espèces rapportées (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019). Parmi celles-ci, 17 des espèces sont vectrices [soit 6 vecteurs majeurs (*A. gambiae*, *A. coluzzii*, *A. arabiensis*, *A. funestus*, *A. nili*, *A. moucheti*) et 11 secondaires] du paludisme et impliquées dans une transmission permanente ou occasionnelle du parasite du paludisme.

▪ **Complexe *Anopheles gambiae***

Les membres du complexe *A. gambiae* retrouvés au Cameroun sont : *Anopheles gambiae*, *A. coluzzii*, *A. arabiensis* et *A. melas*. *Anopheles gambiae* et *A. coluzzii* sont largement répandus dans le pays, alors qu'*A. arabiensis* est limité dans les zones arides et semi-arides du nord (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2008a). *Anopheles coluzzii*, *A. arabiensis* et *A. gambiae* sont principalement responsables de la transmission du paludisme. Il n'y a toujours pas de données impliquant *A. melas* dans la transmission du paludisme au Cameroun, mais cette espèce est considérée comme un bon vecteur en Guinée équatoriale voisine (Overgaard *et al.*, 2012). La notion de « complexe », appliquée au genre *Anopheles*, renvoie à un groupe d'espèces identiques sur le plan morphologique, mais différentes sur le plan moléculaire (inversion chromosomique) et bionomique (Coluzzi *et al.*, 1985). Ainsi, *Anopheles gambiae*, *A. coluzzii* et *A. arabiensis* avec six autres espèces (*Anopheles melas* Theobald, 1903 ; *Anopheles merus* Doenitz, 1902 ; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911 ; *Anopheles amharicus* Hunt *et al.*, 2013 ; *Anopheles bwambae* White, 1985 et *Anopheles fontenillei* Barrón *et al.*, 2019) font partie du complexe d'espèces *Anopheles gambiae* s.l.. *Anopheles gambiae* et *A. coluzzii* sont largement distribués et souvent retrouvés en sympatrie dans les gîtes larvaires. Cependant, *Anopheles coluzzii* est généralement associé à un environnement urbain, tandis qu'*A. gambiae* est beaucoup plus retrouvé dans les zones rurales et/ou péri-urbaines (Kamdem *et al.*, 2012 ; Piameu *et al.*, 2021a). *Anopheles arabiensis*, quant à lui, prédomine plus probablement dans les zones xériques (c'est-à-dire caractérisées par une aridité persistante) et est à la fois anthropophile et zoophile. Cette espèce se trouve à des niveaux variables de sympatrie avec *A. gambiae* et *A. coluzzii* (Sinka *et al.*, 2010).

▪ **Groupe *Anopheles funestus***

Le groupe *Anopheles funestus*, présent dans la région afrotropicale, est composé de onze espèces morphologiquement similaires au stade adulte (Coetzee, 2020) : *Anopheles funestus* s.s. Giles, 1900 ; *A. funestus-like* Spellings *et al.*, 2009 ; *A. parensis* Gillies, 1962 ; *A. vaneedeni* Gillies & Coetzee, 1987 ; *A. aruni* Sobti, 1968 ; *A. confusus* Evans & Leeson, 1935 ; *A. lesoni* Evans, 1931 ; *A. rivulorum*, Leeson, 1935 ; *A. rivulorum-like* Cohuet *et al.*, 2003 ; *A. brucei* Service, 1960 et *A. fuscivenosus* Lesson, 1930. Parmi les espèces de ce groupe *A. funestus*, *A. funestus* s.s., *A. lesoni* et *A. rivulorum* présentent la distribution la plus large (Dia *et al.*, 2013). Selon Gillies & De Meillon (1968), le terme « groupe » désigne des espèces qui sont morphologiquement très similaires au stade adulte mais qui présentent quelques différences à au moins un stade de leur développement. *Anopheles funestus* s.s. joue un rôle majeur dans la

transmission du paludisme ; ce taxon aurait un impact plus important dans la transmission du paludisme qu'*A. gambiae* dans certaines aires géographiques d'Afrique subsaharienne (Coetzee & Fontenille, 2004). Au Cameroun, quatre espèces du groupe *A. funestus* comprenant *A. funestus* s.s., *A. lesoni*, *A. rivulorum* et *A. rivulorum-like* sont signalées (Menze *et al.*, 2018 ; Kopya *et al.*, 2021).

▪ **Groupe *Anopheles nili***

Le complexe *A. nili* est composé de quatre espèces (Coetzee, 2020) : *Anopheles nili* Theobald, 1904, *Anopheles somalicus* Rivola & Holstein, 1957, *Anopheles carnevalei* Brunhes *et al.*, 1999 et *Anopheles ovengensis* Awono-Ambene *et al.*, 2004. Parmi les espèces du complexe *Anopheles nili* présent au Cameroun, *A. nili* est de loin l'espèce vectrice du paludisme la plus importante (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019). *Anopheles ovengensis* et *A. carnevalei* ont également été signalés infectés par *P. falciparum*, tandis qu'*A. somalicus* est strictement zoophile et ne participe donc pas à la transmission des parasites du paludisme chez l'Homme. *Anopheles nili* et *A. ovengensis* piquent aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations, mais se reposent principalement à l'extérieur. *Anopheles carnevalei* pique exclusivement à l'extérieur des habitations (Awono-Ambene *et al.*, 2004). Les larves d'*A. nili* se développent sur le bord ensoleillé des cours d'eau rapides, où la végétation flottante et les débris offrent des abris appropriés. Les populations forestières de cette espèce sont généralement très anthropophiles et se nourrissent régulièrement à l'intérieur, tandis que celles de la savane sont plus exophiles et exophages (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006). *Anopheles nili* est généralement responsable d'une forte nuisance pour l'Homme dans les villages bordant les rivières, mais il est également présent à la périphérie des zones urbaines (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006).

▪ **Groupe *Anopheles moucheti***

Ce groupe était auparavant constitué de trois formes morphologiques : *Anopheles moucheti moucheti*, *Anopheles moucheti nigriensis* et *Anopheles moucheti bervoetsi* (Gillies & De Meillon, 1968). La classification récente de Walter Reed Biosystematics Unit/WRBU (2012) reconnaît *A. moucheti* et *Anopheles bervoetsi* comme des espèces formelles, tandis que *A. moucheti nigriensis* est considéré comme une variante morphologique au sein de l'espèce *A. moucheti*. Au Cameroun, *Anopheles moucheti* Evans, 1923 se trouve dans le domaine de la forêt équatoriale où il a été signalé comme responsable de la transmission du paludisme à l'homme, en particulier dans les villages situés le long des cours d'eau à débit lent (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2008b). *Anopheles moucheti* est un important vecteur du paludisme ; il est largement distribué dans les zones forestières d'Afrique centrale (Gillies & De Meillon, 1968).

Des collectes de larves pour évaluer les facteurs écologiques influençant la distribution d'*A. moucheti* à travers les réseaux de rivières du sud du Cameroun ont montré que les larves d'*A. moucheti* sont fréquemment associées aux rivières lenthiques, aux basses températures et à l'abondance de la végétation aquatique au bord de la rivière (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2009). Ces dernières décennies, des changements dans la composition du système vectoriel du paludisme ont été soulignés avec une fréquence plus élevée d'*A. gambiae*, qui prend le pas sur *A. moucheti*. Ce changement serait favorisé par certaines pratiques anthropiques en l'occurrence l'urbanisation, la déforestation et les modifications du paysage à des fins de jardinage et/ou de loisirs (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2005).

▪ Vecteurs secondaires rencontrés au Cameroun

Anopheles ovengensis, *Anopheles paludis* Theobald, 1900, *Anopheles ziemanni* Grünberg, 1902, *Anopheles coustani* Laveran, 1900, *Anopheles pharoensis* Theobald, 1901, *Anopheles marshallii* (Theobald, 1903), *Anopheles rufipes* (Gough, 1910), *Anopheles carnevalei* Brunhes, Le Goff & Geoffroy, 1999, *Anopheles hancocki* Edwards, 1929, *Anopheles lesoni* Evans, 1931 et *Anopheles wellcomei* Theobald, 1904 sont considérés comme des vecteurs secondaires impliqués dans la transmission du paludisme de manière occasionnelle ou temporelle (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019).

I.2. Lutte antivectorielle et gestion intégrée des vecteurs

La lutte contre les vecteurs du paludisme vise à réduire le contact hôte/vecteurs, la densité et la longévité des vecteurs, et à protéger les individus de l'infection (Nájera *et al.*, 2011). Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'y parvenir, notamment l'assainissement de l'environnement vital (Carter, 2014), l'utilisation de répulsifs (Islam *et al.*, 2017), l'utilisation à grande échelle de pulvérisation intra-domiciliaire (PID) à effet rémanent (Choi *et al.*, 2019) et de moustiquaires imprégnées d'insecticides en abrégée MIIs (Lengeler, 2004).

I.2.1. Amélioration de l'environnement de l'habitat

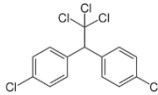
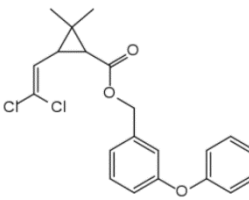
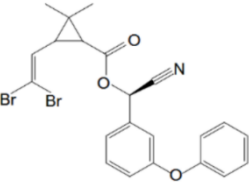
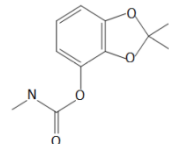
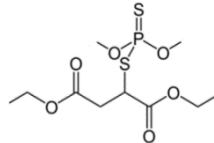
La structure de l'habitation constitue un déterminant important de l'abondance des vecteurs (Carter, 2014), y compris la gestion des gîtes larvaires (Tusting *et al.*, 2013). Ainsi, des études réalisées dans le sud-est de la Tanzanie ont montré que l'abondance d'*A. gambiae* s.l. et d'*A. funestus* s.l. à l'intérieur des maisons est significativement réduite par la qualité de l'habitat : la présence des avant-toits et des fenêtres grillagées utilisant ou non des matériaux traités aux insecticides (Killeen *et al.*, 2017) ou sans insecticides (Ogoma *et al.*, 2010; Bradley *et al.*, 2013). D'autres facteurs liés à l'habitat, qui sont positivement associés à la densité des

vecteurs, sont la présence d'un toit de chaume et le plâtrage des murs (Kirby *et al.*, 2009; Lwetoijera *et al.*, 2013). En effet, le programme Roll Back Malaria a mis en avant la protection des portes, des fenêtres et du toit, ainsi que le plâtrage des murs (RBM, 2015) comme des stratégies permettant de réduire l'entrée des moustiques dans les maisons. Dans ladite étude, une enquête sur les indicateurs du paludisme a révélé que la prévalence du paludisme était plus élevée ($\approx 71\%$) chez les enfants vivant dans des maisons traditionnelles contre 40 % chez leurs homologues vivant dans des maisons modernes (RBM, 2015). Au Cameroun, une étude récente a montré que les caractéristiques des maisons, telles que la présence de trous dans les murs, les avant-toits ouverts, les fenêtres non protégées, et le fait de vivre à proximité de gîtes larvaires, favorisent la présence de moustiques dans les maisons (Ngadjeu *et al.*, 2020). Plusieurs méthodes peuvent toutefois être utilisées dans la gestion des gîtes larvaires ; il s'agit, par exemple, d'une modification de l'environnement pour réduire les habitats larvaires qui porte sur (a) le drainage des canaux et l'assèchement des zones marécageuses, (b) le nivellement des terres ou le remplissage des bassins, (c) la protection ou la couverture étanche des réserves d'eau domestique. Cette méthode de lutte peut également être réalisée en répandant de l'huile végétale à la surface des gîtes de reproduction, ce qui empêche aux larves, aux nymphes et aux adultes nouvellement émergés de rester à la surface de l'eau (Floore, 2006).

I.2.2. Méthode de lutte à base d'insecticides

Cette méthode de lutte utilise les propriétés de nombreuses molécules à effets insecticides (substances synthétiques ou végétales) pour tuer les vecteurs soit par contact, soit par ingestion (OMS, 2019). Les familles d'insecticides couramment utilisés en santé publique (tableau I) incluent les organochlorés, les pyréthriinoïdes, les organophosphates et les carbamates (WHO, 2017). Les organochlorés et les pyréthriinoïdes ciblent le canal sodique activé par le potentiel dans les neurones des insectes tandis que les organophosphates et les carbamates ciblent l'acétylcholine-estérase dans les synapses du système nerveux des insectes (Brogdon & McAllister, 1998). Parmi ces méthodes de lutte contre les vecteurs du paludisme à base d'insecticides, les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MIIs) et pulvérisations intradomiciliaires (PID) constituent les piliers de toute stratégie, en raison de leur efficacité et de leur prix d'achat relativement bas. Cependant, les seules classes d'insecticides recommandés par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires sont les pyréthriinoïdes et les pyroles (WHO, 2019b) ; ceci du fait de leur faible toxicité sur les mammifères. Les carbamates, les organophosphorés et les néonicotinoïdes sont cependant recommandés pour les PID.

Tableau I : Insecticides recommandés par l’OMS dans l’étude de sensibilité des moustiques, et leur usage pour l’imprégnation des moustiquaires imprégnées ou pour les pulvérisations intra-domiciliaires

Familles	Insecticides	Noms scientifiques	Durées d’action	Formules	MIIs	PID
Organochlorés	DDT	4,4'-(2,2,2-trichloro-ethane-1,1-diyl) bis (chlorobenzène)	6-12 mois		Non	Oui
Pyréthrinoïdes (Type I)	Perméthrine	3-(2,2-dichlorovinyl) - 2,2-diméthylcyclopropane carboxylate de 3-phénoxybenzyle	1-2 mois		Oui	Oui
Pyréthrinoïdes (Type II)	Deltaméthrine	(1R,3R) - 3-(2,2-dibromovinyl) - 2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)-α-cyano-3-phénoxybenzyle	2-3 mois		Oui	Oui
Carbamates	Bendiocarb	(2,2-Diméthyl-1,3-benzodioxol-4-yl) Nméthylcarbamate	2-6 mois		Non	Oui
Organophosphates	Malathion	Diéthyl 2 - [(diméthoxyphosphoro thioyl) sulfanyl] butanedioate	2-3 mois		Non	Oui

Source : WHO (2023b).

Les pyroles sont aussi, avec les néonicotinoïdes, les deux nouvelles classes d'insecticides approuvées par l'OMS comme composés chimiques alternatifs pour la lutte antivectorielle (Dagg *et al.*, 2019). Ces composés agissent au niveau cellulaire et perturbent les voies respiratoires et les gradients de protons, par découplage de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Ils sont des pro-insecticides nécessitant une activation initiale par des oxydases pour produire un composé actif. Le chlorfénapyr constitue actuellement une matière active des pyroles, approuvé par l'OMS dans la lutte antivectorielle (WHO, 2019b). Découverts vers la fin des années 1980, les néonicotinoïdes sont largement utilisés en agriculture contre les insectes ravageurs et en médecine vétérinaire contre les puces des chiens et des chats (Oxborough *et al.*, 2019). Ils comprennent des dérivés soufrés ou chlorés tels que l'imidaclopride, l'acétamipride et le clothianidine. Le mode d'action du clothianidine diffère de ceux des carbamates, des organophosphates et des pyréthriinoïdes. Il agit comme un antagoniste de l'acétylcholine, stimulant ainsi les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR), ce qui entraîne une surstimulation neuromusculaire et la mort du moustique. Les néonicotinoïdes ont également une très faible toxicité pour l'homme, car ont une très faible affinité pour les récepteurs nicotiniques des vertébrés, contrairement aux nAChR des insectes (Oxborough *et al.*, 2019).

I.2.2.1. Utilisation des répulsifs

Un répulsif est une substance chimiquement volatile qui incite un animal ou un insecte à se déplacer dans une direction opposée à la source du stimulus, en annulant l'attraction d'un insecte, par exemple, par une source d'odeur (Islam *et al.*, 2017). Il peut également être utilisé comme un moyen de défense à l'échelle individuelle et/ou spécifique, empêchant l'insecte de se poser sur la peau de l'hôte et par conséquent de le piquer (Deletre *et al.*, 2016). Dans la pratique, les répulsifs sont recommandés pour les personnes qui s'aventurent dans des aires non cloisonnées ou qui restent à l'extérieur des habitations pendant le crépuscule. Les répulsifs peuvent, selon leur constitution, être synthétiques (chimiques) ou naturels à base d'extraits de plantes (Abiy *et al.*, 2015; Govindarajan *et al.*, 2015a; Govindarajan *et al.*, 2015b; Deletre *et al.*, 2016). L'eucalyptus citronné et l'huile de citronnelle sont quelques répulsifs naturels ; le DEET (N, N-diéthyl-1,3 méthyl benzamide), le citriodiol et les pyréthriinoïdes de synthèse sont des répulsifs chimiques. Le DEET reste le répulsif synthétique le plus utilisé dans le monde pour lutter contre les piqûres de moustiques (Pickett *et al.*, 2008).

I.2.2.2. Pulvérisations intra-domiciliaires à effet rémanent

Les pulvérisations intra-domiciliaires (PID) représentent une stratégie opérationnelle de lutte contre le paludisme. Elles consistent en une pulvérisation des surfaces intérieures des habitations et autres structures servant de lieu de couchage, avec un insecticide résiduel pour tuer ou repousser les moustiques endophiles (WHO, 2013b). Elles sont largement utilisées dans les zones de transmission saisonnière, y compris dans les zones endémiques du paludisme. Les PID ont joué un rôle important avec les premiers programmes utilisant le dichlorophényl-dichloroéthane (DDT) en Europe, en Russie, en Asie et en Amérique latine pendant la campagne mondiale d'éradication du paludisme de 1955 à 1969 (Nájera *et al.*, 2011). Des réductions de la transmission du paludisme ont été observées dans plusieurs pays africains (Oxborough, 2016) où la PID a été menée en utilisant des carbamates, du DDT et des pyréthroïdes. De plus, des essais contrôlés randomisés ont montré que les PID réduisent l'incidence du paludisme dans les zones de transmission relativement faible ou saisonnière, mais leur impact serait inférieur à celui des MIIs (Pluess *et al.*, 2010). Il convient de signaler que, bien qu'efficaces, ces pulvérisations présentent plusieurs limites, notamment la nécessité d'une application régulière (tous les 2 à 12 mois selon l'insecticide), un coût de traitement élevé, des problèmes logistiques (WHO, 2006 ; White *et al.*, 2011) et une résistance potentielle ou réelle aux insecticides (Dabire *et al.*, 2014 ; Elanga-Ndille *et al.*, 2019). Cette situation justifierait la diminution du nombre de pays utilisant les PID, entraînant en conséquence une réduction de la couverture de la population totale à risque dans le monde, soit 5,8 % en 2010 et 2,6 % en 2020 (WHO, 2022a). Au Cameroun, depuis l'interruption des activités de PID pendant l'ère d'éradication du paludisme, en raison entre autres de la résistance aux insecticides, ce n'est qu'en 2008 que les activités de PID à petite échelle ont été remises en œuvre (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Ainsi en 2008, un total de 1888 structures ont été pulvérisées avec le lambda-cyhalothrine (10% WP). Entre 2012 et 2013, les activités de PID ont été réalisées dans 8 quartiers de Douala (Bilonguè, Newton, Mabanda, Sodiko, Bonamikani, Dikollo, Bali et Bonadoubè) où 2107 structures ont été traitées avec la perméthrine, la lambda-cyhalothrine, l'alpha-cyperméthrine et le chlorpyrifos-éthyl (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019). D'autres activités de PID sont fréquemment effectuées au sein des grandes implantations agro-industrielles ; c'est le cas des plantations d'hévéa de Niété dans la région du Sud par la Société d'Hévéa du Cameroun (HEVECAM), ainsi que dans les plantations cotonnières du Nord par la Société de Coton du Cameroun (SODECOTON) (MINSANTE-PNLP, 2019).

I.2.2.3. Moustiquaires imprégnées d'insecticides

Une moustiquaire imprégnée d'insecticides (MIIs) est définie comme celle qui repousse, neutralise ou tue les moustiques qui entrent en contact avec l'insecticide présent sur le matériau de la moustiquaire (Mutuku *et al.*, 2013). Deux catégories de MIIs sont couramment utilisées : **la moustiquaire conventionnelle**, qui a été traitée par trempage dans un insecticide recommandé par l'OMS. Une telle moustiquaire doit toutefois être retraitée périodiquement pour garantir la continuité de son effet insecticide ; **la moustiquaire imprégnée à longue durée d'action (MILDA)**, qui a été fabriquée à partir de fibres tissées en polyester ou en polyéthylène imprégnées d'insecticide. La moustiquaire doit conserver sa bio-efficacité pendant au moins 20 lavages dans des conditions de laboratoire selon le standard de l'OMS ; sa durée d'utilisation recommandée est de 3 ans dans des conditions de terrain (Skovmand, 2010). De nos jours, les MILDA traitées avec un pyréthroïde associé à un synergiste, le butoxyde de piperonyl (PBO), se présentent comme une option pour assurer l'efficacité continue des moustiquaires dans une zone à forte résistance aux pyréthroïdes. Toutefois, l'utilisation des moustiquaires non traitées peut également fournir une protection substantielle contre les piqûres de moustiques, bien sûr elles créent moins d'effet sur la capacité vectorielle et la transmission de la maladie (Hawley *et al.*, 2003; Okumu, 2020). De plus, il a été observé qu'à partir d'une couverture communautaire d'environ 60 % ou plus avec des MIIs, les personnes qui n'utilisent pas ces moustiquaires bénéficient néanmoins d'une protection similaire à celle offerte aux utilisateurs de MIIs (Okumu, 2020). Entre 2000 et 2020, le pourcentage de la population dormant sous une MII a également considérablement augmenté, passant de 2 à 43 % pour l'ensemble de la population d'étude, de 3 % à 49 % pour les enfants de moins de 5 ans et de même pour les femmes enceintes (WHO, 2022a). Au Cameroun, comme dans tous les pays endémiques, la prévention du paludisme repose principalement sur l'utilisation des MILDA (MINSANTE-PNLP, 2019). Il s'agit des marques telles que l'Olyset® et l'Olyset Plus® (Sumitomo Chemical Co., Ltd : Permethrine (1000 mg/m²), PermaNet (Vestergaard S.A : Deltaméthrine (1,4 ou 1,8 g/kg), Interceptor® et Interceptor G2® (BASF SE : Alpha-cyperméthrine (200mg/m²)). Depuis les années 2004, cinq campagnes de distribution gratuite de moustiquaires ont été effectuées à travers le pays en 2004 - 2005, 2011, 2015. 2019 -2020 et 2022 – 2023. Ces MILDA ont contribué à une réduction considérable des indicateurs entomologiques et épidémiologiques du paludisme (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019), confirmant ainsi l'importance de tels outils dans la lutte antivectorielle à l'échelle du triangle national. Ainsi, grâce aux résultats des études portant sur le profil de la résistance des moustiques aux insecticides dans les régions du pays, et sur recommandation des Centres de Recherches et du Programme National de Lutte contre le

Paludisme, des moustiquaires de deuxième génération ont été introduites par l’OMS pour la dernière campagne de distribution de MILDA dans le pays (Dr Ashu, Communication personnelle).

I.2.3. Méthodes de lutte biologique

Ces méthodes reposent principalement sur l’utilisation de prédateurs tels que les poissons larvivores (Chandra *et al.*, 2008), ou d’organismes microbiologiques tels que *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis*, notamment la variété *Bt. israelensis* (Floore, 2006 : Worrall & Fillinger, 2011). A titre illustratif, une étude menée au Kenya combinant le drainage des canaux et l’agent microbien *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* a conduit à une réduction d’environ 89 à 91 % de l’abondance des larves d’anophèles de dernier stade (Imbahale *et al.*, 2012). Au Cameroun, les études menées dans la ville de Yaoundé par Antonio-Nkondjio *et al.* (2021) ont montré une réduction de l’agressivité des moustiques tant à l’intérieur qu’à l’extérieur des maisons de 68,27 % et de 57,74 % respectivement. Un tel résultat a été obtenu après application d’un larvicide microbien *VectoMax* combinant *Bti* et *Bacillus sphaericus*. D’autres organismes pathogènes peuvent également permettre de lutter contre les populations de moustiques adultes. On peut citer les champignons *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*, qui ont montré des résultats prometteurs sur plusieurs espèces de Culicidae, notamment le principal vecteur du paludisme en Afrique sub-Saharienne correspondant à *A. gambiae* (Farenhorst *et al.*, 2009 ; Lovett *et al.*, 2019). Une méthode de lutte biologique prometteuse consiste à introduire une bactérie intracellulaire du genre *Wolbachia* dans une population de moustiques, afin de réduire la capacité des moustiques à transmettre la maladie (Naciri, 2019).

I.2.4. Méthodes de lutte génétique

Les stratégies de lutte génétique visent soit à réduire de façon considérable les densités des populations cibles, soit en remplaçant la population cible par une autre (qui ne peut pas transmettre le paludisme aux hôtes) par l’introduction d’un nouveau caractère (Alphey, 2014). Ainsi, parmi les stratégies visant à contrôler ou supprimer les populations de vecteurs, on peut citer le lâchage de mâles moustiques génétiquement modifiés. Ces derniers s'accouplent avec des femelles sauvages pour produire une descendance non viable (Alphey *et al.*, 2008). Une autre approche consiste au remplacement d'une population par des vecteurs génétiquement modifiés pour être réfractaires à l'infection palustre (Gabrieli *et al.*, 2014). Les techniques comme celle du « gene drive » (forçage génétique) ainsi que la méthode d'insectes stériles sont encore en phase préliminaire de développement (Alphey *et al.*, 2008). Les premiers essais de

dissémination de mâles hémizygotes, génétiquement modifiés (GM) d'*Anopheles coluzzii*, stériles et non transgéniques, menés au Burkina Faso ont démontré une réduction de l'aptitude et de la dispersion de ces vecteurs de paludisme (Yao *et al.*, 2022). Cependant plusieurs interrogations se posent en rapport avec leur cohabitation avec les populations naturelles en termes de compétition, de succès reproductif, mais également leur implication à long terme dans la transmission si la maladie persiste (Benedict & Robinson, 2003).

I.2.5. Gestion intégrée des vecteurs

Au cours de la dernière décennie, la lutte antivectorielle a suscité un regain d'intérêt à l'échelle mondiale. Par exemple, les campagnes de distribution de MIIs ont permis d'atteindre une couverture significative dans plusieurs pays africains, ce qui a entraîné des diminutions significatives de la prévalence du paludisme, même dans des régions où la maladie était fortement répandue (Slutsker & Newman, 2009). Toutefois, pour maintenir l'efficacité des efforts d'éradication du paludisme face à la résistance croissante aux insecticides, l'OMS recommande une gestion intégrée des vecteurs (GIV), qui constitue une approche adaptative et holistique pour combattre les maladies à transmission vectorielle (Townson *et al.*, 2005).

La gestion intégrée des vecteurs repose sur une série d'interventions de lutte contre les vecteurs, qu'elles soient individuelles ou combinées, dont le but principal est de maintenir un équilibre entre l'efficacité et le rapport coût-efficacité de manière respectueuse de l'environnement et durable. Ainsi, il est indispensable d'adapter les informations concernant la surveillance des vecteurs et le rapport coût-efficacité des interventions au contexte local pour la prise de décision en matière de gestion intégrée des vecteurs (WHO, 2012b). Cette stratégie intègre non seulement des interventions, des acteurs, mais éventuellement des ressources coordonnées entre le secteur de la santé et d'autres domaines, tels que les communautés, le secteur privé et les ministères autres que ceux de la santé, comme l'agriculture et l'urbanisation. Selon WHO (2012a), la gestion intégrée des vecteurs se distingue donc de la lutte antivectorielle traditionnelle, qui repose largement sur l'utilisation d'insecticides et est principalement axée sur une seule maladie et une seule intervention.

I.3. Résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides

La résistance aux insecticides se définit par la capacité d'une souche dans une population cible à survivre à des doses toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus normaux de cette espèce (Ranson *et al.*, 2011). Cela correspond également à une diminution héréditaire de la sensibilité aux insecticides (Nauen, 2007). Selon l'OMS, un vecteur du paludisme est considéré phénotypiquement résistant si moins de 90 % des individus meurent dans les 24

heures suivant l'exposition à une dose discriminante (WHO, 2018). Comme décrit dans les paragraphes I.2., l'utilisation des insecticides dans la lutte antivectorielle a contribué de façon significative à réduire les populations de moustiques. Cependant, l'usage intensif des insecticides, tant en santé publique qu'en agriculture, a joué un rôle significatif dans la sélection des souches résistantes aux différentes classes de matières actives utilisées dans plusieurs pays d'Afrique. En effet, la preuve de l'existence de vecteurs résistants est directement liée à l'échec des programmes de lutte antivectorielle sur le terrain, ce qui serait par ricochet la cause de l'augmentation de la transmission du paludisme (WHO, 2012a). À ce jour, les vecteurs du paludisme ont développé une résistance aux principaux insecticides utilisés en santé publique, à l'instar des pyréthriinoïdes, des organochlorés, des carbamates et des organophosphates (Riveron *et al.*, 2018). Les premiers cas de résistance aux organochlorés-DDT ont été signalés en 1949 en Californie (Smith, 1949) et en 1970 en Afrique de l'Ouest et au Soudan (Brown & Pal, 1971). Dans de nombreux pays africains, les données extraites de la base de données IRmapper en 2021 montrent une énorme diminution de la mortalité chez *A. gambiae*, 24 heures post-exposition à une dose discriminante de pyréthriinoïdes depuis 1995 (Ranson & Lissenden, 2016). Ces données indiquent qu'il y aurait eu, dans toute l'Afrique subsaharienne, une expansion rapide de la résistance aux insecticides au cours des 20 dernières années (figure 4).

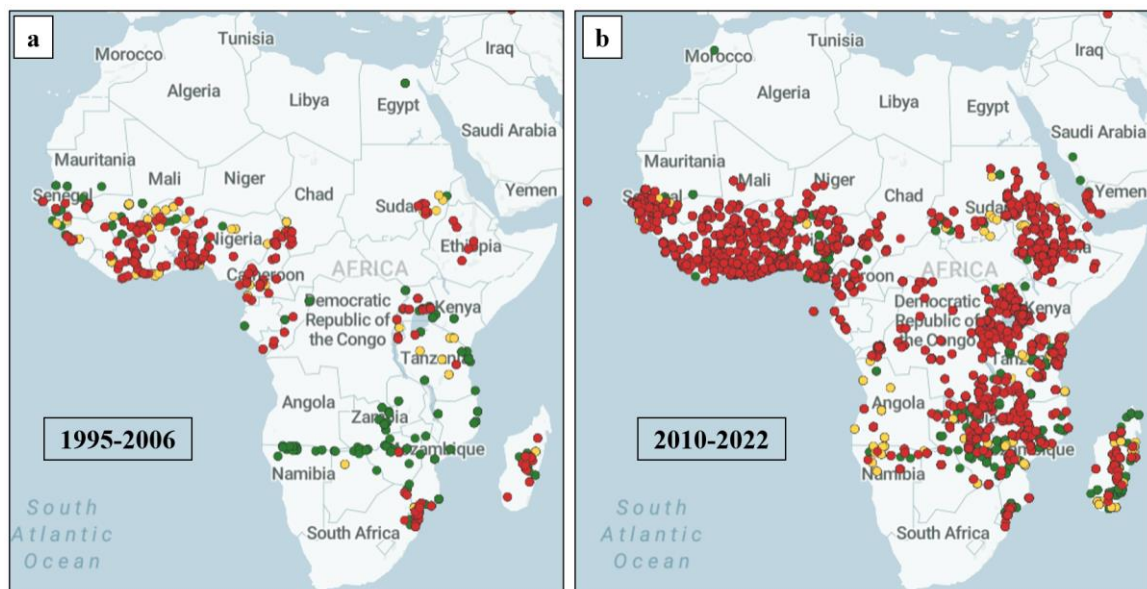


Figure 4 : Évolution de la résistance des espèces d'*Anopheles* aux pyréthriinoïdes de 1995 à 2006 (a) et de 2010 à 2022 (b)

Légende : Les points rouges indiquent une population résistante avec une mortalité < 90% ; les points jaunes correspondent à une résistance possible (mortalité entre 90% et 98%) et les points verts indiquent une population sensible (mortalité >98%).

Source : <https://anopheles.irmapper.com/>, consulté le 20 juillet 2022.

I.3.1. Situation de la résistance aux insecticides au Cameroun

La résistance aux insecticides chez les anophèles a été décrite dans les années 1950, avec les premiers cas de résistance au DDT et à la dieldrine dans les populations d'*A. gambiae* s.l. (Carnevale & Mouchet, 2001). La résistance chez les vecteurs du paludisme au Cameroun a été signalée chez toutes les classes d'insecticides utilisées en santé publique, à l'exception des organophosphates (Tchakounte *et al.*, 2019 ; Nkemngo *et al.*, 2020). La résistance aux organochlorés (DTT) a été signalée chez les vecteurs de paludisme à travers le pays (Wondji *et al.*, 2005 ; Bigoga *et al.*, 2007 ; Nwane *et al.*, 2009 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Menze *et al.*, 2016 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017 ; Menze *et al.*, 2018 ; Nkemngo *et al.*, 2020).

De même que pour les organochlorés, la résistance aux pyréthrinoïdes a été signalée comme se propageant rapidement chez les principaux vecteurs de paludisme à travers le pays. Cependant, cette augmentation de la résistance aux pyréthrinoïdes n'a été observée qu'après les années 2000. Avant cette période, les études menées ont rapporté une sensibilité des moustiques aux substances cibles dans tout le pays (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019). Globalement, entre 2000 et 2018, une augmentation progressive de résistance a été observée dans tous les faciès épidémiologiques du paludisme, tant pour les pyréthrinoïdes de type I que ceux de type II (Wondji *et al.*, 2005 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2009 ; Etang *et al.*, 2016 ; Menze *et al.*, 2016 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017 ; Nkemngo *et al.*, 2020 ; Piameu *et al.*, 2021a).

Une résistance croissante aux carbamates a également été signalée chez les vecteurs du paludisme au Cameroun. Cinq populations d'*A. gambiae* s.l., collectées sur le terrain dans les faciès forestier ont montré une résistance confirmée au bendiocarbe (Bamou *et al.*, 2019). La même année, une autre étude menée à Bankeng, une localité du Sud-Cameroun, a montré une résistance élevée des moustiques au bendiocarbe et au propoxur (Elanga-Ndille *et al.*, 2019).

I.3.2. Mécanismes de résistance aux insecticides

La résistance est, sur un plan fondamental, un processus d'adaptation d'une espèce cible au nouvel environnement naturellement sélectionné par la pression exercée par un ou plusieurs insecticides (CNEV, 2014). Les individus résistants possèdent une ou plusieurs mutations géniques, appelées allèles de résistance, qui codent pour des protéines capables d'interagir avec l'insecticide. Ces protéines mutées peuvent soit dégrader l'insecticide, soit modifier sa cible moléculaire, ce qui permet aux insectes porteurs de ces mutations de survivre à des doses normalement toxiques. Les insecticides ne provoquent pas l'apparition de ces mutations directement mais sélectionnent des individus qui les portent car ils sont alors 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 (CNEV, 2014). Certaines espèces de moustiques peuvent être résistantes à une large gamme de composés chimiques. On parle alors de **résistance croisée** lorsque le même mécanisme biologique confère la résistance à plusieurs insecticides différents. En revanche, on parle d'une **résistance multiple** lorsque plusieurs mécanismes distincts permettent aux moustiques d'être insensibles à divers insecticides (Whalon *et al.*, 2008). Cependant, la **résistance multiplicative** désigne le fait que le niveau de résistance conféré par plusieurs mécanismes de résistance chez un insecte cible sera plus élevé que la somme des niveaux de résistance conférés par ces mêmes mécanismes isolés (Hardstone *et al.*, 2009). Autrement dit, les mécanismes de résistance peuvent agir en synergie. Différents mécanismes de résistance peuvent être distingués (tableau II). Les mécanismes touchant les processus biochimiques, les modifications de la cible et la dégradation métabolique de l'insecticide (Ranson & Lissenden, 2016), sont les plus fréquents et les mieux étudiés. En revanche, les mécanismes entraînant la réduction de la pénétration cuticulaire de l'insecticide, ou résistance cuticulaire, et la résistance comportementale restent très peu documentés.

Tableau II : Principaux mécanismes impliqués dans la résistance des moustiques aux différentes classes d'insecticides utilisées en santé publique

Familles d'insecticides	Cibles biochimiques				Mécanismes de résistance connus							
					Mutations de la cible				Métaboliques			
	Canaux sodium	AChE	Récepteur GABA	Récepteur ACh	<i>kdr</i>	<i>Ace-1</i>	<i>Rdl</i>	<i>N/a</i>	COE	GST	P450	
Organochlorés	×				++					++	+	
Cyclodiènes			×				++				+	
Organophosphorés		×				++			++	+	+	
Carbamates		×				++			++		+	
Néonicotinoïdes				×				+			++	
Pyréthriinoïdes	×				++				+	+	++	
Ivermectines			×				Inconnue				+	
Insecticides régulateurs de croissance	Récepteurs hormonaux et voie de biosynthèse de la chitine				Mutation des cibles						+	
Toxines <i>Bti</i>									Mécanismes probables :			
Toxine <i>Bs</i>	Récepteurs de la paroi intestinale des larves des diptères				Mutations des récepteurs				altérations des toxines, immunité			

Légende : AChE : acétylcholinestérase ; ACh : acétylcholine ; ace-1 : gène codant l'acétylcholinestérase ; *kdr* : résistance de type knockdown ; *Rdl* : résistance à la dieldrine ; *N/a* : sous-unité du récepteur nicotique de l'acétylcholine. X indique la correspondance entre famille d'insecticide et cible biochimique, +/++ : indique l'intensité de la résistance.

Source : WHO (2022b).

I.3.2.1. Résistance cuticulaire

La résistance cuticulaire se caractérise par une modification du revêtement externe (cuticule) des insectes, visant à ralentir ou réduire la pénétration ainsi que l'absorption des insecticides (Ahnad *et al.*, 2006). Cette adaptation implique souvent un changement dans le contenu chimique ou un épaissement significatif du revêtement externe, comme observé chez certaines souches résistantes aux pyréthrinoïdes (Balabanidou *et al.*, 2016 ; 2018). L'épaississement du revêtement entraîne une diminution du taux d'absorption, ce qui donne plus temps aux enzymes métaboliques pour dégrader les molécules toxiques avant qu'elles ne puissent atteindre leurs cibles biologiques efficacement. Cela renforce ainsi le potentiel détoxifiant naturellement présent chez ces individus, comme indiqué par Minetti *et al.* (2020).

I.3.2.2. Résistance comportementale

La résistance comportementale se réfère à toute modification du comportement des moustiques, telle que le changement dans la période d'alimentation ou dans le choix du site où ils piquent leur hôte, afin d'éviter ou contourner les effets létaux des insecticides (Gatton *et al.*, 2013). Ce phénomène a été observé par suite de l'introduction massive des moustiquaires imprégnées d'insecticides, avec comme corollaire le déplacement des pics d'agressivité chez les différents vecteurs de paludisme (Sougoufoura *et al.*, 2017). De plus, ce type de résistance est difficile à suivre et à contrôler sur le terrain (Riveron *et al.*, 2018).

I.3.2.3. Résistance par modification de la cible

Chez les moustiques résistants, des modifications au niveau de la cible d'un insecticide donné peuvent empêcher une liaison efficace entre cet insecticide et sa cible. Cela se produit souvent par des mutations dans les gènes codant pour ces sites cibles qui interagissent avec l'insecticide (Liu, 2015). Les protéines-cibles impliquées dans cette résistance incluent notamment l'acétylcholinestérase (AChE), les récepteurs GABA et le canal sodium présents dans les membranes nerveuses.

▪ Canaux sodium voltage dépendants

Les canaux sodium voltage dépendants sont des glycoprotéines transmembranaires qui servent de cibles aux pyréthrinoïdes et au DDT. Lorsque ces insecticides se lient à ces canaux, ils les maintiennent ouverts, provoquant une dépolarisation neuronale suivie d'une paralysie puis d'une mort chez l'insecte. Une substitution unique d'un acide aminé dans cette protéine peut entraîner une forme de résistance appelée « knockdown resistance ». Ces mutations confèrent spécifiquement une résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT. La découverte de ces mécanismes a permis le développement, il y a plus de deux décennies, des premiers outils

diagnostiques basés sur l'ADN pour détecter les modifications ciblées impliquées dans cette résistance (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000). Il s'agit notamment de la substitution de la leucine (TTA) par la phénylalanine (TTT) initialement trouvée au niveau du codon 1014 du gène du canal sodique d'une souche Ouest africaine d'*A. gambiae*, la mutation L1014F (Martinez-Torres *et al.*, 1998) ou L995F (Davies *et al.*, 2007), d'où le nom « kdr-West ». Cette variante est aujourd'hui largement répandue dans toute l'Afrique (Riveron *et al.*, 2018). Une deuxième substitution a été trouvée chez *A. gambiae* au Kenya (Afrique de l'Est) à la même position que la précédente, portant sur le remplacement de la leucine (TTA) par la sérine (TCA) ou mutation L1014S (Ranson *et al.*, 2000). Cette mutation, appelée « kdr-East », a été détectée dans quelques pays en Afrique Centrale et de l'Ouest. Une autre mutation a été découverte dans la boucle intracellulaire cytoplasmique reliant le domaine III et le domaine IV du canal sodique d'*A. gambiae*, conférant une résistance additive à la mutation L1014F (Jones *et al.*, 2012a ; Wang *et al.*, 2015).

▪ **L'acétylcholinestérase**

L'acétylcholinestérase (AChE) joue un rôle crucial en hydrolysant l'acétylcholine, un médiateur chimique essentiel à la transmission synaptique chez les insectes comme chez les vertébrés. Ce processus est vital pour terminer efficacement les signaux nerveux dans les synapses cholinergiques (Fourmier, 2005). Les insecticides en se fixant sur cet enzyme inhibent son activité catalytique vis-à-vis de l'acétylcholine, ce qui conduit à une hyperexcitation post synaptique puis à la mort de l'insecte. Certaines modifications structurales dans l'enzyme, notamment celles affectant le site catalytique, peuvent conférer une résistance aux insecticides (Hemingway *et al.*, 2004). Ainsi, plusieurs mutations dans le gène codant pour l'acétylcholinestérase ont été identifiées chez les insectes. Notamment, une substitution de glycine par sérine au codon 119 du gène *ace-1* est associée à une résistance croisée aux carbamates et organophosphorés chez certaines espèces d'insectes (Riveron *et al.*, 2018 ; Elanga-Ndille *et al.*, 2019 ; Binyang *et al.*, 2022) tel que les membre du complexe *Culex pipiens*. Une deuxième mutation F455W, la substitution de la phénylalanine au tryptophane a été identifiée chez *Culex tritaeniorhynchus* ; sa validation *in vitro* a montré sa capacité à dégrader les organophosphates (Liu, 2015). Une autre mutation, N485I, a également été détectée chez *A. funestus* et s'est avérée associée à la résistance aux carbamates (Ibrahim *et al.*, 2016a).

▪ **Les récepteurs GABA**

Des mutations ont également été découvertes dans le gène codant pour une sous-unité du récepteur GABA (γ -aminobutyrique), neurotransmetteur lié à un canal permettant le passage des ions chlorures et conférant une résistance à la dieldrine (organochloré) chez les vecteurs de

paludisme (Hemingway & Ranson, 2000). Une mutation ponctuelle (substitution A296G) induisant le changement de l'alanine (GCT) à la glycine (GGT) a été associée à la résistance chez *A. gambiae* tandis qu'un changement d'acide aminé, de l'alanine (GCT) à la sérine (TCT) (substitution A296S), a été associé à la résistance chez *A. funestus* (Wondji *et al.*, 2011).

I.3.2.4. Résistance métabolique

La résistance métabolique est souvent considérée comme un facteur majeur dans l'échec des stratégies antivectorielles. Elle implique des processus biochimiques qui dégradent les insecticides en métabolites moins toxiques ou inactifs, ainsi que plus solubles dans l'eau et donc plus facilement excrétés. Ces processus réduisent efficacement la quantité d'insecticide qui parvient à sa cible biologique (Hemingway & Ranson, 2000). Cette dégradation est causée par des enzymes dites de « détoxification » comme les monooxygénases à cytochrome P450 (P450 ou CYP pour les gènes correspondants), les glutathion S-transférases (GSTs) ou bien les carboxylestérases (COEs). Elle s'effectue souvent en trois phases (Xu *et al.*, 2005) :

- **la phase I** qui implique l'ajout de groupes polaires ou réactifs au substrat par l'action des enzymes telles que les cytochromes P450, qui agissent par oxydation, hydrolyse et réduction. Ces modifications augmentent généralement la polarité de l'insecticide, ce qui réduit sa toxicité, augmente sa solubilité aqueuse et fournit des espèces réactives pour la conjugaison de la phase II. Les enzymes de cette phase sont nombreuses, et ont de fortes activités chez les moustiques résistants aux insecticides (Li *et al.*, 2007) ;
- **la phase II** fait intervenir des mécanismes qui augmentent l'hydrophilie des métabolites de la phase I, principalement par la conjugaison avec des molécules endogènes. Les enzymes impliquées dans cette phase sont les GSTs, les COEs et les UDP-glucuronosyltransférase (UDP-GT) ;
- **la phase III** comprend des mécanismes d'excrétion à travers les membranes cellulaires, médiés par des transporteurs dépendants de l'ATP. Les acteurs de cette étape finale appartiennent à la famille des protéines transporteuses ABC (ATP-binding cassette), qui sont des protéines membranaires (Li *et al.*, 2007).

Ces familles d'enzymes impliquées dans la résistance métabolique contiennent de multiples enzymes présentant une grande diversité de fonctions et de structures (111 P450 gènes, 31 GSTs, 43 COEs et 26 UDP-GTs annotés dans le génome d'*A. gambiae* PEST (Ranson *et al.*, 2002)) ; ceci augmente les chances qu'une enzyme métabolise plus d'un insecticide (Liu, 2015).

▪ Estérases ou carboxylestérases

Les estérases appartiennent à la famille des alpha/bêta hydrolases qui hydrolysent de nombreux composés endogènes et exogènes contenant des esters (Wheelock *et al.*, 2005). L'importance de ces enzymes dans le métabolisme des xénobiotiques et leur rôle dans la résistance des insectes aux insecticides sont bien établis. Par exemple, les carboxylestérases peuvent cibler les insecticides qui contiennent des liaisons esters, tels que les organophosphates, les carbamates et les pyréthriinoïdes (Hemingway *et al.*, 2004). Ces enzymes peuvent contribuer à la résistance aux insecticides en augmentant leur efficacité catalytique et en agissant comme inhibiteurs, étant donné leur niveau d'expression élevé, de l'interaction entre la toxine et le site cible (Montella *et al.*, 2012).

▪ Glutathion S-transférases (GST)

Les glutathion S-transférases (GST) forment une famille d'enzymes multifonctionnelles qui jouent un rôle crucial dans la biotransformation des xénobiotiques, contribuent à atténuer le stress oxydatif et participent également aux fonctions de régulation cellulaire. Au total, chez les anophèles, les GST sont principalement classés en six groupes ou sous-familles nommées delta, epsilon, zêta, sigma, oméga et thêta (Ranson *et al.*, 2001). Les Delta et epsilon sont les plus importantes chez les moustiques (Ranson *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2003; Kouamo *et al.*, 2020). En effet, de par leur large spécificité d'action avec le substrat, les GST sont impliqués dans la résistance à plusieurs classes d'insecticides par le biais d'un rôle de détoxification. Chez *A. gambiae* et *A. funestus* respectivement, des mutations uniques I114T-GSTe2 et L119F-GSTe2 ont été associées à la résistance au DDT, avec une activité catalytique marquée chez les moustiques porteurs d'un allèle résistant par rapport aux moustiques sensibles (Mitchell *et al.*, 2014 ; Riveron *et al.*, 2014b).

▪ Monooxygénases à cytochrome P450

Les monooxygénases à cytochrome P450 forment une vaste famille enzymatique présente chez presque tous les organismes vivants. Chez les insectes, environ une centaine de gènes codant pour ces enzymes ont été identifiés (Hammock, 1985). Bien que cette famille soit immense et diverse dans le monde vivant) avec plus de 18 000 protéines différentes (elle n'est pas la plus grande parmi toutes les familles d'enzymes. Elles métabolisent les composés xénobiotiques en les rendant solubles ou en les dégradant en métabolites non toxiques (Hammock, 1985). Elles ont également un rôle dans la synthèse des molécules de signalisation, qui sont importantes pour le contrôle du développement et de l'homéostasie chez l'insecte (Denisov *et al.*, 2005). Chez de nombreux insectes, plusieurs études ont établi le lien entre la

résistance aux pyréthriinoïdes et les cytochromes P450, y compris chez les vecteurs de paludisme (Hemingway *et al.*, 2004 ; Feyereisen, 2015).

I.3.2.5. Résistance métabolique médiée par les cytochromes P450

Chez les Anophèles, plusieurs membres de la sous-famille des cytochromes P450, tels que ceux appartenant aux groupes CYP6M, CYP6P et CYP6Z, ont été fréquemment associés à une résistance métabolique.

Cette résistance est particulièrement notable contre les pyréthriinoïdes, qui sont l'une des classes d'insecticides les plus étudiées dans ce contexte. Les données transcriptomiques ont révélé que les gènes *CYP6Z1*, *CYP6Z2* et *CYP6Z3* sont surexprimés respectivement dans les populations d'*A. gambiae* s.l. résistants au DDT (David *et al.*, 2005) et à la perméthrine (Müller *et al.*, 2007 ; Muller *et al.*, 2008 ; Tene-Fossog *et al.*, 2013). Des analyses fonctionnelles *in vitro*, ont montré que le *CYP6Z1* est capable de métaboliser le DDT chez *A. gambiae* (Chiu *et al.*, 2008 ; Main *et al.*, 2018), ainsi que les pyréthriinoïdes et le bendiocarbe chez *A. funestus* s.s. (Ibrahim *et al.*, 2016a). En revanche, il a été observé que *CYP6Z2* ne métabolise pas les pyréthriinoïdes chez *A. gambiae* (McLaughlin *et al.*, 2008 ; David *et al.*, 2013). Néanmoins, l'implication potentielle de ces gènes dans la résistance pourrait être liée à leur rôle en tant qu'enzymes impliquées dans des processus biochimiques (phase II) qui dégradent l'alcool phényl-3-benzoate (un sous-produit courant du processus de détoxification des pyréthriinoïdes facilité par certaines carboxylestérases) (Chandor-Proust *et al.*, 2013).

De même, une surexpression des gènes *CYP6P3* (Tene-Fossog *et al.*, 2013 ; Mitchell *et al.*, 2014 ; Adolphi *et al.*, 2019) et *CYP6P4* (Edi *et al.*, 2012) a été observée respectivement dans les populations d'*A. gambiae* et d'*A. arabiensis* (Muller *et al.*, 2008 ; Ibrahim *et al.*, 2016b) résistantes aux DDT, au bendiocarbe et aux pyréthriinoïdes. En outre, le rôle des gènes *CYP6M2* et *CYP6P3* chez *A. gambiae* (Muller *et al.*, 2008 ; Stevenson *et al.*, 2011 ; Adolphi *et al.*, 2019 ; Yunta *et al.*, 2019b) ; et *CYP6P9a* et *CYP6P9b* chez *A. funestus* s.s. (Riveron *et al.*, 2013 ; Riveron *et al.*, 2014a) dans la résistance à la perméthrine et la deltaméthrine a été rapportée. Cependant, chez *A. arabiensis*, il a été constaté que *CYP6P4* est capable de métaboliser la perméthrine mais pas la deltaméthrine (Ibrahim *et al.*, 2016b). Chez *A. gambiae*, un balayage sélectif impliquant trois mutations, notamment la substitution I236M dans le gène *CYP6P4*, l'insertion d'un élément transposable (TE) en amont et la duplication du *CYP6AA1*, a été fortement associé à une surexpression du gène *CYP6P4*. Ce dernier est capable de métaboliser les pyréthriinoïdes, particulièrement la deltaméthrine, comme observé en Ouganda (Njoroge *et al.*, 2022). La surexpression, chez *A. coluzzii*, d'un groupe de gènes incluant le *CYP6P4* a également été associée à la perte d'efficacité de certains MILDA en Tanzanie (Matowo *et al.*,

2022). De plus, les gènes impliqués dans la résistance métabolique semblent souvent présenter une plus grande tolérance aux variations génomiques susceptibles d'altérer leur fonction, leur niveau d'expression, ou les deux (Li *et al.*, 2007). Ainsi, plusieurs approches ont été utilisées pour déterminer les mécanismes moléculaires de la résistance médiée par les P450 ; ces dernières sont, entre autres, des modifications génomiques spontanées internes pouvant conduire à l'amplification, la surexpression et les mutations dans la séquence codante de ces gènes métaboliques.

▪ **Résistance via des modifications dans la séquence codante**

Les mutations ponctuelles dans la séquence codante entraînent des variations alléliques qui peuvent jouer un rôle dans la résistance métabolique. L'examen des allèles des gènes *CYP6P9a*, *CYP6P9b* et *CYP325A*, impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. funestus* s.s. en Afrique, révèle une variabilité dans le nombre de substitutions d'acides aminés au sein des séquences génétiques des souches résistantes (Ibrahim *et al.*, 2015 ; Wamba *et al.*, 2021). La caractérisation structurale (*in silico*) et fonctionnelle (*in vitro*) de *CYP6P9a* et *CYP6P9b* a montré que les allèles résistants étaient plus efficaces pour métaboliser les pyréthrinoïdes par rapport aux sensibles. D'autres preuves ont été apportées par l'expression transgénique (*in vivo*) de *CYP6P9a* et *CYP6P9b* chez *Drosophila melanogaster* ; elles ont montré que les mouches qui exprimaient les allèles résistants de ces deux gènes étaient plus résistantes à l'exposition aux pyréthrinoïdes par rapport à celles portant les allèles sensibles (Ibrahim *et al.*, 2015). Chez *A. gambiae*, une variation allélique a également été identifiée dans des gènes métaboliques tels que *CYP4J5* et *COEAE1D* (Weetman *et al.*, 2018b). Cependant, beaucoup reste à explorer concernant les principaux gènes métaboliques associés à la résistance au pyréthrinoïdes. D'autres études ont montré que les variations du nombre de copies des gènes métaboliques peuvent également agir sur la transcription de ces derniers et influencer leur surexpression (Weetman *et al.*, 2018a ; Lucas *et al.*, 2019). Chez la drosophile, quatre copies du P450 *CYP6G1* ont été trouvées associées à la résistance au DDT (Harrop *et al.*, 2014). Chez *A. funestus*, la duplication des gènes *CYP6P4* et *CYP6P9* a été signalée (Wondji *et al.*, 2009). Bien que l'analyse des séquences suggère que ces duplications n'ont pas été sélectionnées par l'utilisation de pyréthrinoïdes, la présence de copies multiples jouerait un rôle dans l'augmentation des niveaux de résistance. Chez *A. gambiae*, des événements récents de duplication ont été détectés dans *CYP9K1*, dans le cluster *CYP6AA1-CYP6P2*, dans *CYP6M2* et dans *CYP6Z3-CYP6Z1* associés à la résistance aux insecticides (Lucas *et al.*, 2019).

- **Résistance via la surexpression des gènes de détoxification**

La surexpression des gènes peut résulter d'une augmentation de la transcription, de la stabilité de l'ARNm et/ou de la traduction des protéines (Li *et al.*, 2007). Cependant il semble, dans la plupart des cas, que cette surexpression soit obtenue par des mutations et des insertions/délétions (Indels) dans les séquences promotrices agissant en *cis* et/ou les loci régulateurs agissant en position *trans* (Li *et al.*, 2007).

- **Surexpression via la régulation des gènes associés à la résistance aux insecticides**

Diverses stratégies ont été employées pour identifier les mutations responsables de l'hyperexpression des cytochromes P450 impliqués dans la résistance aux insecticides. Ces méthodes incluent notamment le remplacement chromosomique, le croisement génétique et l'analyse comparative des séquences promotrices. La comparaison systématique entre souches sensibles et résistantes a permis d'identifier comment certaines mutations dans ces régions promotrices *cis* peuvent entraîner une surexpression génique (Li *et al.*, 2007). Chez *A. gambiae*, l'analyse d'au moins 2 des 8 GST epsilon a montré une activité de la région promotrice plus élevée chez les moustiques résistants au DDT par rapport aux spécimens sensibles (Ding *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'insertion d'éléments transposables a également été fortement associée à la surexpression des allèles de résistance aux insecticides chez l'insecte cible. En effet, la surexpression du gène *CYP6G1* chez les drosophiles résistantes au DDT a été associée à l'insertion d'un rétrotransposon à longue répétition terminale de 491 paires de bases situé à 291 paires de bases en amont du site de début de transcription (Daborn *et al.*, 2002). Plus tard, des analyses transgéniques ont révélé que cet élément transposable porte des séquences amplificatrices, spécifiques des tissus qui augmentent l'expression du cytochrome P450 dans les tissus de détoxification tels que le corps gras, les tubules malpighiens et l'intestin moyen (Chung *et al.*, 2007).

La régulation de l'expression des gènes peut également être affectée par des mutations dans les régions non codantes. Ces mutations entraînent généralement des modifications de la transcription, de l'épissage, de la stabilité de la transcription ou du remodelage de la chromatine (Wray, 2007). Ces mutations, qui comprennent les polymorphismes mono-nucléotidiques (SNPs) et les Indels, sont considérées comme des cibles de l'évolution. L'insertion d'éléments transposables à l'intérieur ou à l'extérieur des régions promotrices peut également fournir des éléments susceptibles d'augmenter ou de diminuer la transcription, modifiant ainsi l'expression des gènes voisins (Krishnan *et al.*, 2018). Les variations dans l'expression génique peuvent résulter de mutations affectant les éléments régulateurs impliqués dans le contrôle

transcriptionnel, notamment au niveau des régions promotrices. Ces altérations génétiques peuvent varier depuis le polymorphisme d'un seul nucléotide jusqu'à de larges anomalies chromosomiques. Pour identifier ces modifications, une approche courante consiste en l'amplification et le séquençage des régions situées en amont (« upstream ») des gènes candidats, suivis par un examen attentif pour détecter toute mutation (Lamoril *et al.*, 2008).

I.4. Détection de la résistance métabolique

I.4.1. Détection phénotypique

L'évaluation phénotypique du statut de résistance des moustiques collectés sur le terrain est traditionnellement réalisée par des essais biologiques en tube de l'OMS (WHO, 2018). Cette procédure consiste à déterminer le taux de mortalité sur une période de 24 h après exposition de femelles adultes à une dose diagnostique unique d'insecticide. Cependant, afin de mieux comprendre la contribution des mécanismes de résistance seuls ou multiples, diverses méthodes moléculaires et phénotypiques ont été mises au point. Ces dernières sont souvent réalisées à l'aide des synergistes qui agissent comme des inhibiteurs de grandes familles d'enzymes de détoxifications (Feyereisen, 2015). Par exemple, selon les directives de l'OMS, une méthode pour évaluer le rôle des enzymes cytochromes P450 dans la résistance aux insecticides consiste à exposer préalablement les moustiques au synergiste piperonyl butoxide (PBO) à 4% avant leur exposition aux insecticides. Les taux de mortalité obtenus avec cette combinaison sont ensuite comparés à ceux résultant d'une exposition uniquement aux insecticides (WHO, 2018). Si une augmentation de la mortalité est observée lors d'une préexposition au PBO, alors une preuve de l'implication du P450 est générée.

I.4.2. Identification des gènes impliqués dans la résistance métabolique

L'évaluation phénotypique de la résistance métabolique ne fournit cependant pas d'information sur les enzymes détoxifiantes impliquées dans la résistance. A cette fin, pour identifier les gènes impliqués dans la résistance, il est essentiel de mener des investigations moléculaires visant à analyser l'expression génique de ces gènes spécifiques. De telles études ont remarquablement été facilitées avec le séquençage du génome complet d'*A. gambiae* (Holt *et al.*, 2002), qui permet des investigations complètes du transcriptome des moustiques résistants ou sensibles. Les premières expériences sur le transcriptome furent basées sur les biopuces à ADN ou ARN comprenant des sondes pour la détection des principales familles d'enzymes de détoxification (David *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2012). L'utilisation de ces puces a permis d'identifier des gènes candidats avec une expression différentielle dans les souches résistantes au sein des principales familles de détoxification testées. Actuellement, l'analyse du

transcriptome s'éloigne des expériences basées sur les biopuces à ADN ou ARN pour se tourner vers le séquençage de l'ARN (Bonizzoni *et al.*, 2015). À partir des données transcriptomiques sur les gènes différentiellement exprimés, des listes des principaux gènes candidats surexprimés chez les moustiques résistants sont générées et des approches monogéniques sont entreprises pour valider la surexpression par qPCR-RT (Riveron *et al.*, 2018).

I.4.3. Utilisation des marqueurs moléculaires

I.4.3.1. Généralités sur les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont largement utilisés en raison de leur stabilité économique et facilité d'utilisation. Ils constituent un outil précieux pour diverses applications telles que la cartographie du génome, le marquage génétique, l'étude de la diversité génétique, l'analyse phylogénétique ainsi que dans certaines enquêtes médico-légales. Ces marqueurs permettent notamment une discrimination précise entre différents génotypes ou allèles (Grover & Sharma, 2016). En biologie moléculaire moderne, ces séquences ADN distinctives (appelées allèles) peuvent influencer le phénotype bien qu'ils ne provoquent pas toujours directement des changements visibles au niveau du phénotype. De plus, en transcriptomique, on peut considérer comme « allèle » non seulement les variations dans le code ARN messenger mais aussi celles concernant sa quantité produite. Historiquement, certains composés biochimiques secondaires comme anthocyanines ou polyphénols furent parmi premiers utilisations pratiques mais limitées par instabilité environnementale. Ensuite, les marqueurs enzymatiques (allozymes ou isozymes) ont gagné en importance pendant une courte période avant la disponibilité de marqueurs d'ADN plus puissants, qui détectent la variabilité entre différents individus sur la base du polymorphisme observé dans leurs séquences d'ADN (Liu & Furnier, 1993). Les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire ont facilité le développement d'une gamme de marqueurs génétiques moléculaires ou simplement marqueurs moléculaires, en particulier au cours de ces deux dernières décennies (Grover & Sharma, 2016). La résolution et la facilité d'utilisation des systèmes de marqueurs d'ADN se sont considérablement améliorées avec les progrès des techniques d'hybridation de l'acide nucléique, de réaction en chaîne par polymérase et, plus récemment, de séquençage de l'ADN (Grover & Sharma, 2016).

I.4.3.2. Technique de marquage moléculaire

Le choix d'un marqueur moléculaire dépend de l'objectif de l'étude, de la quantité d'ADN disponible pour le test, de l'expertise technique du chercheur, des dépenses financières liées à la manipulation, ainsi que de l'équipement disponible dans un laboratoire (Grover &

Sharma, 2016). En outre, un certain nombre d'autres facteurs jouent également un rôle dans la sélection d'un système de marqueurs concernant l'organisme cible, à savoir la complexité de son génome (Yang *et al.*, 2015). Une classe particulière de marqueurs peut présenter des niveaux élevés de polymorphisme chez une espèce particulière, tout en ne pas détecter ce polymorphisme chez une espèce apparentée de la même famille. Les marqueurs génétiques peuvent être classés en marqueurs morphologiques, notamment la forme et/ou la couleur des yeux, en marqueurs protéiques et en marqueurs ADN basés sur les différences de séquences (Yang *et al.*, 2015). Les marqueurs morphologiques ont été utilisés pour la première fois dans l'analyse génétique par des généticiens tels que Gregor Mendel et Thomas Hunt Morgan. Toutefois, en raison de leur nombre potentiel limité, il existe peu d'exemples de leur utilisation pratique. Les marqueurs protéiques permettent d'analyser de nombreux échantillons à faible coût. Cependant, le nombre relativement faible de variants d'isozymes limite son utilité. Les marqueurs de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) basés sur l'ADN ont été développés et utilisés dans les années 1980 (Liu & Furnier, 1993). Au cours de la décennie suivante, la technologie de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a donné naissance à différents types de marqueurs d'ADN (Chambers *et al.*, 2014). Le tableau III présente les avantages et les inconvénients de chaque type de marqueur génétique. Pour développer des marqueurs liés aux caractères étudiés, il est indispensable de disposer de populations en ségrégation pour les caractères ciblés et de méthodes de phénotypage fiables (Michelmore *et al.*, 1991).

Tableau III : Caractéristiques des marqueurs génétiques

Types	Avantages	Inconvénients	Exemples
Marqueurs morphologiques	Facile à tester	Forte dépendance aux facteurs environnementaux	Couleur, forme, etc...
	Faible coût	Difficulté d'analyse des caractères quantitatifs	
		Difficile de déterminer l'hétérozygotie	
		Disponibilité limitée	
Marqueurs protéiques	Faible coût	Les échantillons testés doivent être en bon état	Isoenzymes
	Transmission mendélienne	Disponibilité limitée	
	Codominant	Polymorphisme faible	
	Peu dépendant des facteurs environnementaux	Matériel instable (protéine)	
Marqueurs ADN basés sur hybridation	Ne nécessite pas d'informations sur la séquence de la cible	Coûteux et long délai	RFLP
	Codominant	Utilise les isotopes	
	Pas affecté par les facteurs environnementaux	Nécessite de grandes quantités d'ADN de poids moléculaire élevé	
Marqueurs ADN basés sur la PCR	Nécessite de faibles quantités d'ADN	Nécessite un équipement coûteux	SSR
	Rapide et facile à tester	Exige des informations sur la séquence soumise à l'étude	AFLP
	Haute précision		RAPD
	Pas affecté par les facteurs environnementaux		SNPs

Légende : RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction ; SSR : Répétitions de séquences simples ; AFLP : Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés ; RAPD : ADN polymorphe amplifié à partir d'amorces de séquences aléatoires ; SNPs : Polymorphismes d'un seul nucléotides.

Source : Yang *et al.* (2015).

I.4.3.3. Exemples de marqueurs moléculaires utilisés dans la résistance aux insecticides

Le premier diagnostic basé sur l'ADN pour la résistance au site cible a été établi il y a plus de deux décennies (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Toutefois, la détection de ce type de marqueur moléculaire pour la résistance métabolique a été plus difficile, rendant laborieux (i) le suivi de sa propagation sur le terrain et (ii) l'évaluation de son impact réel sur les interventions de lutte antivectorielle et sur la transmission du paludisme. Cependant, des progrès significatifs

ont récemment été réalisés. Le premier succès pour la résistance métabolique a été identifié avec le gène GST epsilon 2 (*GSTe2*), surexprimé chez les moustiques d'espèce *A. funestus* s.s. (Riveron *et al.*, 2014b) et ceux de l'espèce *A. gambiae* (Mitchell *et al.*, 2014) résistants au DDT et/ou aux pyréthriinoïdes. Une mutation de leucine à phénylalanine (L119F) dans ce gène, chez *A. funestus* s.s., augmente la capacité de l'enzyme à métaboliser ces insecticides, conférant ainsi une résistance accrue (Riveron *et al.*, 2014b). Un outil de diagnostic révélé par PCR a été développé pour détecter cette mutation, permettant une surveillance sur le terrain (Tchouakui *et al.*, 2019). Les études ont montré que l'allèle résistant confère une forte résistance au DDT et à la perméthrine (Riveron *et al.*, 2017).

En ce qui concerne les gènes de la famille P450, des analyses génomiques ont révélé une évolution complexe de la résistance, comprenant la variation du nombre de copies, l'insertion de transposons et la conversion de gènes. Le gène *CYP6P9a* est associé à la résistance aux pyréthriinoïdes, avec des mutations spécifiques telles qu'une insertion AA dans la région promotrice chez les populations d'*A. funestus* s.s., provenant de l'Afrique australe. Ces découvertes ont permis le développement de tests diagnostiques pour suivre la résistance sur le terrain (Weedall *et al.*, 2019). Chez la même espèce, une délétion de 3 paires de bases (AAC) a été observée chez les moustiques résistants, tandis que la présence de ces paires de bases a été observée chez les moustiques sensibles. Cette observation a contribué à la mise en place d'un test de diagnostic basé sur l'ADN pour détecter la résistance médiée par *CYP6P9b* (Mugenzi *et al.*, 2019). D'autres gènes comme *CYP325A* sont également identifiés comme jouant également un rôle majeur dans la résistance aux pyréthriinoïdes en Afrique centrale (Wamba *et al.*, 2021). Ces marqueurs moléculaires récemment mis à disposition offrent une opportunité unique de répondre aux questions concernant l'impact direct de la résistance métabolique sur les interventions basées sur les insecticides comme les MILDA par exemple.

Bien qu'ils soient souvent surexprimés chez les moustiques *A. gambiae* et *A. coluzzii* résistants aux pyréthriinoïdes, les mécanismes qui conduisent à la surexpression de certains P450 à l'instar de *CYP9K1*, *CYP6M2*, *CYP6P3*, et *CYP6P4*, restent mal documentés.

I.5. Quelques techniques moléculaires permettant d'explorer la diversité génétique chez les anophèles

L'étude de la diversité génétique des populations consiste à évaluer le niveau de variation des formes des gènes (allèles) au sein d'une même espèce, correspondant encore au nombre total de caractéristiques génétiques dans la constitution génétique de cette espèce.

I.5.1. Extraction des acides nucléiques

I.5.1.1. Extraction de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) constitue l'un des matériaux de base pour les études de biologie moléculaire. L'extraction de l'ADN est une technique qui permet d'isoler l'ADN en qualité et en quantité suffisante à partir des cellules d'organismes vivants ou morts. Les protocoles d'extraction de l'ADN varient en fonction du type d'organisme, des tissus ou des cellules à partir desquels l'ADN génomique (issu des chromosomes des cellules analysées) ou l'ADN plasmidique (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*) peut être extrait, et en fonction du but de l'extraction (QIAGEN, 2003). Les méthodes d'extraction de l'ADN comprennent l'utilisation de colonne d'absorptions, d'ultrasons, de centrifugations, d'enzymes, de tampons de lyse, de surfactants et de tampons organiques. La méthode la plus courante est l'extraction à base de tampon de lyse. De nos jours, de nombreux kits d'extraction d'ADN prêts à utilisation sont produits, mais le schéma d'extraction est basé sur 4 étapes principales indépendamment du protocole :

- la lyse des cellules par broyage dans un tampon composé de détergents ayant pour rôle d'émulsifier les bicouches lipidiques des membranes, de dénaturer les protéines, particulièrement celles liées à l'ADN dans la chromatine ;
- l'élimination des protéines et des peptides du broyat se fait au moyen de solvants organiques (en général du phénol ou chloroforme) et la récupération de l'ADN en solution dans la phase aqueuse supérieure se fait par décantation ou par centrifugation ;
- l'élimination des autres acides nucléiques (ARN) se fait par addition des ribonucléases, qui hydrolysent sélectivement l'ARN en laissant l'ADN intact ;
- la concentration de l'ADN se fait par précipitation suite à un ajout d'éthanol absolue (100%) ou d'isopropanol dans la phase aqueuse.

Après extraction, l'ADN peut être conservé à -20°C pour des réactions moléculaires ultérieures.

I.5.1.2. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN est plus délicate que celle de l'ADN, car les ribonucléases (RNAses) sont très répandues, même sur la peau, et peuvent souvent se renaturer après divers traitements. Les contaminations sont minimisées par le port de gants ou l'utilisation de solutions stériles et/ou traitées avec un agent inhibiteur des RNAses (comme le RNase ZAP™ de sigma-Aldrich). Toutefois, comme pour l'extraction de l'ADN, la procédure d'extraction de l'ARN

total comprend 4 principales étapes : i) la lyse des cellules par broyage, ii) la liaison des acides nucléiques aux particules magnétiques, iii) le lavage et l'élimination des débris cellulaires et (iv) l'élution des acides nucléiques. L'ARN total ainsi obtenu peut être conservé soit sous forme précipitée dans l'éthanol, soit sous forme congelée à -80°C pour un usage ultérieur.

I.5.2. Réactions de polymérisation en chaîne et révélation des produits amplifiés

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique qui a été mise au point depuis 1985, par Kary Mullis (1987), et qui permet d'augmenter de façon substantielle une séquence ciblée d'ADN génomique (ADNg) ou d'ADN complémentaire (ADNc généré par transcription inverse à partir d'une molécule d'ARN) nécessaire pour de multiples recherches en biologie moléculaire (Eisenstein, 1990). Plusieurs variantes de cette technique sont en utilisation dans les laboratoires de biologie moléculaire.

I.5.2.1. PCR classique

La PCR classique permet l'amplification d'une séquence d'ADN particulière située sur un ADNc d'intérêt. La limitation de cette séquence se fait grâce à des couples d'amorces (courtes séquences d'ADN ou d'ARN de 20 à 25 nucléotides complémentaires du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette matrice) spécifiques : une amorce sens se fixe sur le brin négatif et une amorce anti sens qui se fixe sur le brin positif. Cette amplification exploite le processus de réplifications successives et fait appel à la capacité d'une enzyme spécifique, l'ADN polymérase, à synthétiser le brin d'ADN complémentaire servant de matrice, en présence de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) et d'ions magnésium servant de cofacteurs. Elle se déroule en trois étapes :

- la dénaturation ; c'est la phase au cours de laquelle l'ADN est dénaturé en simples brins du fait de l'augmentation de la température entre 90°C et 97°C. A cette étape, les liaisons hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent.
- l'hybridation ; c'est la fixation des amorces spécifiques sur les ADN matrices à des températures qui leur sont thermodynamiquement favorables. Elle se fait généralement entre 50°C et 65°C ;
- l'élongation ; c'est la phase de synthèse des brins d'ADN complémentaires à partir des brins matrices, à l'aide de la Taq polymérase (enzyme synthétisée à partir de la bactérie thermostable *Thermophilus aquaticus* jouant le rôle de l'ADN polymérase) à partir des dNTPs libres. Cette étape s'effectue généralement à 72°C.

Toutes ces étapes se déroulent dans un thermocycleur programmable qui expose les tubes contenant le mélange réactionnel aux températures choisies. À la fin d'un cycle, on obtient le double de la quantité initiale d'ADN, soit 2^n fois plus d'ADN après n cycles car chaque nouveau brin formé sert de matrice à la synthèse d'un autre brin.

I.5.2.2. PCR - allèle spécifique

La PCR-allèle spécifique permet la détection directe de toute mutation ponctuelle dans l'ADN, après visualisation des produits de PCR sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. C'est une PCR multiplexe où plusieurs amorces spécifiques sont introduites en même temps (figure 5). Dans cette technique, une amorce oligo-nucléotidique qui entraîne un décalage en 3' avec la matrice d'ADN, donc réfractaire à l'extension de l'amorce par l'ADN polymérase, est nécessaire pour la discrimination allélique. Par conséquent, des amorces oligo-nucléotidiques spécifiques de tous les allèles connus peuvent être synthétisées et utilisées pour détecter les allèles sur des séquences d'ADN de génotype inconnu. L'AS-PCR a déjà été utilisée dans les techniques de diagnostic basées sur l'ADN (Liu *et al.*, 2012), telles que le diagnostic de maladies génétiques et infectieuses mais aussi dans le génotypage des marqueurs génétiques.

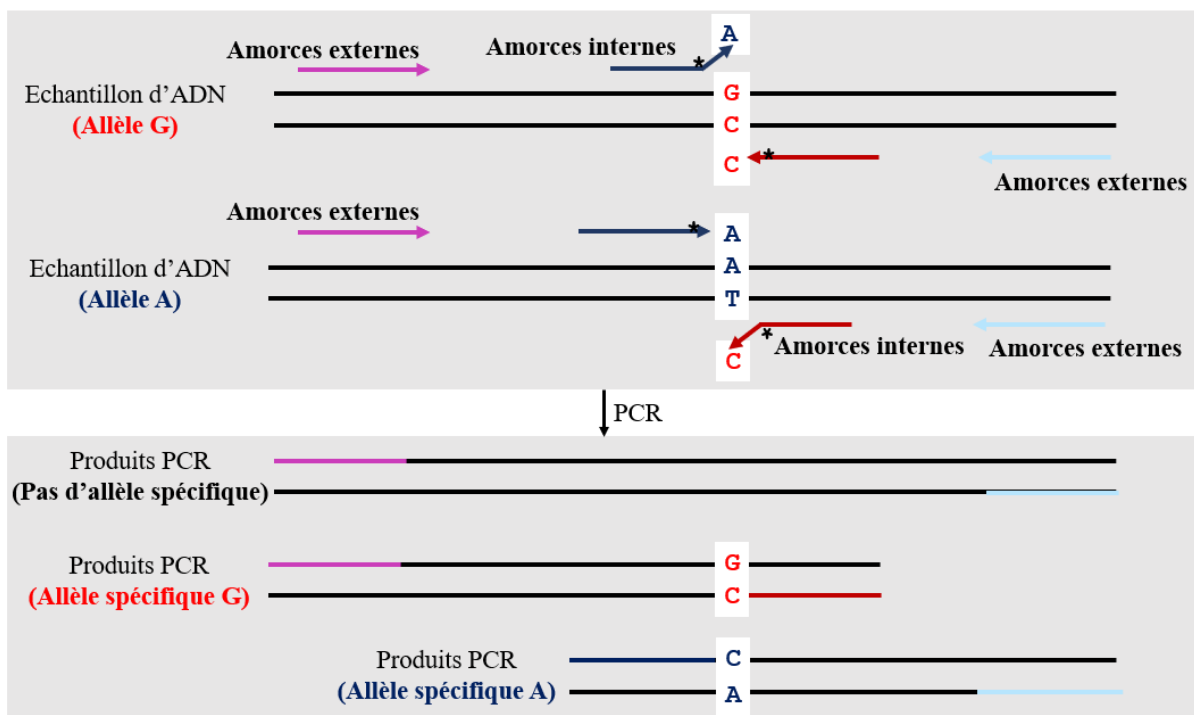


Figure 5 : Représentation schématique de la PCR multiplexe allèle spécifique (Liu *et al.*, 2012)

Légende : Coloration cyan et rouge : amorces antisens ; coloration violette et bleu foncée : amorces sens. Les lettres A, C, G, T représentent les bases azotées de l'ADN.

I.5.2.3. PCR-RFLP

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et l'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, cette méthode est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Elle a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques, d'une population à l'espèce ; elle permet également l'étude des mutations géniques. Il est important de noter qu'une enzyme peut évidemment couper à plusieurs endroits le long de la séquence. La digestion enzymatique de la séquence d'ADN génère alors plusieurs fragments de longueurs différentes, qui pourront ensuite être séparés par électrophorèse ; le génotype pourra être constitué d'un ou plusieurs fragments dans le cadre d'une mutation.

I.5.2.4. PCR quantitative en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique). Cette PCR mesure la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent (par exemple SYBR Green ou sonde TaqMan, Beakon, HybProbes) dont le signal augmente proportionnellement avec la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction (figure 6). Pour ce qui est du marqueur SYBR Green, on ajoute un oligonucléotide en même temps que les amorces. Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier, situé entre les deux amorces : c'est l'appariement de l'oligonucléotide et des deux amorces au cours de l'étape d'hybridation. Les sondes sont marquées à leurs extrémités 5' par un fluorochrome émetteur (*reporter*), par exemple FAM, et à leurs extrémités 3' par un fluorochrome désactivateur (*quencher*) fluorescent ou non. Lorsque le fluorochrome émetteur et le fluorochrome désactivateur sont proches, la fluorescence est absorbée par le fluorochrome désactivateur (figure 6). Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y a séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable. Il y a alors émission de la fluorescence car le fluorochrome s'éloigne du groupement *quencher*. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR. Les sondes fluorescentes se fixent soit sur une séquence d'ADN précise (technologie TaqMan et Beacon), soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR Green). Pour des échantillons de bonne qualité, on s'attend à avoir des débuts d'amplification aux environs du 20^{ème} cycle. Plus faible sera la concentration et/ou la qualité de l'ADN, plus le signal d'amplification sera tardif.

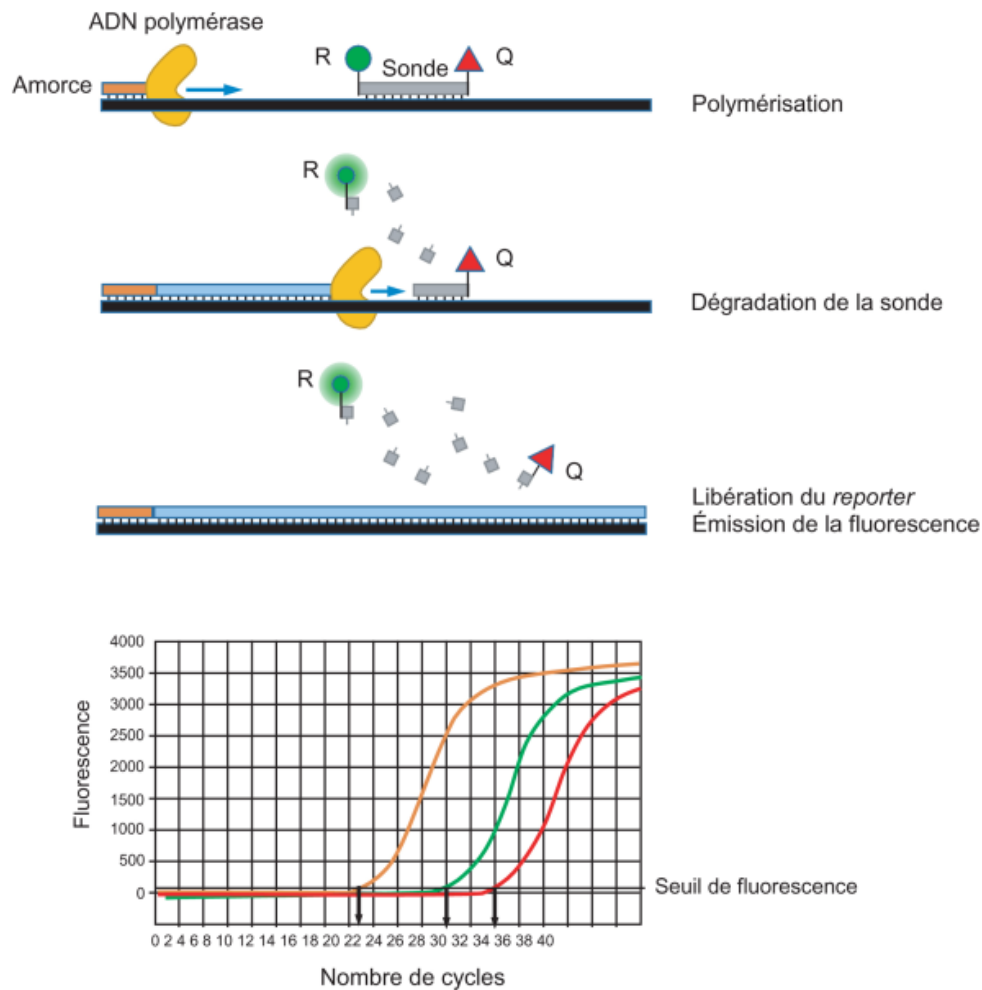


Figure 6 : Représentation schématique du principe de génotypage et des courbes d'amplification des échantillons d'ADN par la méthode TaqMan

Légende : Les différentes courbes (orange, verte et rouge) représentent les courbes d'amplification de différents échantillons ou encore la cinétique d'émission de la fluorescence. Cette cinétique est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction. Plus une séquence est abondante, plus elle sera détectée précocement (courbe de coloration orange). Q : Quencher (fluorochrome désactivateur) ; R : reporter (fluorochrome émetteur).

Source : Uhel & Zafrani, 2019

I.5.2.5. Electrophorèse et révélation des produits de PCR

L'électrophorèse et la révélation des produits de PCR s'appliquent principalement aux PCRs classiques, allèles spécifiques et RFLPs. L'électrophorèse est une technique permettant de séparer des molécules portant une charge électrique (ou ions) à l'instar des acides aminés, des protéines, et des acides nucléiques, sous l'effet d'un champ électrique. Chaque ion migre vers son électrode, les anions (molécules chargées négativement) vers l'anode et les cations (molécules chargées positivement) vers la cathode. En fonction des différents paramètres (charge électrique totale, masse moléculaire, nature du support, conditions physico-chimiques et distance parcourue), la vitesse de migration varie et permet la séparation des différentes

molécules. Différents types d'électrophorèses ont été développés et leur application dépend du type de molécule recherchée. Pour la préparation du gel d'agarose, une solution d'agarose mélangée au tris-acétate EDTA (TAE), à une concentration précise, est portée à ébullition dans une micro-onde. Lorsqu'elle devient tiède, un révélateur (Bromure d'Ethidium ou Midori green) y est ajouté ; ensuite la solution est coulée dans un moule d'électrophorèse muni d'un peigne qui formera les puits après refroidissement complet. La migration se déroule sous une tension d'environ 150 volts à 300 mA pendant 15 à 30 min selon la distance du moule. A la fin de l'électrophorèse, la lumière ultraviolette émise par un trans-illuminateur permet la fluorescence du révélateur et donc la détection des différentes bandes d'amplification.

I.5.3. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN permet d'identifier l'ordre d'enchaînement des nucléotides qui constituent un fragment d'ADN donné. Depuis sa première description, les techniques de séquençage ont fait l'objet d'innovations permettant d'en améliorer le rendement, la fiabilité et la rentabilité ; elles ont été regroupées sous l'appellation de séquençage à haut débit (NGS). Dans la littérature, la méthode de séquençage de l'ADN la plus utilisée dans les études moléculaires est celle de Sanger *et al.* (1977). Elle est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire. L'ADN à séquencer est cloné et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites. Une courte amorce d'oligonucléotides (généralement synthétisée chimiquement et éventuellement marquée) est ajoutée à l'ADN. Le point de fixation de l'amorce sert de point de départ pour la synthèse du brin complémentaire. La polymérase est alors ajoutée avec les 4 nucléotides normaux : d-ATP, d-CTP, d-GTP et d-TTP (au moins un d'entre eux est marqué au phosphore 32, au soufre 35 ou au phosphore 33), ainsi qu'une faible concentration de 4 nucléotides analogues dans des incubations séparées. Les analogues sont des di-désoxynucléotides (ddNTP) qui sont identiques aux nucléotides normaux, mais les groupes hydroxyles (OH) des riboses sont remplacés par des hydrogènes (H). La polymérase ne peut pas distinguer ce substrat des nucléotides normaux. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est initiée au niveau de l'amorce. L'intégration d'un di-désoxynucléotide dans le brin synthétisé entraîne l'arrêt de l'élongation, en raison de l'absence du groupement OH nécessaire à l'extension. Les quatre incubations contiennent donc un mélange de molécules d'ADN double brins partiellement synthétisées. La longueur des fragments d'ADN varie en fonction du point d'intégration du di-désoxynucléotide (Sanger *et al.*, 1977).

CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Cadre géographique

L'échantillonnage de cette étude a été mené de décembre 2018 à décembre 2020, dans deux zones de la ville de Yaoundé, chef-lieu de la Région du Centre, Département du Mfoundi (figure 7) à savoir : une zone urbaine constituée des quartiers Ngousso (3°54'0"N ; 11°33'0"E) et Etoa-Meki (3°52'56"N ; 11°31'49"E), et une zone péri-urbaine constituée du village Nkolondom (3°57'05"N ; 11°29'24"E). Ces différentes zones ont été choisies en raison de la présence des taxons cibles, *Anopheles gambiae* Giles, 1902 et *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013, dont le profil de résistance aux insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes, avait déjà été documenté et associé à une résistance métabolique (Kamdem *et al.*, 2012 ; Tene-Fossog *et al.*, 2013 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). De plus, ces sites ont été sélectionnés pour leur accessibilité facile et l'acceptabilité des riverains à l'étude.

Située entre les latitudes 3°47' et 3°51'N et les longitudes 11°10' et 11°45'E, Yaoundé, est l'une des villes les plus urbanisées du Cameroun, qui en 2019, avait environ 183 km² d'aires urbanisées réparties dans sept arrondissements (MobiliseYourCity, 2019). Yaoundé est située à une altitude comprise entre 750 et 1 100 mètres au-dessus du niveau de la mer et est sous l'influence d'un climat équatorial de transitions dit « climat yaoundéen » (Sighomnou, 2004 ; Ngnikam *et al.*, 2020). Cette ville est entourée de collines et caractérisée par des pluies abondantes (1 500 millimètre/an), une température moyenne annuelle de 22,7 °C, et l'existence de 4 saisons inégalement réparties alternant comme suit : une grande saison sèche (GSS) qui va de mi-novembre à mi-mars, une petite saison des pluies (PSP) qui s'étend de mi-mars à fin juin, une petite saison sèche (PSS) qui va de juillet à août et une grande saison pluvieuse (GSP) s'étendant de septembre à mi-novembre (Suchel, 1988 ; Sighomnou, 2004). Le réseau hydrographique de la ville est très dense et essentiellement composé du cours d'eau Mfoundi et de ses affluents. Ceux-ci assurent le drainage naturel des eaux de ruissellement et des eaux superficielles qui sont rejetées dans la Mefou qui, à son tour, déverse ses eaux dans le fleuve Nyong. La végétation est du type intertropical avec prédominance de la forêt humide méridionale (Achoundong, 1996).

Yaoundé a une superficie d'environ 318 km² et une population qui a considérablement augmenté depuis les années 2000 ; avec un taux de croissance d'environ 3,4 % (BNS-MINEPAT, 2021). Cette croissance rapide a entraîné une augmentation du besoin d'espace habitable et exploitable ; ce qui se traduit par une forte extension des habitations dans les banlieues de la ville (BUCREP, 2016 ; Nkwemoh *et al.*, 2017 ; MobiliseYourCity, 2019). Les grands chantiers d'urbanisation, le mauvais drainage des eaux usées, ainsi que la pratique de l'agriculture maraîchère créent des conditions propices au développement des gîtes de moustiques dans nos zones d'étude (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019).

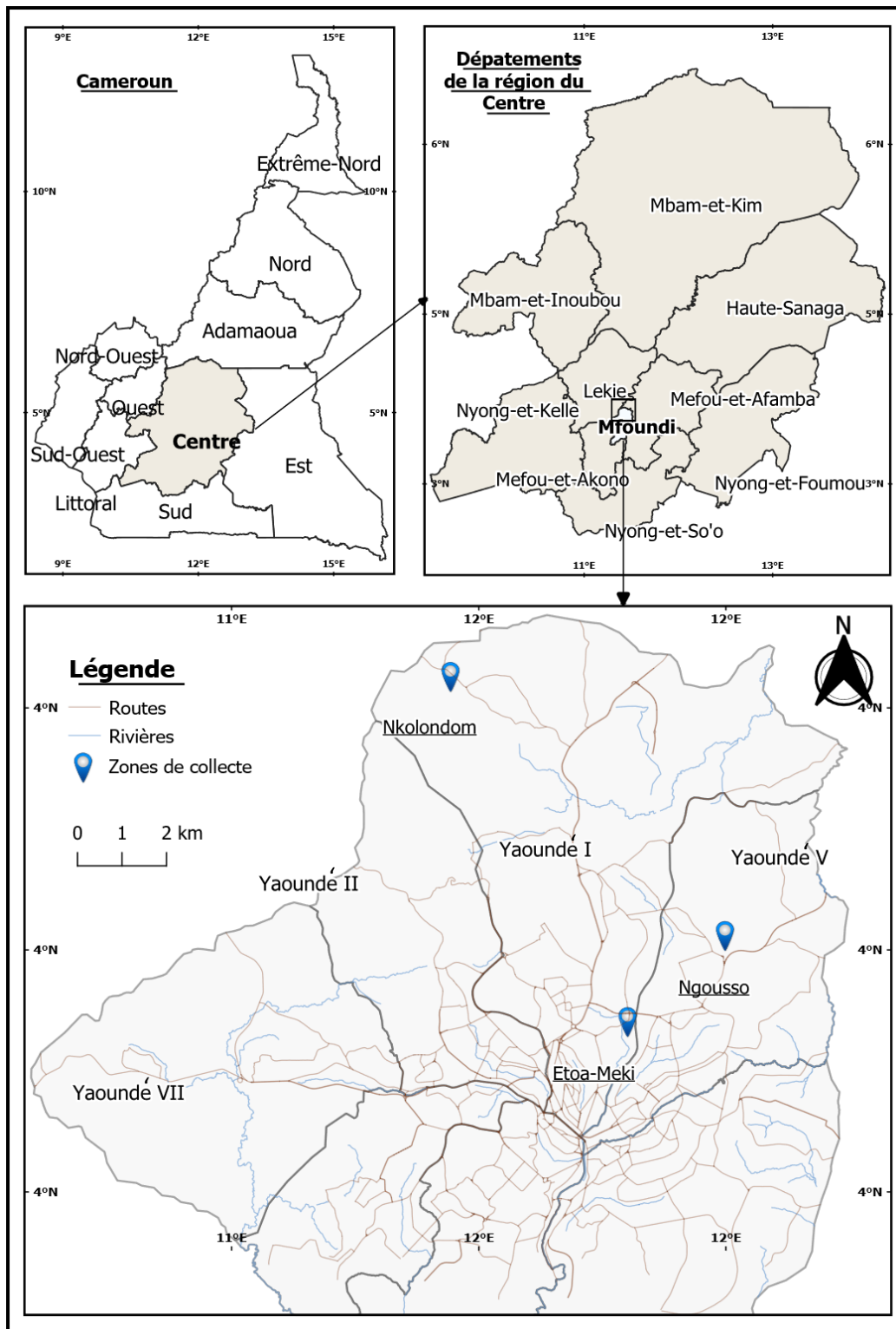


Figure 7 : Situation géographique des différents sites de collectes.

Source : Carte modifiée INC, 2020

Cette étude a reçu une clairance éthique institutionnelle de la « Liverpool School of Tropical Medicine » (Protocole de recherche 19-011, page 154) et une autorisation du Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé Humaine (CNERSH) du Cameroun, sous le numéro 2019/10/1195/CE/CNERSH/SP (cf. annexe 1, page 153).

II.1.1. Description des localités Ngouso et d'Etoa-Meki

Le quartier Ngouso (3°54'0"N ; 11°33'0"E) est situé au Nord-Est de la ville de Yaoundé, dans l'arrondissement de Yaoundé V (figure 7), à cinq kilomètres du quartier Nkolmesseng. Ce quartier connaît une croissance démographique importante avec l'implantation de trois structures sanitaires de référence, à savoir le Centre Hospitalier de Recherche et d'Application en Chirurgie Endoscopique et Reproduction Humaine (CHRACERH), l'Hôpital Général de Yaoundé (HGY) et l'Hôpital Gynéco-Obstétrique et Pédiatrique de Yaoundé (HGOPY). Les zones de collecte sont situées en contrebas de ces hôpitaux, inondées par un marécage. Ces zones abritent également de petites activités agropastorales exercées par les populations environnantes qui favorise le développement des moustiques. Les gîtes sont semi-permanents et de grande taille, principalement alimentés par les eaux de ruissellement.

Le quartier Etoa-Meki (3°52'56"N ; 11°31'49"E), est une zone urbaine située en plein cœur de Yaoundé dans l'arrondissement de Yaoundé I (figure 7). Les sites de collecte ont été des bidonvilles et les environs du lieu-dit gare voyageurs. Les gîtes sont semi-permanents et de petite taille, principalement alimentés par les eaux de pluies. Ces gîtes sont rares en saison sèche et ceux qui persistent présentent des signes de pollution due à l'évaporation de l'eau et à la concentration de xénobiotiques et de matière organique.

II.1.2. Description de la localité Nkolondom

Nkolondom (3°57'05"N ; 11°29'24"E) est une zone péri-urbaine située dans l'arrondissement de Yaoundé I (figure 7), à une quinzaine de kilomètres de la poste centrale. Ce village est caractérisé par un relief accidenté avec des pentes rocheuses et des vallons dans lesquels s'étendent des marécages exploités pour des activités agricoles, le maraîchage étant la principale activité de plus de 85 % de la population depuis des décennies (Nguegang, 2008). La production alimentaire est diversifiée et se poursuit toute l'année, avec quelques courtes périodes d'interruption pour la régénération du sol (Nguegang, 2008). Le paysage est constitué d'une mosaïque de parcelles d'une centaine de mètres carrés où sont principalement cultivés de la laitue, les légumes à feuilles et les condiments tels que le persil, le céleri, le basilique, le poireau, etc. Les bas-fonds maraîchers y sont traversés par un cours d'eau principal, le « Ntsas », affluent de la rivière Afoumla, qui est alimenté par les eaux de ruissellement de différentes collines. La production agricole est intensive et associée à une large utilisation d'engrais chimiques et de pesticides. Plus de 70 % des agriculteurs traitent leurs cultures avec au moins deux produits chimiques différents par cycle de production (Nguegang, 2008 ; Gimonneau *et al.*, 2010). Les flaques d'eau stagnante entre les billons, qui contiennent probablement des traces des pesticides appliqués sur les cultures par les producteurs (Akogbéto *et al.*, 2006),

constituent de « bons » gîtes semi-permanents et/ou permanents pour les moustiques des genres *Anopheles* et *Culex* (figure 8). Les activités agricoles se font en général tout au long de l'année, exception faite à une période de 3 semaines à un mois pendant la grande saison sèche, pour favoriser la régénération du sol (Nguegang, 2008).

II.1.3. Description du laboratoire d'accueil

Une grande partie de la présente étude a été réalisée à l'insectarium du « Centre for Research in Infectious Diseases » (CRID). Le CRID est un centre de recherche scientifique international à but non lucratif fondé en 2017. Son siège social se trouve à Yaoundé au Cameroun, plus précisément à Odza petit-marché (Nkoulou-carrière, Carrefour SIL). Ce centre comprend quatre (04) départements à savoir : un département d'Entomologie Médicale, un département de Parasitologie et de Microbiologie, une unité de Modélisation Mathématique et un département Administration et Finance. Le plateau technique du CRID comprend :

- un insectarium (biosécurité niveau 2) divisé en 6 sections (une salle principale avec un espace de travail et des cages pour les moustiques adultes ; une salle pour l'élevage des larves d'anophèles (à 27-28°C) ; une salle pour l'élevage des larves d'*Aedes* (à 30°C) ; une salle spéciale pour l'élevage des souches sensibles ; une salle de bio-essais et de bio-efficacité et une salle pour les infections expérimentales, les dissections et l'identification par microscopie ;
- un laboratoire de biologie moléculaire à la pointe qui permet entre autre de mener des expériences telles que l'extraction d'acide nucléique et protéine, l'amplification de l'ADN et le génotypage, la PCR quantitative et la PCR en temps réel, le clonage moléculaire, ARN interférence, le séquençage de l'ADN, le HLPC (High-Performance Liquid Chromatography), l'infection expérimentale, l'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Échantillonnage, identification morphologique et élevage des moustiques

L'échantillonnage des stades immatures des moustiques cibles *Anopheles gambiae* s.l., a été effectué dans les gîtes sélectionnés de nos zones d'étude, à l'aide d'une pipette, d'une louche ou d'une bassine en aluminium selon la méthode de « dipping » (Service, 1993). La technique a consisté à réaliser des louchées dans les différents gîtes, en fonction de leur taille (figure 8). Les spécimens ainsi collectés ont été transférés dans une bouteille étiquetée contenant de l'eau du gîte et transportés, à l'insectarium du CRID, pour élevage.

À l'insectarium, les larves collectées ont été réparties en densités constantes (avec un ratio d'environ 100 larves pour 400 cm², et une profondeur d'eau de 4 à 5 cm) dans des bacs

d'élevage étiquetés contenant de l'eau du gîte dans laquelle de l'eau distillée a été ajoutée progressivement pour éviter la fermentation de la matière organique. Par la suite, l'ensemble a été recouvert d'une tulle moustiquaire pour empêcher toute contamination par les pontes d'autres femelles de moustique dans le milieu et maintenus dans les conditions suivantes : une température de $27\text{ C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, une humidité relative de $80\% \pm 10\%$ et un éclairage régulé à 12 heures jour. Ces larves ont été manipulées à l'aide de pipettes Pasteur munies d'une tétine en caoutchouc et nourries quotidiennement avec TetraMin®, une nourriture pour alevins (Tchuinkam *et al.*, 2011), en veillant à ce que l'eau reste relativement claire et sans odeur. Tous les matins, les pupes ont été triées à l'aide de pipettes Pasteur, puis transférées dans des boîtes contenant l'eau de source avant d'être placées dans des grandes cages d'élevage $30\text{cm} \times 30\text{cm} \times 30\text{cm}$ (afin de favoriser l'accouplement et de disposer d'un espace de repos suffisant), étiquetées, en vue de l'obtention des stades adultes. Ces derniers ont été nourris avec un coton imbibé de jus sucré à 10 % (50 g de sucre dans une bouteille de 500 ml.) placé au-dessus des cages d'élevage et renouvelé chaque deux jours (afin d'éviter la fermentation). Après émergence, les moustiques de génération 0 (G_0) ont été examinés sous une loupe binoculaire et identifiés à l'aide des clés d'identification morphologique établies par Gillies & De Meillon (1968) et Coetzee *et al.* (2013).

Les moustiques appartenant au complexe *A. gambiae*, provenant d'un même site de collecte, ont été regroupés et maintenus dans une cage de reproduction pour des expérimentations ultérieures.

En fonction de l'espèce cible, les souches Kisumu et Ngousso ont été utilisées comme souches sensibles de référence dans cette étude.



Figure 8 : Photographies illustrant la collecte des stades immatures d'*Anopheles* dans les différents sites de collecte : (a) Ngouso, (b) Etoa-Meki et (c) Nkolondom

II.2.2. Evaluation du profil de sensibilité des spécimens sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides

Le profil de sensibilité des populations d'anophèles aux insecticides a été établi en utilisant les tests en tubes de l'OMS (WHO, 2018) et en cônes (WHO, 2013a). Tous ces tests ont été effectués sur des moustiques femelles adultes G_0 non gorgés, élevés à partir des collectes de stades immatures et âgées de 3 à 5 jours (WHO, 2018).

II.2.2.1. Protocole pour les tests en tubes de l'OMS

Le protocole pour les tests en tube de l'OMS a consisté à mettre des moustiques en contact des papiers imprégnés d'insecticides. Les insecticides utilisés dans cette étude appartenaient à cinq classes : un carbamate (Bendiocarbe), un organophosphoré (Malathion), un organochloré (DDT) et deux pyréthriinoïdes (Perméthrine 0,75 % et Deltaméthrine 0,05 %). Pour ce faire, 20 à 25 moustiques femelles ont été prélevés à l'aide d'un aspirateur à bouche (figures 9 a, b), puis introduits dans un cylindre d'observation tapissé de papier non imprégné (figure 9 c). Après une heure d'observation, les moustiques ont été transférés dans un cylindre d'exposition tapissé de papier imprégné d'un insecticide (figure 9 d). Après une exposition de 60 minutes à un insecticide (figure 9 e), les moustiques ont, de nouveau, été transférés dans le cylindre d'observation où ils ont séjourné pendant 24 heures en étant nourris d'une solution de

saccharose à 10 % (figure 9 f). A l'issue de 24 heures, les moustiques morts (ou moribonds) et ceux vivants ont été dénombrés. Un moustique est considéré comme mort lorsqu'il est inanimé ou a perdu ses pattes, ses ailes, et est incapable de s'envoler (WHO, 2018). Un minimum de 3 répliques (tubes contenant 20 à 25 moustiques) ont été effectués de façon simultanée par insecticide et par population testée. De plus, deux tubes témoins contenant d'une part des moustiques femelles de terrain non exposés aux insecticides, et d'autre part des moustiques sensibles de laboratoire en fonction de l'espèce testée ont été constitués. Le test a été réalisé à une température de 25 °C (± 2 °C) et une humidité relative de 70 \pm 10 % (OMS, 2014).

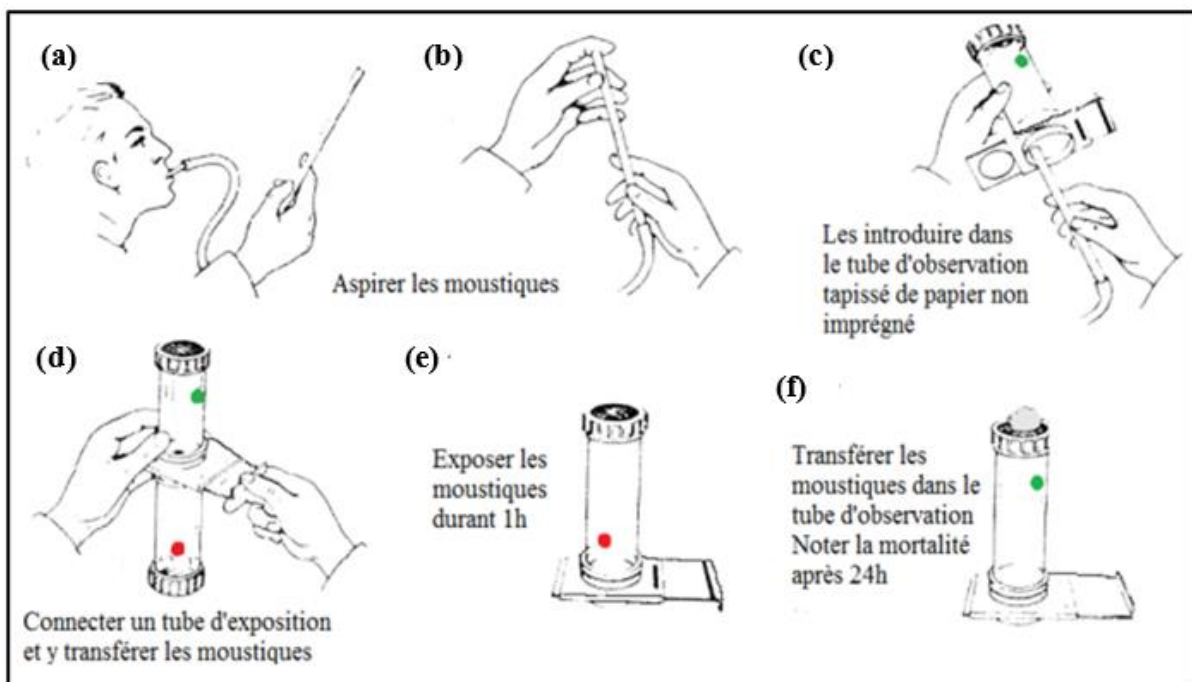


Figure 9 : Procédure de la méthode des tests en tube de l'OMS (WHO, 1998)

Légende : Les tubes avec un point vert contiennent du papier buvard imprégné du solvant utilisé pour diluer l'insecticide. Les tubes avec un point rouge contiennent le papier imbibé d'un insecticide.

Le taux de mortalité total des spécimens testés a été calculé en additionnant le nombre de moustiques morts dans tous les répliques exposés, et a été exprimé en pourcentage en divisant le nombre de moustiques morts par le nombre total de moustiques exposés, multiplié par 100. L'interprétation des taux de mortalité obtenus pour ces essais a été faite suivant les critères définis par l'OMS (WHO, 2018) :

- si le taux de mortalité est supérieure ou égale à 98 %, les moustiques testés sont dits sensibles ;
- si le taux de mortalité est compris entre 90 % et 98 % (exclus), les moustiques testés sont suspectés de résistance probable et le test reste à confirmer ;
- enfin, si le taux de mortalité est strictement inférieur à 90 %, les moustiques testés sont dits résistants.

Ensuite, les spécimens ayant révélé une résistance confirmée aux doses diagnostiques de perméthrine et de deltaméthrine ont été soumis à des tests d'intensité, comme recommandé par l'OMS. Ces tests ont été réalisés comme décrits précédemment (pages 53 et 54), à la seule différence que les doses utilisées étaient cinq fois (5×) et dix fois (10×) supérieures à la dose diagnostique. L'interprétation de la mortalité finale pour l'intensité de la résistance s'est faite suivant les critères définis par l'OMS (WHO, 2018) :

- à 5× de la dose diagnostique : l'intensité de résistance a été considérée de faible lorsque le taux de mortalité était supérieure ou égale à 98 % et modérée à forte lorsque ce taux était strictement inférieur à 98 % ;
- à 10× de la dose diagnostique : l'intensité de résistance a été considérée comme modérée lorsque le taux de mortalité était supérieure ou égale à 98 % et forte lorsque ce taux était strictement inférieur à 98 %.

II.2.2.2. Protocole pour les tests en cônes

Les tests en cônes ont été réalisés avec une moustiquaire standard (Olyset™ Net [Sumitomo Chemical Co., Ltd] : perméthrine (1000 mg/m²) et une moustiquaire de seconde génération, contenant en plus de l'insecticide, un synergiste PBO [Olyset™ Plus [Sumitomo Chemical Co., Ltd] : perméthrine [1000 mg/m²] +Piperonyl Butoxyde [1 %]. Pour ce faire, 02 cônes en polystyrène ont été montés sur chaque morceau (25cm× 25cm) de moustiquaire. Toutes les 05 faces de la moustiquaire ont été découpées et chaque morceau a été testé avec 10 moustiques (soit 5 moustiques dans chaque cône), sous une température de 25 ±2°C et une humidité relative de 80±10% (figure 10 a), conformément au protocole de l'OMS (WHO, 2013a). Ces moustiques femelles ont été introduits dans chaque cône à l'aide d'un aspirateur à bouche et mis en contact avec la moustiquaire pendant 3 minutes ; le dessus du cône a été bouché avec un morceau de coton (figure 10 b). Les moustiques ainsi exposés ont ensuite été transférés dans des gobelets en plastique, recouverts de tulle non imprégné, étiquetés conformément à la moustiquaire testée, et nourris d'une solution de glucose à 10 % (figure 10 c). Les moustiques assommés (effet « knockdown ») ainsi que ceux morts ou moribonds ont été décomptés après 1 heure d'observation, tandis que la mortalité finale a été enregistrée après 24 heures post-exposition (figure 10 c). L'interprétation du taux de mortalité a été faite comme suit :

- si le taux de mortalité était supérieur ou égale à 80 %, l'efficacité de la moustiquaire testée est considérée comme optimale ;
- si le taux de mortalité est compris entre 50 et 80 % (exclus), l'efficacité de la moustiquaire testée est considéré comme minimale ;

- enfin, si le taux de mortalité est strictement inférieur à 50 % (exclus), la moustiquaire testée est considérée comme pas efficace.

Pour chaque test insecticide effectué, les moustiques ont été traités séparément et répartis en trois lots : les morts, les survivants et les non-exposés (témoins). Les survivants et les non-exposés ont été conservés à -80 °C dans des tubes contenant du ARN*later*, tandis que les morts ont été conservés dans des tubes contenant du silicagel (un desséchant) pour des analyses moléculaires ultérieures.



Figure 10 : Déroulement d'un test d'efficacité des moustiquaires à l'aide des cônes

Légende : (a) Préparation des cônes, (b) transfert des moustiques dans les cônes pour une exposition de 3 minutes puis dans des gobelets et (c) pour 24 h d'observation.

II.2.3. Identification des mécanismes et des gènes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes

II.2.3.1. Recherche des mécanismes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Les mécanismes impliqués dans la résistance métabolique ont été recherchés en utilisant les tests de sensibilité associés au synergiste Piperonyl de Butoxyde (PBO), et ceux génotypant les différentes mutations de type *kdr* chez des échantillons de moustiques collectés sur le terrain.

II.2.3.1.1. Tests de sensibilité avec les synergistes

Les tests de sensibilité des moustiques associés au synergiste, Butoxyde de Piperonyl (PBO) ont été réalisés selon le protocole en tubes de l'OMS (WHO, 2018) tel que décrit au paragraphe II.2.2.1., afin d'étudier le rôle potentiel des oxydases dans le mécanisme de résistance métabolique de nos spécimens. La particularité de ce test est que les moustiques subissent une double exposition d'une heure chacune : une première au synergiste et une seconde à l'insecticide. Le taux de mortalité des moustiques testés a été calculé comme décrit dans le paragraphe II.2.2., mais interprété comme suit :

- lorsque le taux de mortalité dans le cas insecticide + synergiste était supérieur ou égale à celui obtenu dans le cas où l'insecticide était seul : on considère que les mécanismes métaboliques ne sont pas impliqués ;

- lorsque le taux de mortalité dans le cas insecticide + synergiste était strictement inférieur à 98 % mais supérieur à celui du cas où l'insecticide était seul, on considère que les mécanismes métaboliques sont partiellement impliqués ;
- lorsque le taux de mortalité dans le cas insecticide + synergiste était supérieur ou égale à 98 % et supérieur à celui du cas où l'insecticide était seul, on considère que les mécanismes métaboliques sont entièrement impliqués.

Les survivants et les vivants non-exposés (contrôles) ont été conservés à -80 °C dans des tubes contenant du ARN later , tandis que les morts ont été conservés dans des tubes contenant du silicagel pour des analyses moléculaires ultérieures. Cependant et compte tenu du fait que les espèces du complexe *A. gambiae* sont morphologiquement identiques, il a été indispensable de confirmer l'identité des membres de ce complexe présents dans les différents sites prospectés, avant d'effectuer toute analyse ultérieure.

II.2.3.1.2. Identification moléculaire des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Les espèces appartenant au complexe *Anopheles gambiae* ont été identifiées par la technique de SINE-PCR (Santolamazza *et al.*, 2008). Pour ce faire, l'ADN génomique (ADNg), servant de matrice pour cette identification moléculaire, a été extrait et un fragment spécifique SINE a ensuite été amplifié. Ce fragment spécifique SINE correspond à une séquence d'ADN ribosomal d'environ 200 paires de bases, hautement répétitive et polymorphe, utilisé dans l'identification de quelques membres du complexe *A. gambiae* telles que *A. gambiae*, *A. coluzzii* et *A. arabiensis*. La taille des produits amplifiés a été par la suite déterminée par migration du produit sur un gel d'agarose.

- ❖ **Extraction de l'ADNg :** cette extraction a été faite à partir d'un échantillon de 30 moustiques femelles sauvages par localité, suivant le protocole de Livak (1984). Ainsi, chaque moustique a été introduit séparément dans un tube Eppendorf de 1,5 ml à l'aide d'une pince fine puis broyé dans 100 μL de tampon Livak (1,6 ml de NaCl à 5M, 5, 8 g de sucrose, 1,57 g de tris, 10,16 ml d'EDTA à 0,5 M, 2,5 ml de SDS 20 % dans 100 ml d'eau distillée), préalablement chauffé dans un bain marie à 65 °C pendant 10 minutes. Après une incubation à 65 °C pendant 30 min, dans le but de dénaturer les nucléases, une brève centrifugation a suivi afin de condenser le broyat au fond du tube. Une solution de 14 μL de K-acétate (8 M) y a été ensuite ajoutée puis l'ensemble a été incubé dans de la glace pendant 30 min, centrifugé par la suite pendant 20 min à 4 °C pour favoriser la précipitation des débris cellulaires et des protéines dénaturées. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et précipité par l'addition de 200 μL d'éthanol à 100 % puis mixé vigoureusement à l'aide d'un vortex. Le contenu a

ensuite été centrifugé à 4 °C pendant 15 min ; le surnageant a été retiré et le précipité (qui représente l'ADN) a été rincé avec l'éthanol à 70 % à froid. Une fois précipité, le culot d'ADN a été séché sur la paillasse pendant environ une heure. L'ADN ainsi séché a été reconstitué dans 100 µl d'eau stérile et incubé à 65 °C pendant 10 min dans le but de suspendre le culot. Toutes les centrifugations ont été effectuées à 13 500 tours par minute. Les concentrations des ADN obtenus ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (260/280) NanoDrop Lite puis conservées à -20 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

- ❖ **Amplification de l'ADN :** deux amorces ont été utilisées pour la réalisation de cette PCR-SINE : SIN200-sens : TCGCCTTAGACCTTGCCTTA ; SIN200-antisens : CGCTTCAAGAAT-TCGAGATAC. Cette réaction de polymérisation a été faite dans un milieu réactionnel de 15 µL contenant 1,5µL de Tampon Kapa A 10X, 0,75 µl de 25 mM de Chlorure de magnésium (MgCl₂), 0,12 µL de 25 mM de dinucléotides triphosphates (dNTPs), 0,12 µl de 5UI/µl de Taq polymérase Kapa, 0,51 µL pour chaque amorce (avec 2*0,51 µL), 10,49 µl d'eau stérile (ddH₂O), et 1 µL d'ADNg extrait d'un seul moustique. L'ensemble a été introduit dans un thermocycleur (*BIOER GeneTouch*) avec le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95 °C suivie par 35 cycles de : 30 secondes à 95 °C (dénaturation), 30 secondes à 54 °C (hybridation), et 1 minute à 72 °C (élongation), avec une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes et un arrêt à 10 °C.
- ❖ **Migration électrophorétique :** après amplification, cinq microlitres des produits de la PCR obtenus ont été séparés sur du gel d'agarose 1,5 %, colorés au Midori green (comme indiqué au paragraphe I.5.2.5.) à 120 volts pendant 30 minutes, et visualisés en utilisant un système d'imagerie de gel ou sous un Trans-illuminateur à ultra-violet (UV) pour confirmer la taille du produit, c'est-à-dire 249 paires de bases pour *A. gambiae* et 479 paires de bases pour *A. coluzzii*.

II.2.3.1.3. Génotypage d'un fragment du gène canal sodium voltage dépendant

Afin d'établir la fréquence des mutations de type « kdr » chez *Anopheles coluzzii* de Ngouso et *Anopheles gambiae* de Nkolondom, le protocole TaqMan de Bass *et al.* (2007) a été utilisé pour les mutations L1014F [« kdr-West »] et L1014S [« kdr-East »], contre celui de Jones *et al.* (2012a) pour le N1575Y. Pour chaque espèce de moustique, l'ADNg de 90 spécimens sauvages (extrait suivant le protocole d'extraction au Livak, cf. paragraphe II.2.3.1.2.) répartis en quatre groupes ont été utilisés par mutation. Il s'agit des

moustiques sauvages : (1) 30 spécimens non-exposés à la perméthrine, (2) 30 survivants après une exposition à la perméthrine, (3) 22 survivants, et (4) 8 morts après une exposition à la combinaison PBO + perméthrine. La réaction a été effectuée dans un volume final de 10 µl contenant : 1 µl d'ADNg (entre 1 à 5 ng/µl, 5 µl de Sensimix 1X (Bioline, TN, USA), 0,125 µl de 40X de solution amorce + sonde et 3,875 µl d'eau stérile. Les sondes ont été marquées avec deux fluorochromes spécifiques, le FAM et l'HEX : le FAM pour détecter les allèles résistants 1014F et 1014S et l'HEX pour l'allèle sensible. Concernant la détection de la mutation N1575Y, les amorces et les sondes ont été utilisées. Le tableau IV présente les séquences des amorces et sondes utilisées pour chaque détection par mutation testée.

Tableau IV : Séquence des amorces/sondes utilisées pour le génotypage des mutations de type « knockdown » chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Noms du gène	Noms de l'amorce/sonde	Séquences	Références
<i>kdr</i> L1014F et L1014S	FAM L1014F	ACGACAAAATTTTC	Bass <i>et al.</i> (2007)
	FAM L1014S	ACGACTGAATTTTC	
	HEX sensible	CTTACGACTAAATTTTC	
<i>kdr</i> N1575Y	1575-sens	TGGATCGCTAGAAATGTTTCATGACA	Jones <i>et al.</i> (2012a)
	1575-antisens	CGAGGAATTGCCTTTATAGAGTTTCT	
	1575 Y	3' NFQ-TTTTTTCATTGCATAATAGTAC	
	1575 N	3' NFQ-ATTTTTTTTCATTGCATTATAGTAC	

Légende : Acide aminé : F : Phénylalanine ; L : Leucine ; N : Asparagine ; S : sérine ; Y : Tyrosine. Nucléotides : A : Adénine ; C : Cytosine ; G : Guanine ; T : Thymine.

La plateforme Agilent® Mx3005P a été utilisée pour la PCR en temps réel avec les conditions suivantes : 10 minutes à 95 °C suivies de 40 cycles d'amplification de 10 secondes à 95 °C, 45 secondes à 60 °C. Pour chacune des trois expériences, un ensemble de trois échantillons de génotypes connus (Homozygote résistant : RR, hétérozygote : RS, Homozygote sensible : SS) a été utilisé comme témoin positif ; le témoin négatif était constitué d'1 µl d'eau stérile. Au cours de cette réaction, une augmentation substantielle de la fluorescence FAM indique la présence d'individus de génotype RR, tandis qu'une augmentation substantielle de la fluorescence HEX indique celle d'individus de génotype SS. Une augmentation substantielle des deux types de fluorescences indique la présence des génotypes hybrides RS.

II.2.3.2. Identification des gènes impliqués dans la résistance métabolique aux pyréthrinoïdes

Après détection des familles de gènes impliqués dans la résistance à l'aide des tests avec les synergistes, une identification plus spécifique des gènes a été nécessaire. Elle a été faite par quantification des fragments d'ARNm dans les cellules de moustiques. Ainsi, pour chaque espèce de moustique, les niveaux d'expression des ARNm chez les spécimens résistants ont été comparés à ceux des spécimens sensibles de référence. Toutefois, cette identification a principalement porté sur les cytochromes P450, car ils sont couramment associés à la résistance métabolique chez les vecteurs du paludisme en Afrique en général et au Cameroun en particulier (Yunta *et al.*, 2019a).

II.2.3.2.1. Extraction de l'ARN

L'ARN total a été extrait à partir des lots de trois répliques biologiques de 10 moustiques chacun (afin de minimiser les variations au niveau de l'expression des gènes), à l'aide du kit d'isolement d'ARN PicoPure[®] pure (Arcturus, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) suivant le protocole décrit par Riveron *et al.* (2013). Ces lots ont été constitués des moustiques résistants (exposés à l'insecticide cible : R), de moustiques non exposés à l'insecticide (contrôle : C), et de moustiques sensibles (souches sensibles de référence : S).

Les répliques de moustiques ont été broyées séparément dans des tubes Eppendorf contenant 100 µL du tampon d'extraction (XB), à l'aide d'un pilon et d'un broyeur manuel à moteur. 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 préconditionnée en utilisant 250 µL de tampon de conditionnement (CB). Par la suite, une incubation de 5 minutes à température ambiante a été réalisée, suivie d'une centrifugation de la colonne dans le tube collecteur fourni par le fabricant à 16 000 g (force centrifuge) pendant 1 minute. Les échantillons ont été centrifugés à 14 000 g pendant 2 minutes dans le but de former le culot au fond du tube, puis le surnageant a été prélevé et introduit dans un nouveau tube Eppendorf en s'assurant de ne prendre aucun déchet. Par la suite, 100 µL d'éthanol à 70 % ont été prélevés et introduits dans le surnageant, et le tout a été mélangé. Le mélange a été prélevé et introduit dans la colonne de purification préconditionnée. Il a été suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 100 g, suivie immédiatement par une seconde centrifugation à 16 000 g pendant 30 secondes ; le flux qui a traversé a été jeté. Ensuite, 100 µL de tampon de lavage W1 ont été introduits dans la colonne de purification, suivis d'une centrifugation pendant 1 minute à 8 000 g. Les échantillons ont subi un traitement à base de DNase (préparé en introduisant 5 µL de DNase avec 35 µL de tampon RDD ; le but étant de permettre une digestion efficace de l'ADN sur colonne et de garantir que l'ARN reste lié à la colonne). L'ensemble des 40 µL de DNase obtenu

a été mélangé lentement par inversion et introduit dans la colonne de purification, suivi d'une incubation pendant 15 minutes à température ambiante. Le tampon W1 a été introduit à l'intérieur de chaque colonne de purification à un volume de 40 µL et centrifugé pendant 1 minute à 8 000 g. Ensuite, 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 8 000 g dans un premier temps, puis pendant 2 minutes à 16 000 g. La colonne de purification a été vérifiée pour détecter s'il n'y avait plus de résidu du tampon de lavage ; le flux qui a traversé a été versé. Elle a été recentrifugée à 16 000 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 ont été introduits directement sur la membrane de la colonne de purification, en s'assurant de ne pas toucher la membrane avec l'embout. Une incubation de la colonne pendant 1 minute à température ambiante s'est faite, suivie d'une centrifugation pendant 1 minute à 16 000 g pour éluer l'ARN.

La concentration des ARN ainsi obtenue pour chaque échantillon a été mesurée et lue au spectrophotomètre Nanodrop Lite (Thermo Scientific inc., Wilmington, USA), puis conservée à -80 °C. L'ARN ainsi isolé a servi à synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit Superscript III.

II.2.3.2.2. Synthèse de l'ADN complémentaire

Pour la synthèse de l'ADNc, 1 µL d'Oligo (dt) 20 (50 µM) ; 8µl d'ARN (obtenu à partir de 1000 ng d'ARN total) + H₂O ; 3 µL d'eau stérile et 1µl de dNTPs (10 µM) ont été utilisés ; dans un premier temps ; l'ensemble a été incubé à 65 °C pendant 5 minutes. Par la suite, un mélange réactionnel contenant 4µL de tampon de brin 5X, 1µL de DTT 0,1 M, 1µL de *RNase Out* et 1,5µl de Superscript III RT, a été préparé, puis mélangé à la première solution. A la fin, une solution ayant un volume de 20, 5 µL a été obtenue et introduite dans un thermocycleur avec les conditions successives suivantes : 25 °C pendant 5 minutes, 50 °C pendant 60 minutes, et 70 °C pendant 15 minutes. Lorsque le cycle a été achevé, les échantillons ont été retirés du thermocycleur ; 1µL de RNase H (*Escherichia coli*) y a été ajouté et le mélange a été incubé à 37 °C pendant 20 minutes pour éliminer toute possibilité de présence d'ARN dans le milieu.

II.2.3.2.3. Evaluation de l'expression des gènes par la PCR quantitative en temps réel

La présence de six gènes connus comme associés à la résistance de *Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides a été recherchée chez *A. coluzzii* (Ngouso) et *A. gambiae* (Nkolondom), en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel. Le tableau V ci-après présente la liste des séquences des amorces utilisés pour l'évaluation par RT-qPCR du niveau d'expression des gènes associés à la résistance métabolique.

Tableau V : Séquences des amorces utilisées pour l'évaluation par RT-qPCR du niveau d'expression des gènes associés à la résistance métabolique chez *Anopheles gambiae* s.l.

Noms du gène	Noms des amorces	Séquences d'amorces (5' à 3')	Efficiéce (en %)	Références
Facteur d'élongation	EFq sens	GGCAAGAGGCATAACGATCAATGCG	95,6	Mavridis <i>et al.</i> (2019)
	EFq antisens	GTCCATCTGCGACGCTCCGG		
RPS7	RPS7q sens	CCACCATCGAACACAAAGTTGA	93,4	
	RPS7q antisens	TGCTGCAAACCTTCGGCTATTC		
CYP6M2	6M2q sens	CTGGCGTTGAATCCAGAGGT	80,7	
	6M2q antisens	GATACTTGCGCAGTGATTTCATTAAG		
CYP6P3	6P3q sens	ACAATGTGATTGACGAAACCCCT	93	
	6P3q antisens	GGATCACATGCTTTGTGCCG		
CYP9K1	9K1q sens	CCGACACGTGGTGATGGATAC	101,9	
	9K1q antisens	CGTCGTCCGGTCCAGTCAAC		
CYP6P4	6P4q sens	CTGGACAACGTTATCAATGAAACC	96,1	
	6P4q antisens	GCACGGTGTAATCACGCATC		
CYP6Z1	6Z1q sens	CCCGCAACTGTATCGGTCTG	98,6	
	6Z1q antisens	TTCGGTGCCAGTGTGATTGA		
CYP6Z2	6Z2q sens	AGGCCACGAAGAACTACGAT	106,1	
	6Z2q antisens	ACTTTTGCAGGAGTTGTGGC		

Légende : Nucléotides : A : Adénine ; C : Cytosine ; G : Guanine ; T : Thymine.

Des courbes standard pour chaque gène ont été générées en utilisant une dilution en série d'ADNc afin d'évaluer l'efficacité de la PCR et les différences quantitatives entre les échantillons. Les réactions de qRT – PCR ont été réalisées dans un volume de 20 µL avec 10 µL de SYBR Green (*Applied Biosystems*, Texas, USA), 0,6 µL de 10 µM pour chaque amorce (0,6 µL *2), 7,8 µL d'eau stérile et 1 µL d'ADNc. L'ensemble a ensuite été introduit dans une machine TaqMan Mx3005P dans les conditions successives suivantes : une phase de dénaturation initiale de l'ADNc à 95 °C pendant 3 minutes, 40 cycles à 95 °C pendant 10 secondes et à 60 °C pendant 10 secondes, une dernière série à 95 °C pendant 1 minute, à 55 °C pendant 30 secondes, à 95 °C pendant 30 secondes. Le niveau d'expression relatif et le facteur de variation (FC) de chaque gène cible chez le contrôle (C) et les moustiques résistants (R) par rapport aux souches sensibles (S) ont été calculés en tenant compte de l'efficacité de la PCR (Schmittgen & Livak, 2008), après normalisation avec les gènes de ménages : RPS7 (numéro d'accèsion sur VectorBase : AGAP010592) et du Facteur d'élongation (Ef : numéro

d'accès sur VectorBase : AGAP005128). Le logiciel Mx Pro 3000P intégré à la machine TaqMan a été également utilisé pour l'analyse des données.

II.2.4. Analyse du polymorphisme des gènes surexprimés et associés à la résistance à la perméthrine chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

En raison du contexte actuel de fixation (fréquence des allèles de résistance dans une population de moustiques comprise entre 90% et 100%) de la résistance aux pyréthrinoïdes, il était difficile d'obtenir suffisamment d'échantillons de moustiques sensibles provenant des zones de collecte pour effectuer une analyse comparative entre les spécimens résistants et sensibles. Pour contourner ce problème, le polymorphisme des gènes surexprimés a été évalué en comparant les moustiques hybrides issues du croisement entre les moustiques résistants de terrain et ceux sensibles de laboratoire. Pour mieux comprendre les facteurs de régulation et les variations alléliques responsables de la surexpression des gènes de détoxification, les régions promotrices (portions régulatrices non-codantes du gène) ainsi que leur région génique complète ont été amplifiées, séquencées, puis comparées. Cette analyse a été réalisée à partir de moustiques présentant des phénotypes hyper-résistants et hypersensibles à la perméthrine, en se concentrant sur deux des gènes les plus surexprimés.

II.2.4.1. Sélection des souches de moustiques hypersensibles et les hyper-résistants

La sélection des souches de moustiques a été faite en réalisant des croisements entre les moustiques mâles sauvages et les moustiques femelles sensibles de références comme décrit par Wondji *et al.* (2007) et Cattell *et al.* (2020). Cette approche vise à générer une souche de moustiques ayant un background génétiquement similaire, et possédant tous les génotypes (RR [homozygote résistant], RS [hétérozygotes] et SS [homozygotes sensibles]) pour un gène donné. Ainsi, deux souches de références sensibles à toutes les classes d'insecticides testées et entretenues dans les conditions d'élevage appropriées ($T^{\circ}C = 25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ et $HR = 70\% \pm 10\%$) à l'insectarium du CRID ont été utilisées. Il s'agit de *Anopheles coluzzii* Ngouso (Harris *et al.*, 2010) du Cameroun et de la souche *Anopheles gambiae* Kisumu (<https://lite.lstmed.ac.uk/lite-facilities/lite-insectaries/anopheles-gambiae-kisumu>) du Kenya.

Pour les moustiques sauvages, sur la base des identifications moléculaires décrites précédemment au paragraphe II.2.2.1., les femelles sensibles Ngouso ont été croisées avec les mâles sauvages de Ngouso pour *A. coluzzii*, et les moustiques sauvages de Nkolondom pour *A. gambiae*. Pour réaliser ces croisements, les nymphes de chaque taxon ont été collectées individuellement dans des tubes Falcon (15 ml) contenant 1 ml d'eau de source, afin d'éviter tout accouplement après l'émergence. Par la suite, les moustiques mâles et femelles obtenus après émergence ont été séparés en fonction du sexe, puis acclimatés dans des cages préalablement étiquetées (mâles de *A. coluzzii* de terrain et femelles sensibles Ngouso, mâle

de *A. gambiae* de terrain et femelle sensible Kisumu). Pour chaque espèce, environ 200 femelles collectées sur le terrain et issues des émergences individuelles ont été introduites dans une cage contenant environ 200 mâles sensibles pour le croisement. Deux à trois jours après, les femelles ont reçu un repas de sang provenant d'un lapin non infecté pour la maturation des œufs. Un pondeur a été introduit dans la cage afin de recueillir les œufs produits par les femelles gravides ; les œufs ont été incubés pendant deux jours, puis ensuite trempés dans un bac contenant de l'eau de source pour l'éclosion des larves. Les larves de stade L1 qui émergent ont été nourries tous les matins avec de la farine pour alevins (TétraMin® « Baby ») jusqu'à l'obtention des larves de stade L4, suivant la description d'élevage décrit au paragraphe II.2.1.. Les nymphes issues du développement larvaire ont été triées tous les matins, puis isolées dans des boîtes contenant l'eau de source et introduite dans une cage pour l'émergence des adultes de génération F1. Les individus F1 se sont reproduits librement pendant au moins 5 jours dans les conditions d'élevage ($T^{\circ}C = 25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ et $HR = 70\% \pm 10\%$) afin de générer des individus F2. L'élevage s'est poursuivi jusqu'à l'obtention de la 4^{ème} génération (F4). Les adultes qui y ont émergé ont été nourris avec un coton imbibé d'une solution de sucrose à 10 % (préparer tels que décrits dans le paragraphe II.2.1.), placée au-dessus de la cage.

Une fois la F4 obtenue, les femelles âgées de 2 à 5 jours ont été séparées sur la base de leur phénotype de résistance après exposition à la perméthrine à une dose discriminante de 0,75 % (1×) suivant le protocole de l'OMS (WHO, 2018). A la seule différence du protocole standard, deux temps d'exposition différents ont été utilisés : 15 minutes et 90 minutes. Ces temps d'exposition ont été choisis pour tuer respectivement environ 20 % et 80 % de la population. Après une période de 24 heures post-exposition, les individus morts à 15 minutes d'exposition à la perméthrine ont été considérés comme hypersensibles (S₂₀) et ceux ayant survécu à une exposition de 90 minutes ont été considérés comme hyper-résistants (R₉₀). Ces individus S₂₀ et ceux R₉₀ ainsi que ceux sensibles de références ont été conservés séparément dans des tubes contenant du silicagel (les morts) et du « RNAlater » (les survivants) en vue des analyses moléculaires ultérieures. L'identité des différents individus a été confirmée à l'échelle moléculaire, puis les mutations de type « kdr » ont été mises en évidence à partir d'un échantillon de 30 moustiques (10 sensibles de laboratoire en fonction de l'espèce testée, 10 S₂₀ et 10 R₉₀) tel que décrit dans les paragraphes II.2.3.1.3..

II.2.4.2. Amplification et séquençage des gènes surexprimés et de leurs régions promotrices dans les différents échantillons de moustiques

Pour chaque espèce de moustiques, les gènes surexprimés ainsi que leurs régions promotrices ont été amplifiés à partir d'un échantillon de 10 ADNg individuels par groupe de moustiques (les moustiques sensibles de laboratoire, les S₂₀ et les R₉₀), à l'aide du kit

amplification Kapa (KAPA Biosystems, Qiagen, Valencia, CA, USA). Les amorces spécifiques à chaque gène ont été conçues sur la base du génome de référence d'*Anopheles gambiae* sur VectorBase(<https://vectorbase.org/vectorbase/app/>), en utilisant le logiciel en ligne Primer3 (v4.0.0 ; <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), dans le but d'amplifier un fragment d'environ 1 000 paires de bases de la région promotrice d'une part, et de la région génique complète d'autre part. A cet effet, les réactions ont été réalisées dans un volume final de 15 µL contenant : 1 µl d'ADNg (10 ng/µl), 1,5 µL de tampon KapaA10X, 0,75 µl de 25 mM de MgCl₂, 0,12 µL de 25 mM de dNTPs, 0,51 µL de 10 mM de chaque amorce (0,51 µL*2), 0,04 UI/µL de Taq polymérase Kapa et 10,49 µl d'eau stérile. Les conditions du thermocycleur des deux régions ont été les mêmes pour *A. coluzzii* et *A. gambiae* ; toutefois la température d'hybridation était différente en fonction de la région et du gène considérés. En résumé, les conditions du thermocycleur ont été successivement les suivantes : une dénaturation initiale de 95 °C pendant 5 minutes, 35 cycles de 30 secondes à 94 °C, 2 minutes à la température d'hybridation des amorces utilisées, 1 minute et 30 secondes à 72 °C, et finalement 10 minutes à 72 °C et un arrêt à 10 °C. Après la migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5 % et supplémenté avec 1 µl de Midori Green, 10 µl de chaque produit d'amplification ont été purifiés, en utilisant respectivement le kit de purification QIAquick® PCR et/ou ExoSAP-IT™ (Shrimp Alkaline Phosphatase, New England Biolabs, USA), suivant les instructions du fabricant. Les amplicons purifiés ont ensuite 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 de GENEWIZ en Angleterre (ABI 3130 XL Genetic Analyseur, Applied Biosystems).

Les séquences brutes issues du séquençage des gènes cibles ainsi que celles de leurs régions promotrices ont été visualisées à l'aide des logiciels Chromas, version 2.6.5 (Technelysium, 2018) et BioEdit, version 7.0.5.3 (Hall, 1999). Cette action a consisté les chromatogrammes via l'utilisation du fichier avec l'extension *.ab. Les séquences de bonne qualité ont présenté des pics distincts, lisses, tandis que celles de mauvaise qualité ont montré des chevauchements, des pics irréguliers ou contenant de larges pics, qui peuvent être dus à des produits PCR multiples ou à un mauvais appariement des amorces (figure 11). Les lectures de mauvaise qualité en début et à la fin de chaque séquence ont été coupées et les séquences restantes ont été alignées avec les séquences de références publiées dans VectorBase de GenBank, provenant d'une souche PEST d'*Anopheles gambiae* pour les gènes considérés, à l'aide de la fonction ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Dans le cas où des polymorphismes étaient observés, le nucléotide a été remplacé par le code ambigu du nucléotide correspondant (annexe 2). Comme les séquences ont été obtenues à partir de la région génomique diploïde, toutes les séquences préalablement alignées dans BioEdit, version 7.0.5.3 ont été mises en phase

haplotype en utilisant le module « Unphase/genotype : Data » du logiciel DnaSP 6 (Rozas *et al.*, 2017).

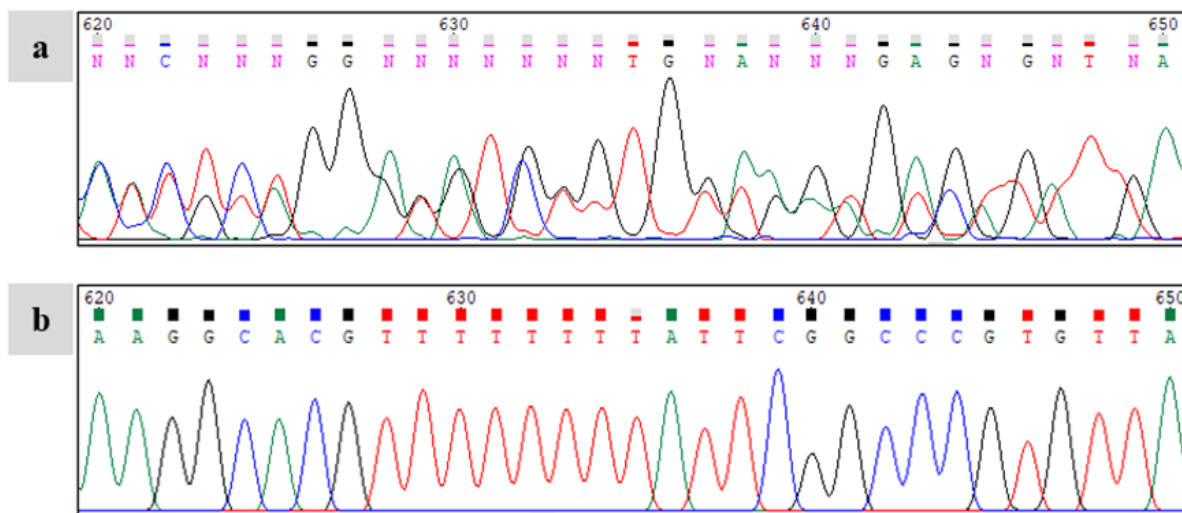


Figure 11 : Exemple de chromatogramme généré par le séquenceur automatique

Légende : (a) séquence de mauvaise qualité, (b) séquence de bonne qualité. En vert : Adénine, bleu : Cytosine, noir : Guanine, rouge : Thymine.

L'analyse comparative des séquences ainsi obtenues a permis comprendre la diversité génétique entre les moustiques hyper-résistants et ceux hyper-sensibles. Les différentes mutations (substitutions de nucléotides, des insertions et des délétions) qui présentant des fréquences d'occurrence élevées après analyse comparée des séquences pour les spécimens de souches R₉₀, S₂₀, chez *A. coluzzii* et *A. gambiae*, ainsi que des souches sensibles de référence, ont par la suite été utilisées pour mettre sur pieds des tests diagnostiques.

II.2.4.3. Identification *in silico* des motifs et des sites de liaisons des facteurs de transcription des régions promotrices des gènes surexprimés et polymorphisme des gènes surexprimés

Des études antérieures ont montré que la conservation des séquences de différentes espèces animales peut être utilisée pour prédire les sites de liaisons des facteurs de transcription fonctionnels (Wilding, 2018 ; Ingham *et al.*, 2021). La recherche des motifs constitutifs des régions promotrices des gènes surexprimés et l'identification des sites potentiels de liaisons des facteurs de transcription ont été effectuées à l'aide des algorithmes informatiques (*in silico*). Cela a été réalisé en comparant les séquences d'ADN des souches sensibles de référence à celles des moustiques sensibles S₂₀ et des résistants R₉₀ précédemment obtenues.

Pour cela, le logiciel en ligne GPMiner (Lee *et al.*, 2012) a été utilisé pour prédire le nombre et la position des TATA box, CCAAT box et GC box, motifs constitutifs des régions promotrices. En revanche, le logiciel ALGGEN Promo, dont les matrices de poids positionnels

sont construites à partir de TRANSFAC (Farré *et al.*, 2003), a été utilisé pour rechercher le nombre de sites de liaisons des facteurs de transcriptions connus dans la régulation des gènes, tels que AhR (« récepteur d'hydrocarbure aryle »)/Arnt (« translocateur nucléaire du récepteur d'hydrocarbure aryle »), Nrf-2 (« facteur nucléaire lié à l'érythroïde 2 »)/Maf (« protéine de fibromatose de l'aponévrose musculaire »), Keap-1 (« protéine associée à ECH de type Kelch ») (Mohammed *et al.*, 2014 ; Wilding, 2018).

II.2.5. Développement d'outils diagnostiques à base d'ADN pour les gènes surexprimés et association avec le phénotype de résistance chez *Anopheles gambiae*

Afin de discriminer les mutations identifiées par l'analyse du polymorphisme dans les souches de terrains (F₀), les souches hyper-résistantes R₉₀ et souches hyper-sensible S₂₀, l'outil en ligne PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/>) a été utilisé pour concevoir les différentes amorces nécessaires aux analyses par PCR-RFLP et PCR-AS.

II.2.5.1. Conception des PCR-RFLP pour le génotypage des mutations des régions promotrices des gènes *CYP6M2* et *CYP6P4*, et dans le locus du gène *CYP6P4*

Des « Polymorphisme de longueur des fragments de restriction » (RFLP-PCR) ont été réalisées pour discriminer les substitutions suivantes : (i) Adénine/Guanine en position 616 de la région promotrice du gène *CYP6M2*, (ii) Adénine/Thymine en position 273 de la région promotrice du gène *CYP6P4* et (iii) Cytosine/Thymine en position 3 du codon 144 des acides aminés du locus *CYP6P4*. Pour cela, des paires d'amorces spécifique, présentées au tableau VI ci-après, ont été conçues pour amplifier des portions partielles de la région spécifiques des gènes susmentionnés, contenant des sites de restrictions reconnus par des enzymes de restrictions spécifiques : BsrDI pour la région promotrice de *CYP6M2*, PvuII pour la région promotrice de *CYP6P4* et EagI pour le locus *CYP6P4* (tableau VI).

Tableau VI : Séquences d’amorces, températures d’hybridation et enzymes de restriction utilisées dans la conception des tests diagnostiques révélés par PCR-RFLP

Noms des amorces	Séquences d’amorces (5’ à 3’)	T°C d’hybridation	Tailles attendues	Enzymes de restriction	T°C d’incubation
6m2p-sens	GAAGCCGATGCTTG	58°C	545 paires de bases	BsrDI (A *CAATGN N)	65°C pendant 2h
6m2p-antisens	AGATAAGA CGTGTGTGTCAGGA TGAGTT				
6p4p1-sens	TCGATCCGAAATCG	58°C	548 paires de bases	PvuII (CA *GCTG)	37°C pendant 3h
6p4p1-antisens	TTCATACTC TTGATGGTGTGAG				
6p4full1-sens	GCGCATGAAAGCTA	67°C	616 paires de bases	EagI (CGGT *CG)	37°C pendant 3h
6p4full1-antisens	GGGAT GCCAGCTCGTTCAT CGTCAG				

6m2p : région promotrice du gène *CYP6M2*, 6p4p1 : région promotrice du gène *CYP6P4*, 6p4full1 : locus *CYP6P4* ; * représente la position de la base azotée mutée.

Ces sites de restriction identifiés, à l’aide du logiciel en ligne NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), dans les séquences des souches R₉₀ étaient presque absents dans les séquences des souches de moustiques sensibles en raison des différentes substitutions nucléotidiques. La PCR proprement dite a été réalisée à l’aide du kit Kapa Taq, en utilisant 2 µL d’ADN génomique comme matrice, dans un milieu réactionnel de 15 µL contenant 1,5 µL de tampon Kapa A 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,12 µL de dNTPs 25 mM, 2*0,51 µL pour chaque amorces (en fonction de la région cible : tableau VI), 0,12 µL d’ADN polymérase Kapa Taq et 9,49 µL d’eau stérile (ddH₂O). Après une dénaturation initiale de 95 °C à 3 minutes, 35 cycles d’amplification ont été réalisés (94 °C à 30 secondes, une température d’hybridation variant en fonction de la région considérée du gène à 30 secondes, 1 minute à 72 °C), suivis d’une élongation finale de 72 °C à 10 minutes dans un thermocycleur de marque BIOER Gene touch (« Applied Biosystems »). Par la suite, 5 µL du produit PCR obtenu ont été digérés en ajoutant 1 µL de 10X NEBuffer 2.1, 0,25 µL de 2 U d’enzyme de restriction spécifique et 3,8 µL de ddH₂O. La température et le temps d’incubation ont varié en fonction de l’enzyme de restriction utilisée tel que présenté dans le tableau VI. Les produits digérés ont migré sur un gel d’agarose à 2 % coloré avec du Midori Green et ont été visualisés à l’aide d’un système d’imagerie sur gel pour confirmer la taille des produits.

II.2.5.2. Conception des PCR-AS pour le génotypage des allèles A392S-CYP6M2 et C168S-CYP6P4 des gènes *CYP6M2* et *CYP6P4*

Des PCR allèles spécifiques (AS-PCR) ont été réalisées pour discriminer les allèles Alanine/Sérine en position 1 du codon 392 des acides aminés du locus *CYP6M2*, et les allèles Cystéine/Sérine en position 1 du codon 168 des acides aminés du locus *CYP6P4*, selon la méthode décrite par Tchouakui *et al.* (2019). Pour cela, des paires d'amorces externes, présentées au tableau VII, ont été utilisées pour amplifier les régions partielles des gènes cibles contenant la mutation d'intérêt. Par la suite, des amorces spécifiques internes (tableau VII) ont été conçues manuellement pour correspondre à la mutation considérée. Afin d'améliorer sa spécificité, un nucléotide désapparié supplémentaire a été ajouté au 3e nucléotide à partir de l'extrémité 3' de chaque amorce interne.

Tableau VII : Séquences d'amorces utilisées et les tailles attendues dans la conception des outils diagnostiques révélés par PCR-AS

Noms des amorces	Séquences d'amorces (5' à 3')	T°C d'hybridation	Taille attendue
6m2.f-sens	TGATGAGCAAAGACGGAGAGAAGT	48 - 50°C	642 paires de bases
6m2.f-antisens	CATACCGAATCGCAGCCCAAC		
6m2_A392-sens	CGGTACGAAATCCGTCTGGt*GG		527 paires de bases
6m2_392S-antisens	GGATCATGACGGCTGTACCc*GA		
6p4-full1-sens	GCGCATGAAAGCTAGGGAT	56 - 58°C	1000 paires de bases
6p4-full1-antisens	GCCAGCTCGTTCATCGTCAG		
6p4_502T-sens	CTTGAAGTATATGAACGAGCT*CT		614 paires de bases
6p4_502A-antisens	CCTTCATCTCAATCTCGCGGTGc*CT		

Légende : * représente un nucléotide désapparié ; 6m2.f : locus *CYP6M2* ; 6m2.f (sens et antisens) : amorces externes pour le gène *CYP6M2* ; 6m2_A392 et 6m2_392S : paires d'amorces internes ; 6p4-full1 : locus *CYP6P4* ; 6p4-full1 (sens et antisens) : amorces externes pour le gène *CYP6P4* ; 6p4_502T et 6p4_502A : sont des paires d'amorces internes.

La PCR a été réalisée dans un milieu réactionnel de 15 µL contenant contenant : 2*0,3 µL pour chaque amorce externe (en fonction de la région cible : tableau VII), 2*0,6 µL pour chaque amorce interne (en fonction de la région cible : tableau VII), 1,5 µL de tampon Kapa A 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 25mM, 0,12 µL de dNTPs mM, 0,12 µL d'ADN polymérase Kapa Taq et 9,71 µL d'eau stérile (ddH₂O). Les paramètres de la PCR étaient les suivants : un cycle initial à 95 °C pendant 5 minutes, suivi de 30 cycles [94 °C pendant 30 secondes, température d'hybridation variable selon l'allèle du gène à 30 secondes (cf. tableau VII), puis 72 °C pendant 1 minute], et une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. Le produit PCR a été séparé

sur un gel d'agarose à 2 % coloré avec du Midori Green, et la taille des produits a été confirmée à l'aide d'un système d'imagerie.

II.2.5.3. Evaluation des outils diagnostiques et relation avec le phénotype de la résistance

Pour évaluer les essais décrits dans les paragraphes II.2.5.1 et II.2.5.2, un minimum de 30 spécimens F₄ d'*A. gambiae*, issus du croisement entre une souche sauvage de Nkolondom résistante à la perméthrine, et une souche sensible de référence, ont été génotypés. Par la suite, les fréquences obtenues ont été corrélées avec le phénotype de résistance établi à l'aide du rapport de côtes et du test exact de Fisher (Kwiatkowska *et al.*, 2013).

II.2.6. Exploitation et analyses des données

Toutes les données concernant les tests de sensibilité, les niveaux d'expression différentiels des gènes, les paramètres de diversité génétique ainsi que les fréquences génotypiques obtenues après génotypage des mutations cibles ont été saisies dans un tableur Excel (version 2019). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels R Studio (version 1.4.1106) et GraphPad Prism (version 8.00, La Jolla, Californie, USA, www.graphpad.com), avec un niveau de confiance de 95 %.

II.2.6.1. Analyses des données des tests de sensibilité des moustiques aux insecticides et du niveau d'expression différentielle des gènes sélectionnés

Les taux moyens de la mortalité des moustiques due à une exposition aux insecticides (test en tubes et en cônes) ont été calculés à l'aide du tableur Excel. Le test du Khi-deux a été utilisé pour comparer les taux de mortalité entre les moustiques exposés aux insecticides seuls et ceux exposés aux insecticides après exposition aux synergistes PBO, mais également les taux de mortalité entre les moustiques exposés à différents types de moustiquaires.

Le test de Pearson a été utilisé pour estimer la corrélation entre les taux moyens de mortalité des moustiques sauvages et l'année de collecte, mais aucune corrélation significative n'a été trouvée. Les taux moyens de mortalité ont donc été calculés par saison sur deux années consécutives. Ce test a également permis d'évaluer la relation entre les niveaux d'expression des gènes et les saisons. Dans la zone urbaine, une analyse multivariée a été effectuée par saison pour évaluer la variation du profil de résistance entre les années.

Pour chaque espèce de moustiques, le test de t de Student a été utilisé pour comparer la proportion de surexpression relatifs (FC) de chaque gène. Les comparaisons ont été effectuées entre les spécimens contrôles (non-exposés : C) et les souches de moustiques sensibles (S) d'une part, et entre les spécimens résistant (R) et les souches de moustiques sensibles (S) d'autre part.

II.2.6.3. Cartographie des polymorphismes

Les paramètres de polymorphisme de l'ADN, tels que le nombre d'haplotypes distincts (h) par population, le nombre de sites polymorphes (s), la diversité haplotypique (dh), la diversité nucléotidique (π), le nombre de mutations synonymes (sym) et non-synonymes ($Nsym$) ont été évalués avec le logiciel DnaSP version 6 (Rozas *et al.*, 2017). Ces indices ont été utilisés pour estimer l'histoire démographique d'une population cible. Ainsi :

- de faibles valeurs de dh et de π indiquent un goulot d'étranglement démographique sévère et prolongé ;
- de fortes valeurs de dh et de π signalent que la population cible est stable avec une grande taille effective ;
- une forte valeur de dh et une faible valeur de π signalent une croissance rapide de population à partir d'une population ancestrale de faible effectif, où le temps n'a pas été suffisant pour retrouver une forte diversité d'haplotypes (bottleneck éphémère dans une large population ancestrale) ;
- une faible valeur de dh et une forte valeur de π signifient qu'il y a eu une chute drastique de l'effectif de la population considérée à l'origine de l'élimination d'un grand nombre d'haplotypes sans nécessairement affecter la diversité nucléotidique.

Les valeurs de ces indices sont considérées comme faibles lorsqu'elles sont inférieures à 0,5. Les tests de neutralité Tajima D (Tajima, 1989) et le D^* de Fu et Li (Fu & Li, 1993) ont été utilisés pour évaluer la direction de la pression de sélection sur un fragment des gènes surexprimés, qui peut être positive, négative ou neutre. La sélection positive se produit lorsque des mutations avantageuses se produisent dans une population et s'étendent dans la population. La sélection négative se produit lorsqu'il y a un retrait sélectif des mutations néfastes dans la population. La sélection neutre se produit lorsque la diversité génétique à un locus particulier est maintenue en sélectionnant plusieurs allèles de la région. L'indice de Tajima D a été calculé comme la différence entre le nombre moyen de différences deux à deux dans toutes les combinaisons de séquences (diversité nucléotidique : π) et l'indice Thêta (θ). Thêta (θ) est défini comme $4Nm$ pour un gène autosomal d'un organisme diploïde (où N est la taille effective de la population [individus diploïdes], et m le taux de mutation par séquence d'ADN par génération [par phénotype]). Les deux indices sont des indicateurs de la variation génétique. L'indice de Tajima D est utilisé pour évaluer la sélection. Ainsi :

- si $\theta \approx \pi$ et $D \approx 0$, cela implique qu'il y a une sélection neutre ;
- si $\theta > \pi$ et $D < 0$, cela implique qu'il y a une sélection positive ;
- enfin si $\theta < \pi$ et $D > 0$, cela implique que la sélection est équilibrante.

Les tests de neutralité D^* et F de Fu et Li sont similaires à la statistique de Tajima D mais elles sont surtout basées sur le nombre variable de singletons (une variante rare pour laquelle la variation génétique est portée par un chromosome unique dans un échantillon). Une valeur négative de D^* de Fu et Li indique un excès de singletons qui donnerait également une valeur de Tajima D négative, par contre une valeur positive indique un manque de singletons, qui donne le plus souvent, mais pas toujours, une valeur Tajima D positive. Le test D^* de Fu et Li est plus sensible aux balayages sélectifs que le Tajima D , en raison de l'excès de singletons généré par le balayage sélectif.

II.2.6.3. Analyses phylogénétiques

Les relations généalogiques entre haplotypes des gènes cibles ont été évaluées sur la base de réseau d'haplotypes, construits à l'aide du logiciel PopART (Population Analysis with Reticulate Trees), version 1.7 (Leigh & Bryant, 2015). Les réseaux d'haplotypes représentent une application de la méthode des liens médians pour montrer les relations phylogénétiques entre les différents haplotypes. Un réseau minimum d'haplotypes est représenté par des nœuds (cercles) et des branches (liens) reliant ces nœuds, où chaque nœud est connecté aux autres pour illustrer les relations entre les différents haplotypes. Les liens constituent le nombre de pas mutationnels qui séparent les différents nœuds. Les relations phylogénétiques entre les séquences des spécimens de phénotypes résistants et d'autres de phénotypes sensibles ont été évaluées chez *A. coluzzii* et *A. gambiae*. Ces séquences ont été utilisées pour construire les arbres phylogénétiques pour chaque gène à l'aide le logiciel MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Avant de construire l'arbre, le type de modèles à effectuer a été sélectionné sur la base des critères d'informations Bayésiennes (BIC) et Akaike corrigé (AICc), le modèle présentant les plus petits scores pour ces deux indices a été adopté. Dans ces modèles, un arbre initial est d'abord construit à l'aide d'une méthode rapide mais sous optimale ; la longueur de ses branches est ajustée pour maximiser la probabilité de l'ensemble de données pour la topologie de l'arbre selon le modèle d'évolution choisi. La robustesse des nœuds a été évaluée en utilisant la méthode *Bootstrap* au seuil de 1000 répliques.

II.2.6.4. Analyse des données du génotypage des mutations testées chez *Anopheles gambiae*

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 de spécimens testés ; elle est exprimée en pourcentages. Selon De Meeûs (2012), la fréquence allélique (F_a) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$F_a = \frac{2(X) + 1(Y)}{2N}$$

Où **F_a** : fréquence allélique ; **N** le nombre total d'individus examinés ; **X** est le nombre d'individus de génotype homozygote pour l'allèle concerné ; **Y** le nombre d'individus hétérozygotes.

Les fréquences génotypiques et alléliques ont été comparées à l'aide du test exact de Fisher. Le niveau d'association entre la présence d'une mutation et la capacité des spécimens à survivre en présence des insecticides a été estimé par le calcul du rapport de cotes entre les spécimens de phénotypes résistants et ceux de phénotypes sensibles.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Niveau de sensibilité aux insecticides et dynamique saisonnière de la sensibilité à la perméthrine des échantillons sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l.

Au total, 5 045 moustiques femelles adultes (à l'exception des témoins) issus de la collecte des stades immatures, et morphologiquement identifiés comme appartenant au complexe *Anopheles gambiae*, ont été testés (3 217 provenant de la zone urbaine, 1 918 provenant de la zone péri-urbaine) pour évaluer leur profil de sensibilité à différentes classes d'insecticides.

III.1.1.1. Niveau de sensibilité des moustiques sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides

Les résultats des tests biologiques exprimés en taux de mortalité observés pour l'ensemble de la période de collecte sont présentés dans le tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII : Niveau de sensibilité aux insecticides des spécimens sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. provenant des zones urbaine et péri-urbaine de Yaoundé

Insecticides	Zone urbaine			Zone péri-urbaine		
	N	Mortalité (% ± ES)	Statut	N	Mortalité (% ± ES)	Statut
DDT	164	9,21 ± 2,92	RC	112	0,00	RC
Bendiocarbe	-	-	-	65	85,97 ± 1,10	RC
Malathion	-	-	-	65	73,74 ± 3,53	RC
Perméthrine (1×)	976	8,87 ± 1,10	RC	571	9,07 ± 2,04	RC
Perméthrine (5×)	600	68,00 ± 4,44	RIMF	197	75,02 ± 3,49	RIMF
Perméthrine (10×)	493	87,47 ± 2,27	RIE	84	96,33 ± 2,49	RIE
PBO + Perméthrine (1×)	738	36,37 ± 2,90	RC	270	46,99 ± 9,13	RC
Deltaméthrine (1×)	246	20,41 ± 4,01	RC	252	14,67 ± 4,08	RC
Deltaméthrine (5×)	-	-	-	117	29,88 ± 6,83	RIMF
Deltaméthrine (10×)	-	-	-	83	78,50 ± 9,79	RIE
PBO + Deltaméthrine (1×)	-	-	-	102	79,38 ± 1,94	RC
Total	3 217	-	-	1 918	-	-

Légende : ES : erreur standard ; N : nombre total de spécimens testés ; RC : Résistant confirmée ; RIE : Résistance d'intensité élevée ; RIMF : Résistance d'intensité modérée à forte.

Il ressort de ce tableau VIII que les spécimens testés, quelle que soit la zone de collecte, sont résistants à tous les insecticides testés. Ainsi, en zone urbaine, une résistance confirmée au DDT (9,21 % ± 2,92 % de mortalité) et aux pyréthrinoïdes (perméthrine 1× : 8,87 % ± 1,10 %, deltaméthrine 1× : 20,41 % ± 4,01). En zone péri-urbaine, un profil similaire a été observé avec

une résistance confirmée au DDT (0% de mortalité), au bendiocarbe (85,97 % ± 1,10 %), au malathion (73,74 % ± 3,53 %) et aux pyréthriinoïdes (perméthrine 1× : 9,07 % ± 2,01, deltaméthrine 1× : 14,67 % ± 4,08 %).

Les tests biologiques d'intensité avec des doses de perméthrine et de deltaméthrine 5× et 10× supérieur à la dose discriminante ont montré que le taux de mortalité augmentait significativement avec la dose de l'insecticide, indépendamment de la zone testée (Tableau VIII). En zone urbaine, les moyennes de mortalités ont varié de 68 % ± 4,44 % pour la perméthrine 5× ($\chi^2 = 51,41$, dl = 1, $P < 0,001$) à 87,47 % ± 2,27 % pour la perméthrine 10× ($\chi^2 = 71,01$, dl = 1, $P < 0,001$) indiquant une résistance d'intensité élevée. En zone péri-urbaine, une résistance d'intensité élevée a également été enregistrée, avec des taux de mortalité variant de 75,02 % ± 3,49 % pour la perméthrine 5× ($\chi^2 = 57,97$, dl = 1, $P < 0,001$) à 96,33 % ± 2,49 % pour la perméthrine 10× ($\chi^2 = 96,33$, dl = 1, $P < 0,001$) et de 29,88 % ± 6,83 % pour la deltaméthrine 5× ($\chi^2 = 29,88$, dl = 1, $P < 0,001$) à 78,5 % ± 9,79 % pour la deltaméthrine 10× ($\chi^2 = 78,50$, dl = 1, $P < 0,001$).

Toutes les deux souches de référence utilisées à savoir la souche Ngouso de *Anopheles coluzzii* et la souche Kisumu de *A. gambiae*, se sont révélés sensibles à tous les insecticides, à l'exception du DDT (95% pour la souche Ngouso et 98% pour la souche Kisumu).

III.1.1.2. Dynamique saisonnière du niveau de sensibilité d'*Anopheles gambiae* s.l. à la perméthrine

La perméthrine a été choisie en raison de son niveau élevé de résistance et de son utilisation dans l'imprégnation des moustiquaires distribuées lors des premières campagnes de distribution massive des MIIs par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP). Ainsi, la moyenne des différentes valeurs de mortalité pour la perméthrine 1× (dose discriminante : 0,75%), 5× et 10× a été enregistrée et comparée par saison durant toute la période de collecte et présentées dans l'annexe 3 (page 156). De cette comparaison, une valeur du coefficient de corrélation significative (Pearson $r = 0,994$, $P = 0,006$) a été trouvée entre les taux de mortalité de l'année 2019 et ceux de l'année 2020, suggérant une variation faible dans le jeu de données utilisés. Par la suite, une analyse multivariée a été réalisée pour la petite saison sèche (PSS) qui présentait un ensemble complet de données sur les saisons des deux années de collecte (figure 12). Cette analyse a montré une différence non-significative de niveaux de résistance à la perméthrine entre les années 2019 et 2020 ($P = 0,47$), mais plutôt grande similitude (Pearson $r = 0,994$). La même observation a été faite ($P=0,79$) pour les taux de mortalité aux différentes concentrations de perméthrine testées entre les deux années.

La figure 12 ci-après illustre la variation saisonnière du taux de mortalité à la perméthrine, combinée pour deux années, et analysée comme un jeu de données. Il ressort de cette figure que les valeurs des taux de mortalité des moustiques provenant de la zone urbaine pour les différentes doses de la perméthrine variaient significativement entre les quatre saisons ($F = 33,92$, $P = 0.00$), montrant une implication probable de la saison dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii*. Ainsi, pour la dose discriminante 1×, le taux de mortalité le plus faible a été enregistré pendant la PSS, avec une mortalité de $2,1 \% \pm 0,73 \%$, suivi par ordre croissant de la GSS et de la PSP ; en revanche la valeur la plus forte a été observée pendant la GSP avec une mortalité de $18,9 \% \pm 1,52 \%$ (figure 12 a). Un résultat similaire a également été observé pour la perméthrine 5× et 10×, les mortalités les plus faibles ont été trouvées pendant la PSS ($54,4 \% \pm 7,84 \%$ et $81,2 \% \pm 3,41 \%$ respectivement), tandis que les valeurs les plus élevées ont été enregistrées pendant le GSS ($91,4 \% \pm 3,8 \%$ et 100% respectivement). De plus, pendant la GSP, le taux de mortalité à la perméthrine 10× a atteint $95,9 \% \pm 2,28 \%$ (figure 12), restant inférieur à 98 %. Pour les moustiques de la zone péri-urbaine, les données disponibles ont montré un taux de mortalité faible pendant la PSS pour la perméthrine 1× ($9,98 \% \pm 0,89 \%$), suivi par ordre croissant de la GSS et de la GSP (figure 12).

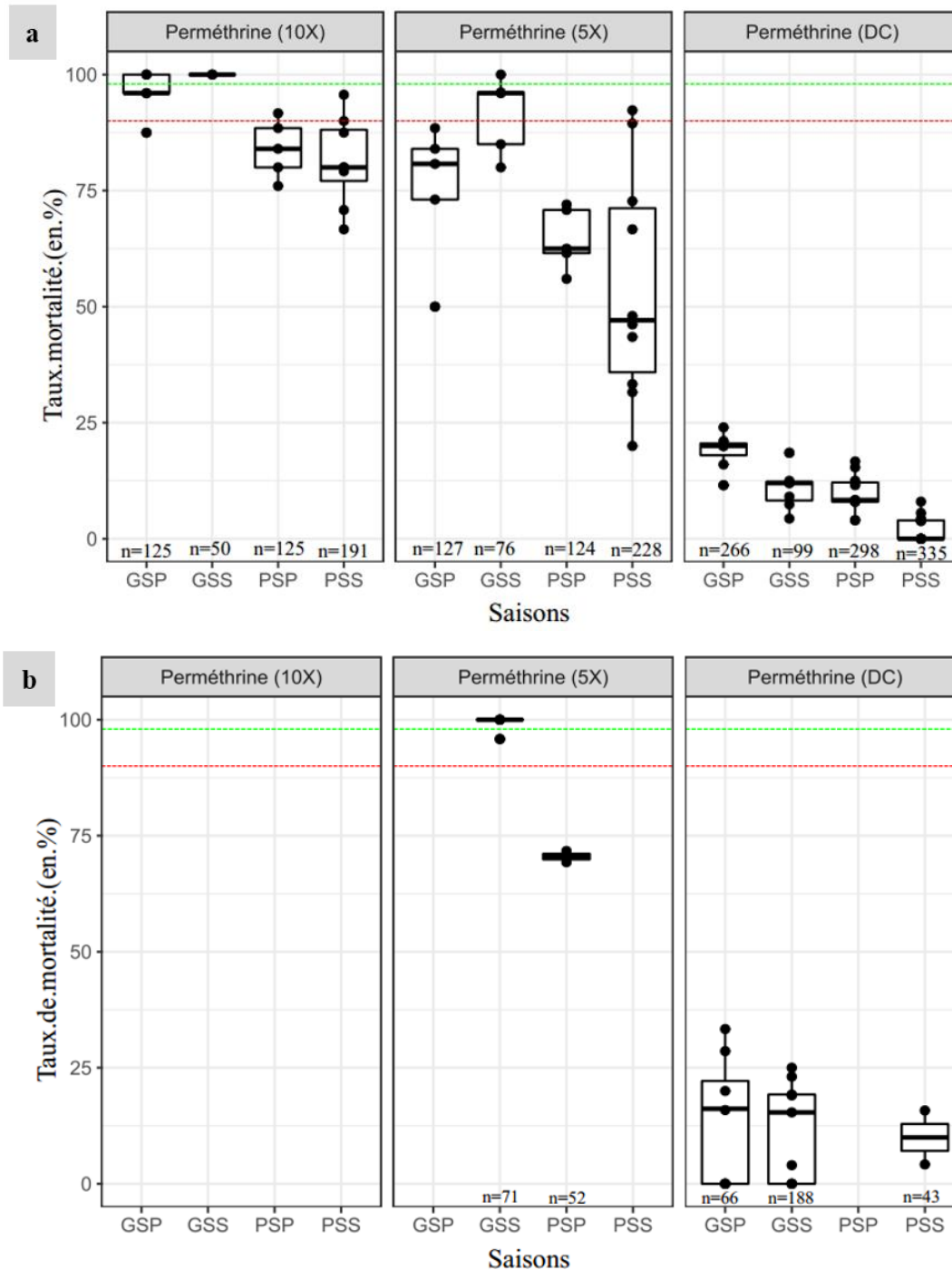


Figure 12 : Niveau de sensibilité des spécimens d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae* à la perméthrine en fonction des saisons aux différentes concentrations discriminantes de l'OMS

Légende : La ligne en vert représente la valeur seuil de sensibilité (98%) à l'insecticide testé et la ligne en rouge la valeur seuil de la résistance probable (88%) à l'insecticide testé. (a) Niveau de sensibilité des spécimens d'*A. coluzzii* ; (b) Niveau de sensibilité des spécimens d'*A. gambiae* ; DC : Concentration Discriminante 1× ; GSP : grande saison des pluies ; GSS : grande saison sèche ; PSP : petite saison des pluies ; PSS : petite saison sèche ; X : multiplicateur.

III.1.1.3. Bio-efficacité des moustiquaires commercialisées sur les spécimens sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l.

Le tableau IX présente les niveaux d'efficacité des différentes moustiquaires testées ; ces niveaux ont varié significativement d'un type à un autre, indépendamment de la zone de collecte.

Tableau IX : Efficacités de deux types de moustiquaires sur les spécimens sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. provenant des zones urbaines et de celle péri-urbaine

Populations Moustiquaires	Souche Kisumu		Zone urbaine		Zone péri-urbaine	
	M ± ES (N)	P (F)	M ± ES (N)	P (F)	M ± ES (N)	P (F)
Perméthrine (Olyset®)	98 ± 0,00 (50)	0,32	13,68 ± 3,78 (50)	<0,0001	10,85 ± 1,52 (50)	<0,0001
PBO + Perméthrine (Olyset Plus ®)	100 ± 0,00 (50)	(1,00)	96,28 ± 1,52 (50)	(68,22)	93,33 ± 4,08 (50)	(67,47)

Légende : ES : erreur standard ; F : test exact F de Fischer ; M : taux de mortalité en % ; N : nombre total de spécimens testés ; P : valeur de la probabilité.

En zone urbaine, une faible efficacité a été notée pour la moustiquaire Olyset® à base de perméthrine, avec une mortalité de 13,68 % ± 3,78 %, contre 10,85 % ± 1,52 pour ceux de la zone péri-urbaine (tableau IX). En revanche, la moustiquaire dite de seconde génération Olyset Plus®, contenant un synergiste en plus de l'insecticide, a présenté une efficacité maximale sur les spécimens de moustiques testés (tableau IX), avec des valeurs moyennes de mortalité enregistrées supérieures au seuil de résistance suspectée (80 %), soit 96,28 % ± 1,52 % et 93,33 % ± 4,08 % respectivement pour les spécimens de la zone urbaines et ceux de la zone péri-urbaine.

III.1.2. Mécanisme et gènes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Un total d'environ 6 000 femelles adultes d'*Anopheles*, issues de la collecte larvaire ont été morphologiquement identifiées comme appartenant au complexe *Anopheles gambiae*. L'identification moléculaire par zone de collecte et par saison a révélé que les 240 moustiques testés et provenant de la zone urbaine (Etoa-Meki et Ngousso) étaient tous de l'espèce *A. coluzzii*, tandis que les 220 testés et provenant de la zone péri-urbaine (Nkolondom), étaient exclusivement de l'espèce *A. gambiae*. La figure 13 ci-contre présente une photographie d'un électrophorégramme permettant l'identification de ces deux espèces du complexe *A. gambiae*.

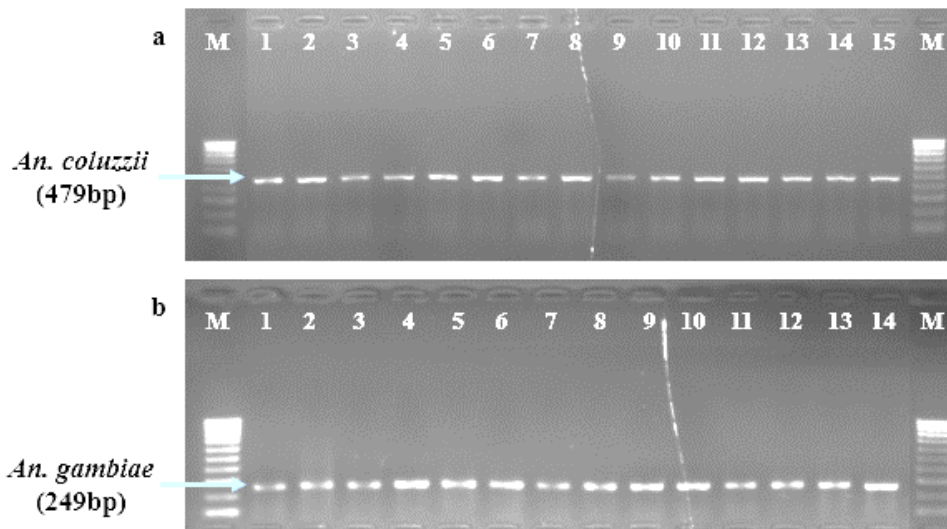


Figure 13 : Photographie des bandes révélées après migration des produits d'amplification du locus S200 X6.1 d'*Anopheles gambiae* s.l. sur un gel d'agarose 1,5%

Légende : M : marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases ; a : zone urbaine (Etoa-Meki, Ngoussou) ; b : zone péri-urbaine (Nkolondom) ; 1-16 : spécimens testés.

III.1.2.1. Niveau de sensibilité d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae* au pyréthrianoïde après une préexposition au synergiste PBO

Pour déterminer si la résistance observée pour les pyréthrianoïdes chez les populations de moustiques sauvage était génétique impliquant les membres de la famille des cytochromes P450, une préexposition aux synergiste PBO a été effectuée. Ces tests à la perméthrine ont révélé différents niveaux de restauration de la sensibilité des moustiques selon les saisons (cf. tableau X). Ainsi, chez *A. coluzzii* Ngoussou, où les valeurs de taux de mortalité avec le PBO ont été enregistrées pour la plupart des saisons, une restauration de la sensibilité des moustiques à la perméthrine a été observée avec des niveaux similaires pour la plupart des saisons (22,10 %, 21,90 % et 20,70 %), à l'exception de la GSS (52,30 %). La même tendance a été observée chez *A. gambiae* Nkolondom, bien que seules les valeurs des taux de mortalités de 3 saisons ont été enregistrées. Ces valeurs ont montré un recouvrement partiel de la sensibilité des moustiques à la perméthrine, avec des taux respectifs de 9,67 %, 11,30 % et 65,18 % respectivement (tableau X).

Tableau X : Niveau de sensibilité au synergiste PBO des spécimens d'*Anopheles coluzzii* Ngoussou et d'*Anopheles gambiae* de Nkolondom

Saisons	Insecticide	<i>Anopheles coluzzii</i> (Ngoussou)		<i>Anopheles gambiae</i> (Nkolondom)	
		N	Mortalité (% ± ES)	N	Mortalité (% ± ES)
GSS	Perm.	173	10,84 ± 1,70	210	11,75 ± 3,54
	PBO + Perm.	143	63,14 ± 5,04	138	76,93 ± 8,57
GSP	Perm.	170	18,95 ± 1,52	187	10,70 ± 5,04
	PBO + Perm.	141	39,65 ± 2,53	91	22,00 ± 6,09
PSS	Perméthrine	335	2,12 ± 0,73	43	9,98 ± 5,81
	PBO + Perm.	281	23,99 ± 1,68	41	19,65 ± 5,36
PSP	Perm.	298	9,73 ± 1,15	-	-
	PBO + Perm.	173	31,83 ± 1,74	-	-

Légende : ES = erreur standard ; N : nombre total de spécimens testés ; GSP : grande saison pluvieuse ; GSS : grande saison ; PSP : petite saison des pluies ; PSS : petite saison sèche ; PBO = Piperonyl de Butoxyde ; Perm. = Perméthrine.

III.1.2.2. Expression des gènes candidats impliqués dans la résistance métabolique chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Les profils d'expression de six des gènes candidats, à savoir : *CYP6M2*, *CYP6P3*, *CYP6P4*, *CYP6Z1*, *CYP6Z2*, *CYP9K1*, précédemment associés à la résistance métabolique chez *A. coluzzii* Ngoussou et *A. gambiae* Nkolondom, ont été évalués pendant la GSS et la GSP (où un grand nombre de moustique ont été collecté).

La figure 14 présente l'expression de ces différents gènes dans les populations sauvages d'*A. coluzzii* Ngoussou et d'*A. gambiae* Nkolondom. Il ressort de cette figure que le niveau d'expression de ces gènes de détoxification diffère d'une espèce à l'autre, d'une zone à une autre, mais également d'une saison à une autre (figure 14).

Ainsi, chez *A. coluzzii*, la comparaison des différents niveaux d'expression des gènes entre la saison de pluies et la saison sèche a montré que *CYP6M2*, *CYP6P4* et *CYP9K1* sont surexprimés pendant la grande saison des pluies et non pendant la grande saison sèche (figure 14 a). Un profil opposé a été noté pour le gène *CYP6Z2*. De plus, en comparant les niveaux d'expression entre les saisons, une différence significative a été observée *CYP6M2* (FC [saison de pluies] = 4,39 ± 0,49 vs FC [saison sèche] = 0,99 ± 0,09, $P = 0,0003$), *CYP9K1* (FC [saison de pluies] = 2,11 ± 0,30 vs FC [saison sèche] = 0,54 ± 0,02, $P = 0,0009$) et *CYP6Z2* (FC [saison de pluies] = 0,26 ± 0,007 vs FC [saison sèche] = 6,53 ± 0,82, $P = 0,0002$).

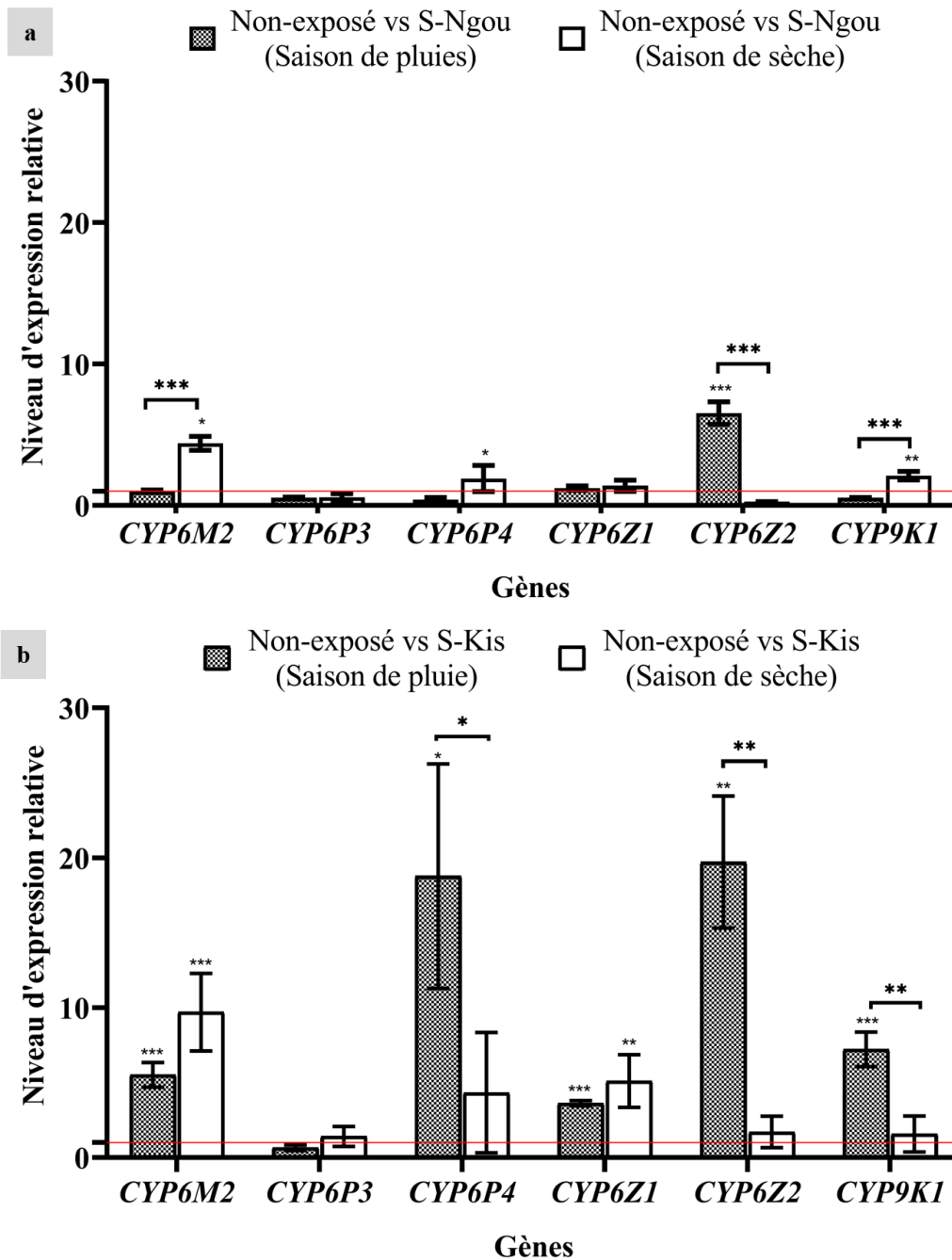


Figure 14 : Expression des gènes *CYP6M2*, *CYP6P3*, *CYP6P4*, *CYP6Z1*, *CYP6Z2*, *CYP9K1* chez les spécimens d'*Anopheles coluzzii* de Ngousso (a) et ceux d'*Anopheles gambiae* s.s de Nkolondom (b)

Légende : La ligne en rouge représente la valeur seuil du facteur de variation pour la souche sensible de référence pour chaque espèce. Les étoiles indiquent les degrés de signification : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Saison de pluie = GSP ; saison sèche = GSS.

Les spécimens d'*A. gambiae*, quant à eux ont présenté des niveaux de surexpression élevés pour les six gènes testés, avec des variations significatives pendant au moins l'une des deux saisons. En effet, pendant la saison des pluies, période où les populations mènent des activités agricoles intenses, les six gènes ont été significativement surexprimés, à l'exception du gène *CYP6P3*. Tandis que, pendant la saison sèche, seuls *CYP6M2*, *CYP6Z1* et *CYP6P4* ont

été les gènes significativement surexprimés (figure 14 b). Cependant, en faisant une comparaison des différents niveaux d'expression entre les saisons, *CYP6P4* ($FC_{\text{(saison de pluies)}} = 18,77 \pm 7,49$ vs $FC_{\text{(saison sèche)}} = 4,32 \pm 4,02$, $P = 0,04$), *CYP6Z2* ($FC_{\text{(saison de pluies)}} = 19,70 \pm 4,40$ vs $FC_{\text{(saison sèche)}} = 1,70 \pm 1,05$, $P = 0,002$) et *CYP9K1* ($FC_{\text{(saison de pluies)}} = 7,21 \pm 1,15$ vs $FC_{\text{(saison sèche)}} = 1,57 \pm 1,20$, $P = 0,004$) ont présenté des variations d'expression significatives.

Des études portant sur la caractérisation fonctionnelle des gènes *CYP6M2*, *CYP6P3*, *CYP6P4*, *CYP9K1* et *CYP6Z1* (cf. I.3.2.5) avaient déjà montré la capacité de ces gènes à dégrader au moins un type ou les deux types d'insecticides de la classe des pyréthrinoïdes. Ainsi, sur la base de ces résultats et de leur constance d'expression chez les spécimens d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae*, les gènes surexprimés *CYP6M2* et *CYP6P4* ont fait l'objet d'une étude approfondie dans la suite de cette étude.

III.1.2.3. Génotypage d'un fragment du gène canal sodium voltage-dépendant portant les mutations L1014F, L1014S et N1575Y chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Au total, 90 spécimens de chaque espèce ont été analysés pour la recherche des différentes mutations de types « kdr ». Parmi ces trois mutations recherchées, seule la mutation L1014F a été détectée à une fréquence très élevée dans tous les échantillons sauvages, avec des fréquences alléliques de 79% chez *A. coluzzii* non-exposés à la perméthrine et de 98% chez *A. gambiae*. De manière générale, aucune mutation L1014S ou N1575Y n'a été détectée dans les moustiques testés.

Chez les spécimens d'*A. coluzzii* ayant survécu à l'exposition à la perméthrine, seulement 4 individus (13,33%) étaient homozygotes sensibles (1014L/L), 6 (20,00%) étaient hétérozygotes (1014L/F), et 20 (66,67%) étaient homozygotes résistants (1014F/F). En revanche, aucun individu homozygote sensible (1014L/L) n'a été détecté chez les survivants à l'exposition au PBO + perméthrine, ni même parmi les individus morts (tableau XI). Chez les spécimens de l'espèce *A. gambiae*, seulement un homozygote sensible (12,50%) et 7 homozygotes résistants (87,50%) ont été recensés chez les individus morts suite à la suite de l'exposition au PBO + perméthrine. Par contre, chez les survivants au PBO + perméthrine, seuls deux (9,09%) hétérozygotes et 20 (90,91%) homozygotes résistants ont été trouvés (Tableau XI). Ces résultats confirment l'implication d'autres mécanismes de résistance chez ces moustiques.

Tableau XI : Effectifs des génotypes et fréquences alléliques de la mutation kdr-L1014F chez les spécimens sauvages d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae*

Espèces	Statuts de résistance des moustiques aux insecticides	Génotypes			Total	Fréquences alléliques	
		LL	LF	FF		L	F
<i>A. coluzzii</i>	Survivants à la perm.	4	6	20	30	0,23	0,77
	Survivants au PBO + Perm.	0	0	21	21	0,00	1,00
	Morts au PBO + Perm.	0	0	9	9	0,00	1,00
	Vivants non-exposés	0	4	26	30	0,07	0,93
	Total	4	10	76	90	0,10	0,90
<i>A. gambiae</i>	Survivants à la perm.	0	0	30	30	0,00	1,00
	Survivants au PBO + Perm.	0	2	20	22	0,05	0,95
	Morts au PBO + Perm.	1	0	7	8	0,12	0,88
	Vivants non-exposés	0	0	30	30	0,00	1,00
	Total	1	2	87	90	0,02	0,98

Légende : PBO = Piperonyl de Butoxyde ; Perm : perméthrine ; F = allèle résistant ; FF = homozygote résistant ; L = allèle sensible ; LF = hétérozygote ; LL = homozygote sensible.

III.1.3. Niveaux de diversité des gènes surexprimés associés à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

III.1.3.1. Caractérisation des souches d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae* hyper-résistantes et hypersensibles

Les tests biologiques effectués sur les populations naturelles d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae* ont confirmé leur résistance élevée à la perméthrine. Comme attendu, cette résistance à la dose discriminante de la perméthrine (perméthrine 1×) a considérablement diminué après le croisement, pour chaque espèce, des moustiques mâles résistants de terrain avec des femelles sensibles de références. Les ratios de résistance F₄ ont diminué respectivement de 6,81 fois et 6,27 fois pour *A. coluzzii* et *A. gambiae*. Par conséquent, une augmentation significative des moyennes des taux de mortalité a été observée, atteignant jusqu'à 60,43% ± 3,80% ($\chi^2 = 478,50$, degré de liberté = 1, $P < 0,0001$) pour *A. coluzzii* et jusqu'à 61,08% ± 6,92% ($\chi^2 = 138,88$, dl = 1, $P < 0,0001$) pour *A. gambiae*. Chez tous les spécimens ayant subi une exposition à la perméthrine 1× de 15 minutes, les valeurs moyennes des taux de mortalité étaient de 27,74% ± 3,49% pour *A. coluzzii* et de 26,64% ± 3,12% pour *A. gambiae* ; en revanche à 90 minutes, elles étaient de 74,66% ± 3,16% pour *A. coluzzii* et de 86,80% ± 2,62% pour *A. gambiae*. Les tests de sensibilité à la perméthrine 1× avec une préexposition au synergiste PBO ont également montré une restauration significative de la sensibilité bien que partielle chez tous les moustiques F₄ testés, avec un taux de mortalité s'élevant à 77,27% ± 0,00% ($P = 0,019$), soit un

recouvrement de 1,28% chez *A. coluzzii*, et à 86,24% ± 3,89% ($P < 0,0001$), qui peut se traduire par un recouvrement de 1,41% chez *A. gambiae*.

Les résultats portant sur le génotypage des mutations « kdr » chez les moustiques de la génération F₄, issus des différents croisements, ont révélé que seule la mutation kdr-1014F parmi les trois mutations *kdr* recherchées a été détectée et testée chez les espèces de moustiques cibles (tableau XII). Ainsi, une fréquence élevée de l'allèle résistant 1014F a été observée chez les spécimens R₉₀, atteignant 80% pour *A. coluzzii* et 84% pour *A. gambiae*. En revanche, une faible fréquence a été enregistrée chez les spécimens de S₂₀ des deux espèces de moustiques : 7% pour *A. coluzzii* et 16% pour *A. gambiae* (tableau XII).

Tableau XII : Effectifs des génotypes et fréquences alléliques de la mutation kdr-L1014F chez les moustiques de la génération F₄ issus des différents croisements

Espèces	Echantillons	Génotypes			Total	Fréquences alléliques	
		LL	LF	FF		L	F
<i>A. coluzzii</i>	F ₄ R ₉₀	0	12	18	30	0,20	0,80
	F ₄ S ₂₀	26	4	0	30	0,93	0,07
	Total	26	16	18	60	0,57	0,433
<i>A. gambiae</i>	F ₄ R ₉₀	0	0	30	30	0,00	1,00
	F ₄ S ₂₀	16	12	2	30	0,73	0,27
	Total	16	12	32	60	0,36	0,63

Légende : F = allèle résistant ; FF = homozygote résistant ; L = allèle sensible ; LF = hétérozygote ; LL = homozygote sensible ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Cependant, une association significative (cf. tableau XIII) a été observée entre la mutation *kdr*-L1014F et la résistance à la perméthrine 1×, avec un rapport de cotes de 53,14 (CI : 21,66 à 127,1, $P < 0,0001$, *test exact de Fisher*) pour *A. coluzzii* et de 27,56 (CI : 13,10 à 57,68, $P < 0,0001$) pour *A. gambiae*.

Tableau XIII : Association entre les génotypes au locus du *kdr*-L1014F et le phénotype de résistance à la perméthrine 1× des moustiques de la génération F₄ issus des croisements

Espèces	Génotypes et/ou allèles au locus <i>kdr</i> -1014F	Rapport de Côte	Intervalle de confiance	Valeur de P
A. <i>coluzzii</i>	FF vs FL	Infini	1,139 - infini	0,0392
	FF vs LL	Infini	82,24 - infini	<0,0001
	FL vs LL	Infini	13,28 - infini	<0,0001
	F vs L	53,14	21,66 – 127,10	<0,0001
A. <i>gambiae</i>	FF vs FL	33,33	5,23 – 359,20	<0,0001
	FF vs LL	Infini	136,7 - infini	<0,0001
	FL vs LL	Infini	11,92 - infini	<0,0001
	F vs L	27,56	13,10 – 57,68	<0,0001

Légende : F = allèle résistant ; FF = homozygote résistant ; L = allèle sensible ; LL = homozygote sensible ; LF = hétérozygote.

Afin de vérifier l’hypothèse d’une adaptation génétique ou physiologique des moustiques à une pression de sélection des insecticides, nous avons comparé les moustiques hyper-résistants et ceux hypersensibles a l’échelle du gène, avec un accent sur ceux qui étaient surexprimé.

III.1.3.2. Diversité génétique du gène *CYP6M2* chez les moustiques hyper-résistants et chez les hypersensibles, potentiels allèles de résistance

Des fragments de 1 020 et de 1 528 paires de bases de la région promotrice du gène et du locus *CYP6M2* ont été amplifiés et séquencés avec succès pour *A. coluzzii* et *A. gambiae*, à l’aide d’amorces spécifiques (annexe 4, page 157) à partir d’échantillons composé chacun de 30 moustiques (soit respectivement 10 individus de la souche R₉₀, 10 pour S₂₀ et 10 souches sensibles de référence). La figure 15 ci-après présente une photographie d’un électrophorégramme avec la présence de bandes dont les tailles correspondent à la région promotrice et au locus *CYP6M2*.

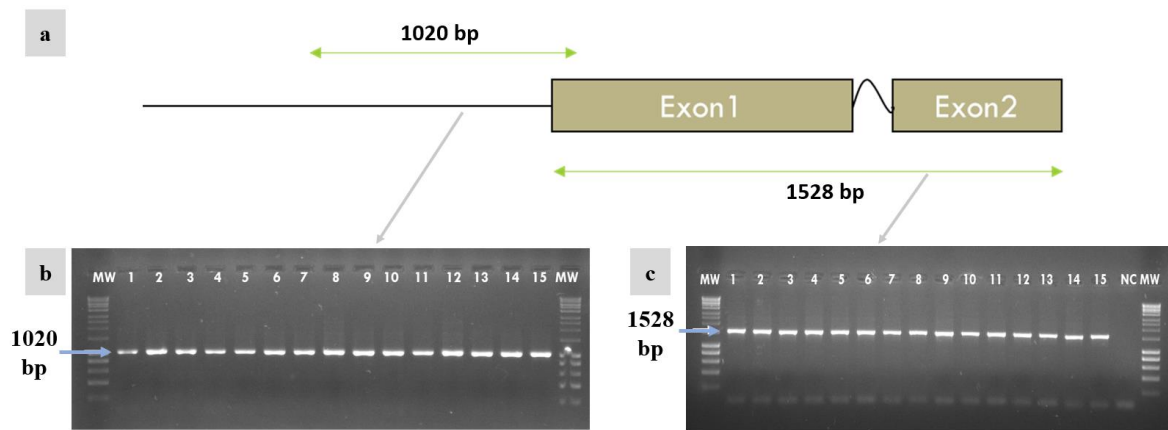


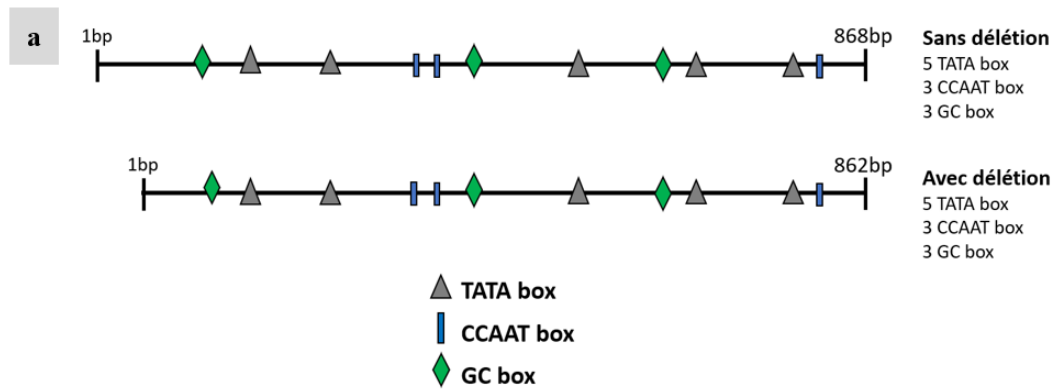
Figure 15 : Photographie des bandes révélées après migration des produits d'amplification de la région promotrice du gène *CYP6M2* et de son locus à partir des spécimens de *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Légende : (a) représentation schématique des portions du gène *CYP6M2* amplifiées et séquencées ; (b) bandes révélées après migration des produits d'amplification de la région promotrice et (c) de son locus du gène *CYP6M2*. 1-15 : différents spécimens testés ; MW : marqueur de taille (BIOLLONE Hyper Ladder I : 1 000 paires de bases) ; NC : témoin négatif.

III.1.3.2.1. Diversité génétique d'une portion de la région promotrice de *CYP6M2*

Pour l'évaluation de la diversité de la région promotrice du gène *CYP6M2*, une séquence de 932 paires de bases de la région promotrice a été alignée respectivement pour 20 spécimens d'*A. coluzzii* (soit 5 individus pour la souche R₉₀, 8 pour la souche S₂₀ et 7 pour la souche sensible de référence Ngousso), et 17 d'*A. gambiae* (8 individus pour la souche R₉₀, 6 pour la souche S₂₀, et 6 souches sensibles de référence Kisumu).

Dans le but d'identifier les motifs constitutifs et les potentiels sites de liaisons des facteurs de transcription de cette région promotrice du gène *CYP6M2* chez les deux espèces de moustiques cibles, des spécimens d'*A. gambiae* ont été utilisés comme modèle (figure 16). Après nettoyage et alignement des différentes séquences de moustiques, une insertion/délétion (InDel) de 8 paires de bases (TAGTTACT) a été identifiée. Cette InDel était associée à une mutation Guanine/Adénine (G/A) en position 616, présente sur 7 des 8 séquences des spécimens R₉₀ et chez 5 des 6 séquences des spécimens S₂₀. Toutefois, elle était absente dans toutes les souches sensibles Kisumu testées. *In silico*, la recherche des différents éléments constitutifs de la région promotrice du gène *CYP6M2* a révélé, chez ces deux espèces de moustiques, des boîtes TATA (9 dans les porteurs d'insertion et 6 dans les porteurs de délétion), des boîtes CCAAT (1 dans les porteurs d'insertion et 2 dans les porteurs de délétion), 1 boîte GC, et plusieurs sites de fixation des facteurs de transcription incluant 2 AhR/ARNT, 2 nrf2/MAF ainsi que plusieurs sites minoritaires pour GATA et MYB (figure 16 a et b).



b

>KIS 6m2Pr 4

CGACTGAGCTAGCCGGGCTGTTGATAACTGAGCCGCTCGTTTCACACCACGTTAG
 Maf:nrf2
 CTAACAGACAGCATGAGAGAGATCTTCATGCGCACACGTTTTGCGACGCATCACTGC
 GCAGCCGCAAGAAGGCAAGGGCGTCTAAAGGTAGATTGAAGCCGATGCTTGAGAT
 AAGAAAAAATCAGTTACAGTGTATTATTATTACCTAAAGATTGAATTATAGAGAA
 TAGCAGTTACTTAATCAATGTATGTAGTTACTTAATCATCTTACTTAATATTAT
 Maf:nrf2 Restriction site
 TACTGCATTATTTCATTATGATTCCTTTATCAATTTTTGCCCTCAAAGTCATTG
 (T)CCCTATCAATACTCACACCCCCAAAACGTAAGATTCTAACTCTTCGCG
 GATATTTACATATTACTCACCACATTCCTATGTTTGATCTACGCACACCCTTCTC
 TAACCCGCCCTCAACACCACAAGCTCAATTTGATACATTTCAAGATTATGCCTAT
 GTCATCGTTTCGCACCCCGTTCCTCATCGTTCACTTGGACCTTCTTCTAATCTTA
 TCTTTTTTATATTTTGTGCAAACGACTCATAGCACCCCCGGGAATACACCACG
 Maf:nrf2 Ahr:arnt
 CGGGACTCTTCACGGTGGGATCATGCTTACTTTATTGAGTACACACGCGCGAAC
 Maf:nrf2
 TATCAGCGTCGTCGCGCACCGTGAATGAAATCGTCAACTATCCTGACACACCG
 Ahr:arnt
 GAATTGGCGTGCGCTTGGCGCAAAAAGGTGCGATAAGATTGGACGAATGTGCA
 AAAAGAGGAGACTTGTTTTTTTTCTTCTAATTCGCCCTATAAAGAGAACCGGTT
 TGGGTGACCTCCACCATCAGTTGTGGTGGACAGTCAAATCATTGATCGTGGTG

>NK 6m2Pr HR6

CGACTGAGCTAGCCGGGCTGTTGATAACTGAGCCGCTCGTTTCACAGCACGTTAG
 Maf:nrf2
 GTAACAGACAGCATGAGAGATCTTCATGCGCACACGTTTTGCGACGCATCACTGC
 GCAGCCGCAAGAAGGCAAGGGCGTCTAAAGGTAGATTGAAGCCGATGCTTGAGAT
 AAGAAAAAATCAGTTACAGTGTATTATTATTACCTACAGATTGAATTATAGAGAA
 TAGCAGTTACTTAATCAATGAAAATATGCATCTATTATCTACTTTATTATTTCGT
 TATGTATTCATTATCAATTTTTGCTTTGAAGGTCATTG(C)TCCTATCAATAC
 ACTCACACCCCCAAAACATAAGCTTTTTTACTCTTCGCGCATGTTTACACATTAC
 TCATCACATTCCTATGTTTGATCTACGCACACCCTTAACCCGCCCTCAACACCAC
 AAGCTCAATTTGATACACTTCAAGATTATGCCTATGTCATCGTTTCGCACCCCG
 TTCACCACCGTTCCTTGCACCTTCTTCTAATCTTATCTTTTTTTATATTTTGTG
 CAAACGACTCATAGCACCCCCGGGAATACACCACGCGGGACTCTTCACGGTGGG
 Maf:nrf2 Ahr:arnt
 ATCATGCTTACTTTATTGAGTACACACGCGCGAACACTATCAGCGTCGTAGCGCAC
 Maf:nrf2 Ahr:arnt
 CGTGAATGAAACAGTCAACTATCCTGACACACGGAATTGGCGTGCGCTTGGC
 GCAAAAACGTCGATAAGATTGGGACGAATGTGCAAAAAGAGAAGACTTGTG
 TTTTGGCTTCTAATTCGCCCTATAAAGAGAACCGGTTGGGTGACCTCCATCATC
 AGTTGTCGGTGGACAGTCAAATCAATCGAAGCTGGTG

Figure 16 : Séquence nucléotidique d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6M2* montrant les motifs constitutifs de la séquence (a) et les sites potentiels de liaison des facteurs de transcription (b) chez *Anopheles gambiae*

Légende : HR : moustiques hyper-résistant R₉₀ ; Kis : souche sensible d'*A. gambiae* Kisumu de référence. Les colorations bleue et jaune représentent les sites potentiels de liaisons des facteurs de transcription ; le bleu pour le Ahr :arnt et le jaune pour le Maf : nrf2.

III.1.3.2.1.1. Polymorphisme génétique de la région promotrice de *CYP6M2* chez *Anopheles coluzzii*

L'analyse des paramètres de diversité de la région promotrice du gène *CYP6M2* a montré un faible polymorphisme chez les spécimens de moustiques R₉₀ d'*A. coluzzii*, c'est-à-dire qui n'avaient aucun site polymorphe détecté dans un haplotype, comparativement aux spécimens de moustiques S₂₀ chez lesquels 23 sites polymorphes ont été détectés dans 4 haplotypes (h) avec une diversité haplotypique (Hd) de 0,60 (Tableau XIV). La souche sensible Ngouso a, quant à elle, présentée un faible polymorphisme caractérisé par la présence d'un site

polymorphe réparti en deux haplotypes (2) et une faible diversité haplotypique (0,44) (Tableau XIV). Cette absence de polymorphisme observée chez les spécimens R₉₀ suggère un goulot d'étranglement sévère et prolongé autour de ce gène, qui fait penser à une sélection positive. Toutefois, cette hypothèse n'est pas confirmée par les valeurs positives des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li (Tableau XIV). L'analyse du réseau d'haplotypes (figure 17 a1) et de l'arbre phylogénétique (figure 17 a2) ont révélé une prédominance de l'haplotype Hap_1 (75%) chez tous les moustiques R₉₀ par rapport aux autres groupes, suivi de l'Hap_2 (10%) qui n'a été détecté que chez la souche sensible de référence Ngousso. Les haplotypes 3, 4 et 5 ont été retrouvés uniquement chez les moustiques de phénotype sensible S₂₀ et séparés des autres haplotypes par des pas mutationnels élevés.

Tableau XIV : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6M2* chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae*

Espèces	Echantillons	2n	S	H (Hd)	π	k	D	D*
<i>A. coluzzii</i>	F ₄ R ₉₀	10	0	1 (0,000)	0,0000	0,0000	n.d	n.d
	F ₄ S ₂₀	16	23	4 (0,600)	0,01221	11,0000	2,387*	1,592**
	Souche Ng.L	14	1	2 (0,440)	0,00049	0,4396	0,842	1,581
	Total	40	24	5 (0,431)	0,00645	5,8154	0,103	1,722**
<i>A. gambiae</i>	F ₄ R ₉₀	16	23	2 (0,233)	0,00583	5,36667	-0,917	1,623**
	F ₄ S ₂₀	12	20	2 (0,303)	0,00659	6,0606	-0,373	1,593**
	Souche Kis.	6	1	2 (0,533)	0,00057	0,5333	0,851	1,053
	Total	34	49	5 (0,492)	0,01831	16,8271	1,474	1,859**

Légende : 2n : nombre de séquences diploïdes ; S : nombre de sites mutationnels ; D : indice de Tajima ; D* : indices de Fu et Li ; H : nombre des haplotypes présents ; Hd : diversité haplotypique ; Kis : Souche sensible *A. gambiae* Kisumu de référence ; n.d : non déterminé ; Ng.L : Souche sensible *A. coluzzi* Ngousso de référence ; π : diversité nucléotidique ; k : nombre moyen de différences nucléotidiques. Les étoiles indiquent les degrés de signification : *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001.

III.1.3.2.1.2. Polymorphisme génétique de la région promotrice de *CYP6M2* chez *A. gambiae*

Chez *A. gambiae*, l'analyse des indices de diversité n'a révélé aucune différence significative de polymorphisme entre les groupes de moustiques R₉₀ et les groupes S₂₀. Les moustiques S₂₀ ont présenté chacun 20 sites mutationnels, avec une diversité haplotypique faible qui variait de 0,23 pour les moustiques R₉₀ à 0,30 pour les S₂₀ (Tableau XIV). Une différence a toutefois été observée en comparant les R₉₀ et les S₂₀ avec la souche sensible de référence Kisumu, avec un seul site polymorphe donnant deux haplotypes et une diversité

haplotypique élevée (0,53). Dans l'ensemble, les valeurs des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li étaient positives (Tableau XIV) ; suggérant une sélection équilibrante. Cependant, lors de l'analyse par échantillon, les valeurs du D de Tajima, bien que négatives, n'étaient pas statistiquement significatives. Cela indique la présence d'allèles à faibles fréquences et/ou une sélection positive dans le groupe des R₉₀ et celui des S₂₀.

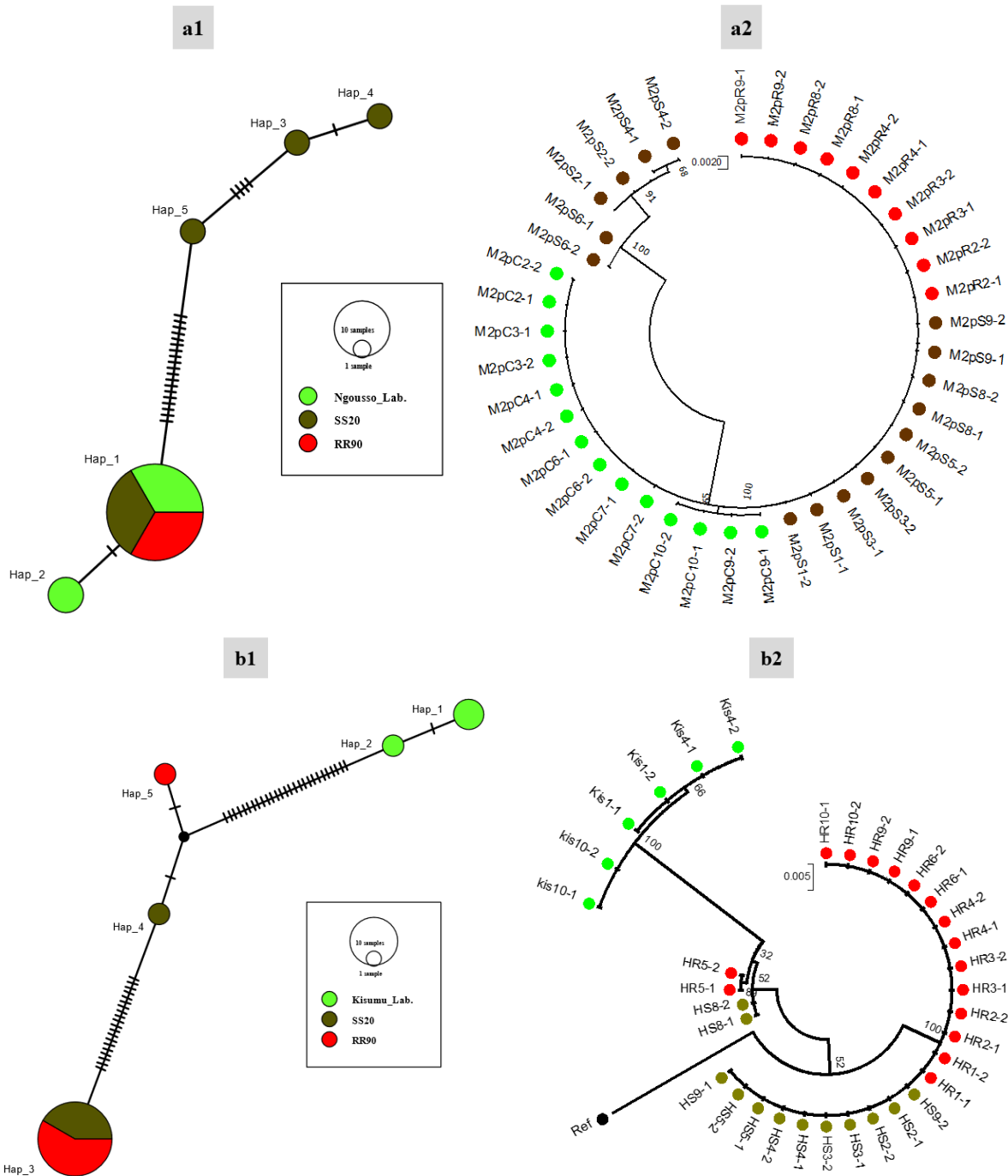


Figure 17 : Diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6M2* au sein des échantillons hyper-résistants et hypersensibles d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae*

Légende : (a1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. coluzzii* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (a2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des

séquences d'*A. coluzzii* avec le modèle de Jukes-Cantor ; (b1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. gambiae* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (b2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. gambiae* avec le modèle de Tamura à 3 paramètres. Kisumu Lab. : souche *A. gambiae* sensible de référence ; Ngousso Lab. : souche *A. coluzzii* sensible de référence ; RR90 : moustiques hyper-résistants R₉₀ ; SS20 : moustiques hypersensibles S₂₀.

Le réseau d'haplotype (figure 17 b1) et l'arbre phylogénétique (figure 17 b2) ont montré que l'Hap_3 (70%) était le plus représenté, et partagé par les R₉₀ et les S₂₀. Les autres haplotypes tels que Hap_1 (12 %) et Hap_2 (6%) ont été trouvés uniquement dans le groupe des S₂₀, alors que l'Hap_5 n'a été trouvé que dans le groupe R₉₀. Ces polymorphismes montrent également une importante de l'InDel de 8 nucléotides (AGTAACTA) étroitement liée à d'autres mutations telle que la substitution A/G dans l'Hap_3 et fixe chez presque tous les spécimens de moustique R₉₀ et sensible S₂₀, mais absent chez les souches de référence Kisumu.

III.1.3.2.2. Diversité génétique d'une portion du locus *CYP6M2*

Pour évaluer le niveau de diversité au locus du gène *CYP6M2*, une séquence commune de 1 104 et de 1 528 paires de bases ont été alignée pour 28 individus d'*Anopheles coluzzii*, répartis-en 10 individus R₉₀, 9 pour les S₂₀ et 9 pour les sensible Ngousso), et 21 individus d'*Anopheles gambiae* composés de 7 individus R₉₀, 7 S₂₀, et 7 sensible de référence Kisumu.

Chez *A. coluzzii*, l'analyse de la séquence nucléotidique du gène *CYP6M2* a révélé que les spécimens de moustiques R₉₀ présentaient un faible nombre d'haplotypes distincts (8 haplotypes) par rapport aux moustiques S₂₀ (14 haplotypes) (tableau XV). La forte diversité haplotypique et la faible diversité nucléotidique observées chez tous les groupes de spécimens testés suggèrent une croissance rapide de la population avec un déficit en allèles rares dans la population et/ou une sélection équilibrante. Cette hypothèse a été confirmée par les valeurs positives des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li. L'analyse du réseau d'haplotypes (figure 18 a1) et l'arbre phylogénétique (figure 18 a2) ont montré une prédominance de l'Hap_3 (21%), partagé par tous les groupes de moustiques testés. La plupart des haplotypes sont séparés les entre - eux par un, deux, trois ou quatre pas mutationnels et dériveraient d'un ancêtre commun venant des souches sensibles.

Tableau XV : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment du locus du gène *CYP6M2* chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d'*Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Espèces	Populations	2n	S	H (Hd)	Syn	Nsyn	π	k	D	D*
A. <i>coluzzii</i> (1 104)	F ₄ R ₉₀	18	20	8 (0,915)	11	7	0,00635	7,00654	0,79926	1,497**
	F ₄ S ₂₀	20	27	14 (0,953)	13	10	0,00993	10,96316	1,71458	1,592**
	Souche Ng.L	18	17	7 (0,889)	9	7	0,00455	5,01961	0,05993	1,4973**
	Total	56	32	27 (0,944)	15	13	0,0097	9,58636	1,238	1,8745**
A. <i>gambiae</i> (1 528)	F ₄ R ₉₀	14	36	11 (0,967)	17	14	0,01018	15,56044	1,62169	1,62726**
	F ₄ S ₂₀	14	44	6 (0,879)	23	14	0,01220	18,63736	1,51506	1,64519**
	Souche Kis.	14	22	6 (0,879)	14	5	0,00639	9,75824	1,72828	1,56886**
	Allèles									
	392S	18	25	11 (0,889)	13	12	0,00599	9,15033	1,02754	1,5724**
	392A	24	33	9 (0,889)	19	14	0,00894	13,66667	2,07375	1,6676**
Total	42	51	20 (0,948)	26	23	0,01241	18,96400	2,12438	1,92961**	

Légende : 2n : nombre de séquences diploïdes ; D : indice de Tajima ; D* : indices de Fu et Li ; H : liste des haplotypes présents ; Hd : diversité haplotypique ; k : nombre moyen de différences nucléotidiques ; Lab. : souche sensible de laboratoire ; S, nombre de sites mutationnels ; π : diversité nucléotidique.

Chez *A. gambiae*, tous les spécimens testés ont présenté un niveau de polymorphisme élevé caractérisé par 32 sites polymorphes répartis en 27 haplotypes et une diversité haplotypique de 0,94. Ainsi, chez les moustiques de phénotype résistant R₉₀, 36 sites polymorphes répartis en 11 haplotypes et 17 mutations synonymes ont été détectés comparativement aux moustiques du phénotype sensible S₂₀, chez lesquels 44 sites polymorphes et 23 mutations synonymes ont été détectés (tableau XV). Comme pour l'espèce précédente, la forte diversité haplotypique et la faible diversité nucléotidique observée chez tous les groupes de spécimens testés suggèrent un déficit en allèles rares dans la population et/ou une sélection équilibrante ; hypothèse confirmée par les valeurs positives des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li.

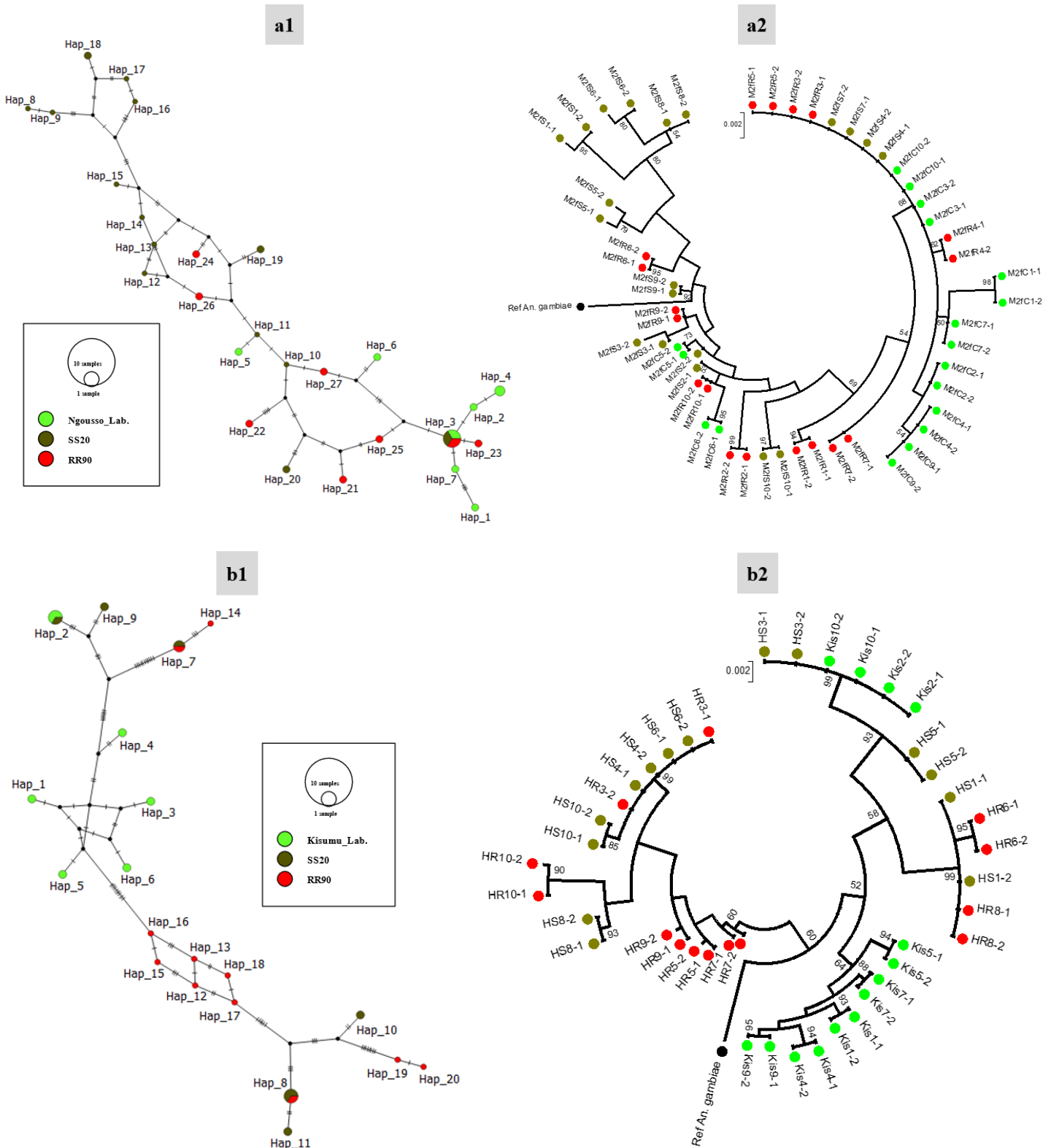


Figure 18 : Diversité génétique des séquences d'un fragment du locus *CYP6M2* au sein des échantillons d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae* hyper-résistants et hypersensibles

Légende : (a1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. coluzzii* en tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (a2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. coluzzii* avec le modèle à 2 paramètres de Kimura ; (b1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. gambiae* en tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (b2)

Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. gambiae* avec le modèle de Tamura-Nei. Kisumu Lab. : souche *A. gambiae* sensible de référence ; Ngouso Lab. : souche *A. coluzzii* sensible de référence ; RR90 : moustiques hyper-résistants R₉₀ ; SS20 : moustiques hypersensibles S₂₀.

Les mutations non-synonymes observées comprenaient la substitution GCC->TCC (position 1 252 ; annexe 5) au niveau du codon 392 du gène *CYP6M2*, qui entraîne un changement d'acides aminés : de l'Alanine à Sérine A392S. Cette substitution A392S a été observée à une fréquence de 71,43% (5/7 séquences) chez les spécimens de moustiques hyper-résistant R₉₀, 57,14% (4/7 séquences) chez les hypersensibles S₂₀ ; mais elle était absente chez la souche sensible de laboratoire Kisumu. Les spécimens porteurs de l'allèle 392A ont présenté un polymorphisme élevé ($S = 33$, $Hd=0,89$ et $\pi = 0,0089$) par rapport aux porteurs de l'allèle 392S ($S = 25$, $Hd=0,89$ et $\pi = 0,0059$; tableau XVII ; annexe 6) ; ceci suggère une sélection purificatrice ou équilibrante chez les moustiques porteurs de l'allèle A392S. Cette hypothèse est confirmée par les valeurs positives des différents tests de neutralité D de Tajima et Fu et Li (tableau XVII). Les compartiments de la figure 18 présentent le réseau d'haplotypes et les relations généalogiques entre les haplotypes du gène d'intérêt, retrouvés au sein des spécimens de moustiques sélectionnés. Cette forme en étoile du réseau d'haplotypes confirme une fréquence élevée de variants intermédiaires, qui est indicatrice d'une expansion de la population.

III.1.3.3. Diversité génétique de *CYP6P4* chez les moustiques hyper-résistants et chez les hypersensibles et potentiels allèles de résistance

L'analyse de la variabilité des séquences du gène *CYP6P4*, des fragments de près de 1 000 et de 1 600 paires de bases respectivement de sa région promotrice et son locus a conduit à les amplifier et séquencer avec succès, pour les différentes espèces de moustiques testées à l'aide d'amorces spécifiques (annexe 4). Des échantillons de 30 moustiques chacun (soit respectivement 10 individus de la souche R₉₀, 10 pour S₂₀ et 10 souches sensibles de référence) ont été considérés. La Figure 19 ci-après présente un électrophorégramme sur gel d'agarose 1,5% illustrant la présence des bandes aux tailles correspondant respectivement à la région promotrice et au locus du gène *CYP6P4*.

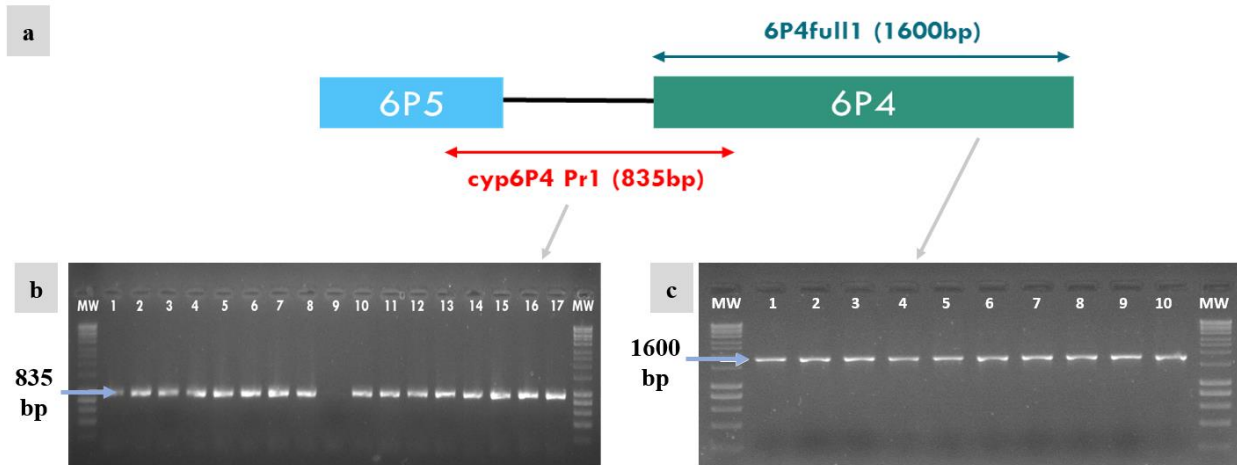


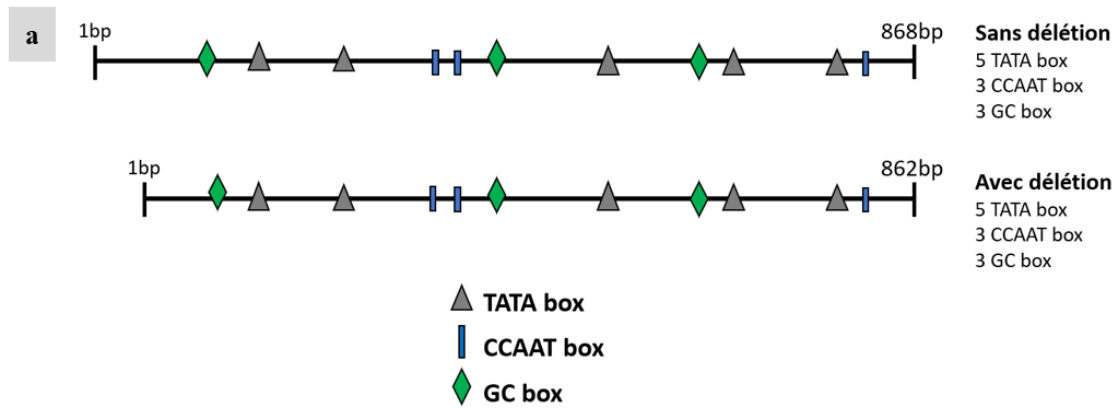
Figure 19 : Photographie des bandes révélées suite à la migration des produits d'amplification du gène *CYP6P4* et de sa région promotrice chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Légende : (a) représentation schématique des portions du gène *CYP6P4* amplifiées et séquencées ; 1 - 8 : différents spécimens d'*A. coluzzii* ; 9 : témoin négatif ; 10 – 17 différents spécimens d'espèce *A. gambiae* ; (b) bandes révélées après migration des produits d'amplification de la région promotrice et (c) de son locus du gène *CYP6P4* ; 1 – 10 : différents spécimens d'*A. gambiae*. MW : marqueur de taille (1 000 paires de bases (BIOLLONE Hyper Ladder I)).

III.1.3.3.1. Diversité génétique au niveau de la région promotrice du gène *CYP6P4*

En ce qui concerne la région promotrice de *CYP6P4*, correspondant à la région intergénique des gènes *CYP6P4* et *CYP6P5*, une séquence commune aux moustiques R₉₀ et S₂₀, chacune de 880 paires de bases, a été alignée pour 17 individus d'*A. coluzzii* (soit 6 individus R₉₀, 4 S₂₀ et 7 sensibles de référence Ngousso), et 22 d'*A. gambiae* (6 individus R₉₀, 9 S₂₀, et 7 sensibles de référence Kisumu). Comme pour le gène précédent *CYP6M2*, les échantillons d'*A. gambiae* ont été utilisés comme modèle pour la caractérisation de cette région intergénique.

Après nettoyage et alignement des différentes séquences de moustiques, une insertion/délétion (InDel) de 7 nucléotides (GGGGTGC) a été observée, avec une délétion qui était associée à une substitution Adénine/Thymine (A/T) en position 273, fixe (100%) dans tous les spécimens de moustiques R₉₀ (6/6 séquences), 44,44% chez les S₂₀ (4/9 séquences) et 18,75% chez les souches sensible Kisumu. De manière globale, l'identification *in silico* des différents constituants de la région promotrice du gène *CYP6P4*, chez les spécimens de moustiques R₉₀ et les S₂₀, a révélé pour chacun 5 boîtes TATA, 3 boîtes CCAAT et GC (figure 20), et plusieurs sites de fixation des facteurs de transcription incluant plusieurs sites pour GATA, MYB ou AHR et nrf2/MAF (5 pour les moustiques R₉₀ et 4 pour les autres groupes). Ce site de fixation supplémentaire du nrf2/MAF observée chez tous les moustiques R₉₀ est engendré par la présence de la mutation A/T décrite précédemment en position 273.



b

```

>Kis_3-6p4Pr_Fw1.scf
ATGCGGTTTCGGCATGATGCAGGTGAAGGTGGGTCTGGTGAGCATGGTGCCTTCGGCTTCCCTCCCAACGG
CACAAACACCGGACCCGCATCGTGTTCGATCCGAAATCGTTCATACTTCACCTTCGGGGGGTAATTAATTTGGC
CATCGAGCAGGTGTGAAGCGTAGCCGCTTTTTTGTGGATGATAATAAAGAATGAGTTTGGTGCTTCGGTTGGA
GGAAGTGAATTGTAACCGTTCGCCATATATGAACATTCCTTATCCAGCTGATTGTCOGTATATGGAAAGTGG
ATGTTTATCAAGGTTGTGATAAGCACCACCGCCCTTCACAAATTAACATTGATAGTAGTACCATTTCGGG
CAATGGGGTTAGATGATAGCAAGTTCCTTAITTTGGAGCTCACCAITTCGGACAAATACTCCGTAGCTCATACT
Maf:nrf2 Maf:nrf2
CGCTCACACCCCTAGGTCAGGACGCCCCCTTCGCAAGATATCGTAAGCCGGCGTGCGGTAACATAATCGATT
CTGCATGTGTGTTGGTATATGTTGTGCGATTTCACAGATAGCCAAAAAACACAAATCTACCGCAGAGCAAA
AACCOCRAAGTCATCGTTCCGAGCGGATTGAACTCACACCATCAAGTAAACCGGGCTGGGGCATGAAAGCT
Maf:nrf2
AGGGATGGAGTCATAAAAGGTACGCGAAGCGCGATTGACTCCATTTCAGTTGCGTGGCATCGGCGAGAGCAGCA
GATGGATCTGTTAAGCTACGTTGACCGCGTTCGTTTCGTCGTCGATTGCGTACCTATACCTGCGCAG
Maf:nrf2
TCGGCACAACTATTGGCGTGTGCTTCCCTACACGCGCCAGAGCCCCACCTGC

>HR_25-6P4Pr_Fw_P03
ATGCGGTTTCGGCATGATGCAGGTGAAGGTGGGTCTGGTGAGCATGGTGCCTTCGGCTTCCCTCCCAACGG
CACAAACACCGGACCCGCATCGTGTTCGATCCGAAATCGTTCATACTTCACCTTCGGGGGGTAATTAATTTGGC
CATCGAGCAGGTGTGAAGCGTAGCCGCTTTTTTGTGGATGATAATAAAGAATGAGTTTGGTGCTTCGGTTGGA
Maf:nrf2
GGAAGTGAATTGTAACCGTTCGCCATATATGAACATTCCTTTCCTGTGATTGTCOGTATATGGAAAGTGG
ATGTTTATCAAGGTTGTGATAAGCACCACCGCCCTTCACAAATTAACATTGATAGTAGTACCATTTCGGG
CAATGGGGTTAGATGATAGCAAGTTCCTTAITTTGGAGCTCACCAITTCGGACAAATACTCCGTAGCTCATACT
Maf:nrf2 Maf:nrf2
CGCTCACACCCCTAGGTCAGGACGCCCCCTTCGCAAGATATCGTAAGCCGGCGTGCGGTAACATAATCGATT
CTGCATGTGTGTTGGTATATGTTGTGCGATTTCACAGATAGCCAAAAAACACAAATCTACCGCAGAGCAAA
AACCOCRAAGTCATCGTTTCGAGCGGATTGAACTCACACCATCAAGTAAACCGGGCTGGGGCATGAAAGCT
Maf:nrf2
AGGGATGGAGTCATAAAAGGTACGCGAAGCGCGATTGACTCCATTTCAGTTGCGTGGCATCGGCGAGAGCAGCA
GATGGATCTGTTAAGCTACGTTGACCGCGTTCGTTTCGTCGTCGATTGCGTACCTATACCTGCGCAG
Maf:nrf2
TCGGCACAACTATTGGCGTGTGCTTCCCTACACGCGCCAGAGCCCCACCTGC

```

Figure 20 : Séquence nucléotidique d’un fragment de la région promotrice du gène *CYP6P4* montrant les motifs constitutifs de la séquence (a) et les sites potentiels de liaison des facteurs de transcription (b) chez *Anopheles gambiae*

Légende : HR : moustiques hyper-résistants R₉₀ ; Kis : Souche sensible *A. gambiae* Kisumu de référence. La coloration violette représente les sites potentiels de liaisons des facteurs de transcription, principalement le Maf : nrf2.

III.1.3.3.1.1. Polymorphisme génétique de la région promotrice de *CYP6P4* chez *Anopheles coluzzii*

L’analyse des séquences nucléotidiques de la région promotrice du gène *CYP6P4* a montré une diversité génétique élevée chez les spécimens d’*A. coluzzii* R₉₀ et S₂₀, avec des valeurs des indices de diversité haplotypique de 0,88 et 0,71 pour 22 et 20 sites polymorphes respectivement (Tableau XVI). Une différence a cependant été observée au niveau du nombre d’haplotypes, soit 7 haplotypes chez les moustiques R₉₀ et 3 pour les autres groupes de moustiques. Dans l’ensemble, la forte diversité haplotypique et la faible diversité nucléotidique associée aux valeurs positives des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li observée dans cette région suggèrent une sélection équilibrante.

Tableau XVI : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6P4* chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae*

Espèces	Echantillons	2n	S	H (Hd)	π	k	D	D*
A. <i>coluzzii</i>	F4 R ₉₀	12	22	7 (0,879)	0,00935	8,22727	0,35569	1,5085
	F4 S ₂₀	8	20	3 (0,714)	0,01071	9,42857	1,15759	1,5088**
	Souche Ng.L	16	25	3 (0,630)	0,00822	7,23333	2,35090	1,5088**
	Total	36	29	11 (0,803)	0,01015	8,92857	0,81985	1,7485*
A. <i>gambiae</i>	F4 R ₉₀	12	2	2 (0,485)	0,00112	0,9697	1,3564	1,1948
	F4 S ₂₀	18	17	7 (0,856)	0,00952	8,1961	2,5287**	1,3484**
	Souche Kis.	14	15	5 (0,703)	0,00754	6,4945	1,5369	1,2881**
	Allèles							
	273-T	21	5	5 (0,595)	0,00128	1,1048	-0,6181	1,3399
	273-A	23	19	7 (0,834)	0,00942	8,1107	2,1075*	1,3744**
	Total	44	19	11 (0,838)	0,00828	7,1321	2,0474*	1,6546**

Légende : Ng.L : Souche sensible *A. coluzzi* Ngouso de référence ; Kis : Souche sensible *A. gambiae* Kisumu de référence ; 2n : nombre de séquences diploïdes ; S, nombre de sites mutationnels ; H : liste des haplotypes présents ; Hd : diversité haplotypique ; π : diversité nucléotidique ; k : nombre moyen de différences nucléotidiques ; D : indice de Tajima ; D* : indices de Fu et Li.

L'analyse du réseau d'haplotypes (Figure 21 a1) et de l'arbre phylogénétique (Figure 21 a2) a montré que l'Hap_2 était prédominant (39%) et partagé par tous les groupes d'échantillons testés. L'Hap_3 et l'Hap_1 étaient retrouvés aux taux de 22% et 5% respectivement chez la souche sensible Ngouso, tandis que les haplotypes 4 et 5 étaient rencontrés uniquement chez les moustiques S₂₀ à un taux de 5% chacun. Le reste des haplotypes était observé uniquement chez les moustiques R₉₀ et séparés des autres haplotypes par un grand nombre de pas mutationnels, ce qui confirme la forte variation d'indice de diversité observée dans cette portion du gène *CYP6P4*.

III.1.3.3.1.2. Polymorphisme génétique de la région promotrice de *CYP6P4* chez *A. gambiae*

Chez *A. gambiae.*, l'analyse de valeurs des paramètres de diversité (Tableau XVI) a révélé un faible polymorphisme chez les séquences des moustiques R₉₀ avec de faibles valeurs des indices de diversité haplotypique (0,485) et nucléotidique (0,00112) pour 2 sites polymorphes donnant deux haplotypes distincts. Chez les moustiques S₂₀, en revanche, une forte diversité a été notée, soit une forte valeur de Hd (0,856) avec 17 sites polymorphes donnant 7 haplotypes.

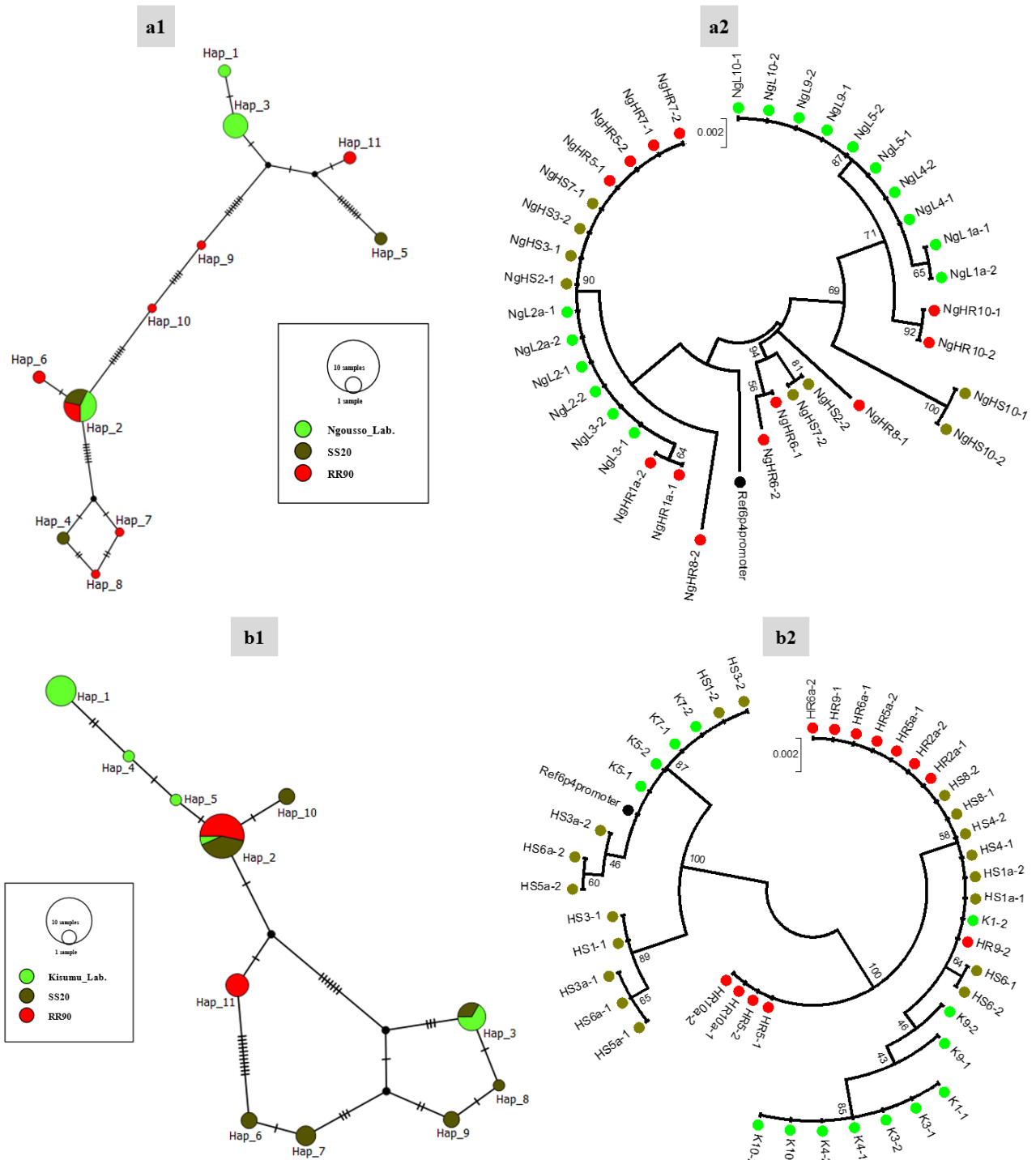


Figure 21 : Diversité génétique des séquences d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6P4* sein des échantillons d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae* hyper-résistants et hypersensibles.

Légende : (a1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. coluzzii* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (a2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. coluzzii* avec le modèle Kimura à 2 paramètres ; (b1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. gambiae* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides (b2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. gambiae*. avec le modèle de Juke-cantor. Kisumu Lab. : souche *A. gambiae* sensible de référence ; Ngoussou Lab. : souche *A. coluzzii* sensible de référence ; RR90 : moustiques hyper-résistants R90 ; SS20 : moustiques hypersensibles S20.

L'analyse du réseau d'haplotypes (figure 21 b1) et de l'arbre phylogénétique (figure 21 b2) a montré que l'Hap_2 était prédominant (34%) chez tous les spécimens de moustiques testés. L'Hap_3 était, quant à lui, partagé par 13% des groupes sensibles (S₂₀ et Kisumu), tandis que Hap_11 a été retrouvé que chez 9% des moustiques R₉₀. Cette baisse de diversité observée dans les séquences des spécimens résistants indique un début de sélection positive en faveur de ces moustiques résistants à la perméthrine, bien que les valeurs des estimés des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li se soient révélés positives. Parmi ces polymorphismes, une délétion de 7 nucléotides (GGGGTGC) étroitement liée à d'autres polymorphismes dans l'Hap_2 et dans l'Hap_5 (figure 21 b2), a été détectée chez toutes les séquences des moustiques R₉₀.

L'analyse des paramètres de diversité génétique des spécimens porteurs de l'allèle 273-T par rapport aux porteurs de l'allèle 273-A (Tableau XVI ; annexe 7) a montré que les moustiques porteurs de l'allèle 273-T présentaient un faible polymorphisme, soit une valeur de l'indice de diversité de 0,59, avec 5 sites polymorphes donnant 5 haplotypes distincts comparés à 19 sites polymorphes donnant 7 haplotypes chez les moustiques porteurs de l'allèle 273-A et un Hd de 0,83. Cette observation combinée à la valeur négative du test D de Tajima, bien que non significative, est en faveur des spécimens porteurs de l'allèle 273-T et confirme l'hypothèse d'une sélection positive dans cette portion du gène *CYP6P4*.

III.1.3.3.2. Diversité génétique d'une portion du locus *CYP6P4*

L'analyse de la variabilité des séquences d'un fragment de 1 051 paires de bases du locus du gène *CYP6P4*, sur les 1 600 paires de bases amplifiées et séquencées (figure 19) a été effectuée sur un échantillon de 29 spécimens chacune des espèces (soit 9 spécimens R₉₀, 10 S₂₀, 10 sensible Ngouso pour *A. coluzzii* et 10 spécimens R₉₀, 9 S₂₀, 10 sensible Kisumu pour *A. gambiae*).

Chez *A. coluzzii*, les séquences des moustiques R₉₀ et S₂₀, comme pour sa région promotrice, ont présenté une forte diversité génétique avec des valeurs de l'indice de diversité haplotypique de 0,92 pour respectivement 21 et 20 sites polymorphes définissant 8 et 9 haplotypes (Tableau XVII). Dans l'ensemble, toutes les valeurs des tests de neutralité D de Tajima et D* de Fu et Li estimées étaient positives (Tableau XVII), ce qui suggère un excès d'allèles de fréquence intermédiaire et par conséquent une sélection équilibrante. L'analyse du réseau d'haplotypes (figure 22 a1) et de l'arbre phylogénétique (figure 22 **Figure 22a2**) pour ce fragment a montré que les haplotypes observés sont génétiquement diversifiés et ne se regroupent pas en fonction du phénotype de résistance. L'Hap_2 a été prédominant et partagé par 14% de tous les groupes de spécimens testés.

Tableau XVII : Paramètres de diversité génétique des séquences d'un fragment du locus *CYP6P4* Chez les échantillons hyper-résistants et hypersensibles *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae*

Espèces	Echantillons	2n	S	H (Hd)	Syn	Nsyn	π	k	D	D*	
<i>A. coluzzii</i>	F ₄ R ₉₀	18	21	8 (0,915)	19	2	0,00756	7,8431	1,1144	1,2458**	
	F ₄ S ₂₀	20	20	9 (0,921)	21	0	0,00775	8,0368	1,3652	1,2681	
	Souche Ng.L	20	25	10 (0,932)	19	7	0,00780	8,08421	0,4002	1,2681*	
	Total	58	35	25 (0,963)	25	9	0,00839	8,70478	0,60983	1,6139**	
<i>A. gambiae</i>	F ₄ R ₉₀	20	11	12 (0,905)	10	1	0,00405	4,2579	1,3238	1,1082	
	F ₄ S ₂₀	18	13	13 (0,967)	11	2	0,00483	5,0719	1,2754	0,6669*	
	Souche Kis.	20	16	13 (0,947)	13	3	0,00592	6,2263	1,4145	1,1082**	
	Allèles										
	Codon 144										
	s.s	144-T	32	16	19 (0,929)	13	3	0,00453	4,7601	0,6643	1,3658
		144-C	26	12	14 (0,948)	10	2	0,00493	5,1846	2,1845*	1,3300*
	Codon 168										
		168S	22	12	11 (0,861)	11	1	0,00331	3,4762	1,0955	1,4701
		168C	36	14	22 (0,968)	12	2	0,00534	5,6079	2,1276*	1,4405*
	Total	58	17	33 (0,969)	14	3	0,00623	6,5433	2,3845*	1,6319**	

Légende : 2n : nombre de séquences diploïdes ; D : indice de Tajima ; D* : indices de Fu et Li ; H : liste des haplotypes présents ; Hd : diversité haplotypique ; k : nombre moyen de différences nucléotidiques ; Kis : Souche sensible *A. gambiae* Kisumu de référence ; Ng.L : Souche sensible *A. coluzzi* Ngouso de référence ; S : nombre de sites mutationnels ; π : diversité nucléotidique.

Chez *A. gambiae*, l'analyse des séquences des moustiques R₉₀ telle que présentée dans le Tableau XVII suscitée, a révélé un polymorphisme élevé, caractérisé par une valeur de l'indice Hd de 0,90 et 11 sites polymorphes définissant 12 haplotypes. Un profil similaire a été observé pour les séquences des spécimens sensibles (S₂₀ et Kisumu), chez lesquels une valeur de l'indice Hd d'environ 0,95 et 13 sites polymorphes définissant respectivement 13 haplotypes chacun. Une différence a toutefois été notée pour les mutations synonymes et non-synonymes, respectivement 10 et 1 pour les moustiques R₉₀ et 11 et 2 pour les moustiques S₂₀.

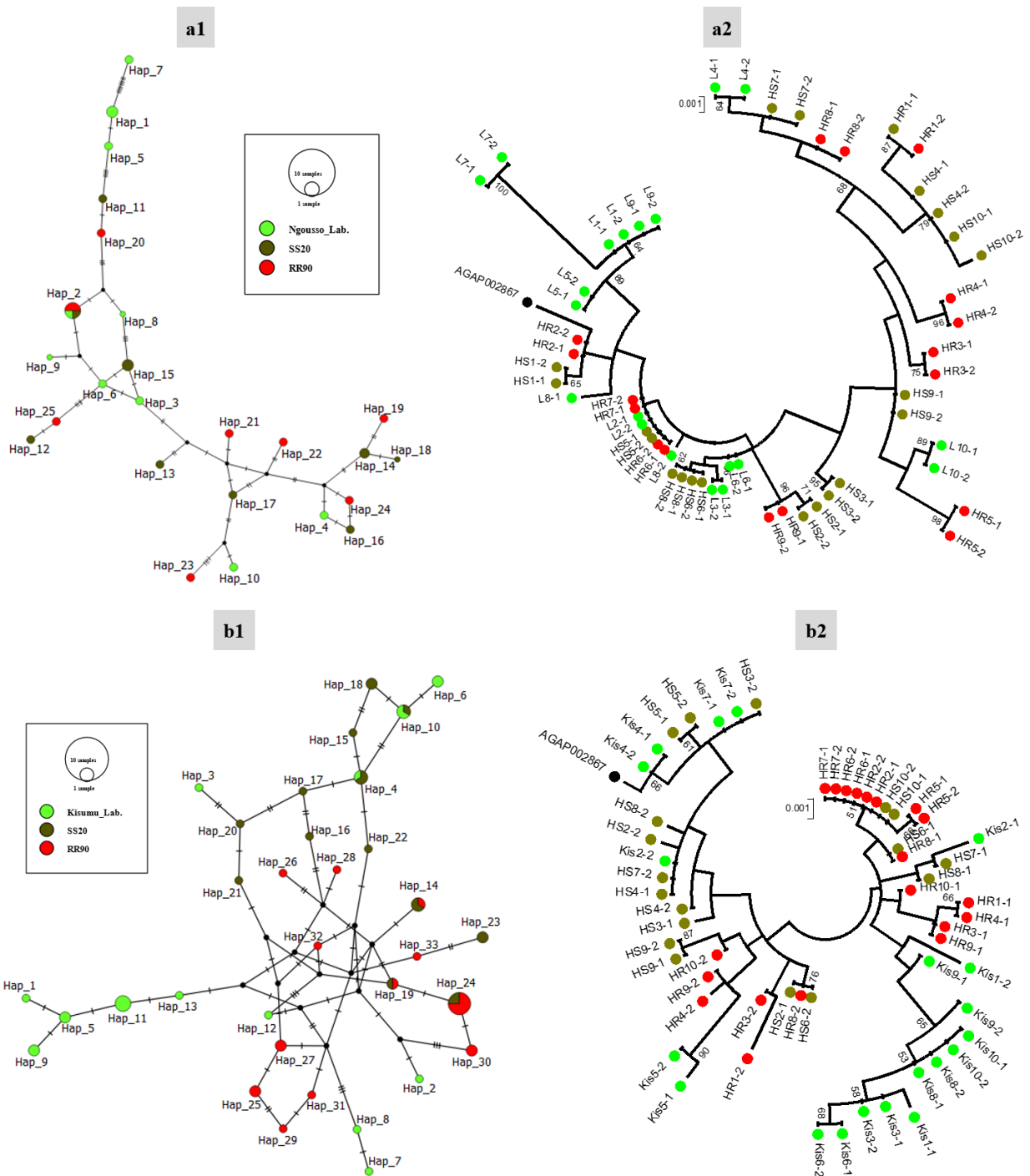


Figure 22 : Diversité génétique des séquences d'un fragment du locus du gène *CYP6P4* au sein des échantillons hyper-résistants et hypersensibles d'*Anopheles coluzzii* et d'*Anopheles gambiae*

Légende : (a1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. coluzzii* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides ; (a2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. coluzzii* avec le modèle de Tamura à 2 paramètres ; (b1) Réseaux d'haplotypes des séquences d'*A. gambiae* tenant en compte du statut de résistance des différents spécimens de moustiques aux insecticides (b2) Arbre phylogénétique par maximum de probabilité des séquences d'*A. gambiae* avec le modèle « General Time Reversible ». Kisumu Lab. : souche d'*A. gambiae* sensible de référence ; Ngouso Lab. : souche d'*A. coluzzii* sensible de référence ; RR90 : moustiques hyper-résistants R₉₀ ; SS20 : moustiques hypersensibles S₂₀.

De façon générale, toutes les valeurs des indices de neutralité D de Tajima et D^* de Fu et Li estimées étaient positives suggérant un excès d'allèles intermédiaire. L'analyse du réseau d'haplotypes (figure 22 b1) et de l'arbre phylogénétique (figure 22 b2) pour le fragment obtenu pour ce gène, a montré que les haplotypes qui forment de petits regroupements en fonction du phénotype de résistance. L'Hap_24 a été prédominant suivi de l'Hap_14 et l'Hap_19, partagé respectivement par 14 %, 5,2 % et 3,4% des moustiques R_{90} et S_{20} . En revanche, l'Hap_4 et l'Hap_10 ont été prédominants et partagés par chacun des 5,2% des spécimens S_{20} et ceux sensibles Kisumu. L'Hap_11 a été retrouvé au taux de 6,89% chez les moustiques S_{20} . Dans les polymorphismes, trois mutations ont été identifiées dans le gène *CYP6P4* chez *A. gambiae* (annexe 8). Il s'agit d'une mutation synonyme (GGC→GGT) au niveau du codon 144 et d'une mutation non-synonyme (TGC→AGC) au niveau du codon 168 associée à une substitution dans le codon 115 (GCG→GCA). La mutation non-synonyme (TGC→AGC) conduit à un changement de la cystéine par la sérine (C168S) avec une fréquence de 70% chez les moustiques R_{90} et de 28% chez les S_{20} .

Les résultats portant sur les paramètres de diversité génétique des individus porteurs de l'une ou l'autre de ces allèles ont montré un polymorphisme élevé quelle que soit la mutation considérée (Tableau XVII ; annexe 9, page 162), soit des valeurs des indices testés supérieures à 0,5.

III.1.4. Validation des outils diagnostiques à base ADN et association avec le phénotype de résistance à la perméthrine chez *Anopheles gambiae*

Pour évaluer le niveau d'association des différentes mutations d'intérêt identifiées dans les régions promotrices et au niveau du locus des gènes *CYP6M2* et *CYP6P4* avec le phénotype de résistance, les fréquences des différentes mutations obtenues ont été comparées entre les moustiques S_{20} et ceux R_{90} . En parallèle, les moustiques sauvages non-exposés aux insecticides de Nkolondom et les sensibles de référence Kisumu ont été génotypés afin d'évaluer les outils moléculaires disponibles.

III.1.4.1. Génotypage d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6M2* couvrant la substitution A/G-616 et association avec le phénotype de la résistance

Un site de restriction reconnu par l'enzyme BsrDI, dont le site de coupe est 5'-TG*CAATGNN-3', a été détecté au niveau de la mutation A/G située en position 616 non loin d'une boîte TATA, au sein de l'haplotype majoritaire des moustiques R_{90} (figure 23 a). Des amorces ont été conçues pour amplifier un fragment de la région promotrice du gène *CYP6M2*, d'environ 545 paires de bases, couvrant ladite mutation A/G. L'enzyme BsrDI coupe les 545

paires de bases, préalablement amplifiées, en deux fragments respectivement de 382 pb et 163 pb chez les porteurs de la variante A et de la délétion de 8 pb (figure 23).

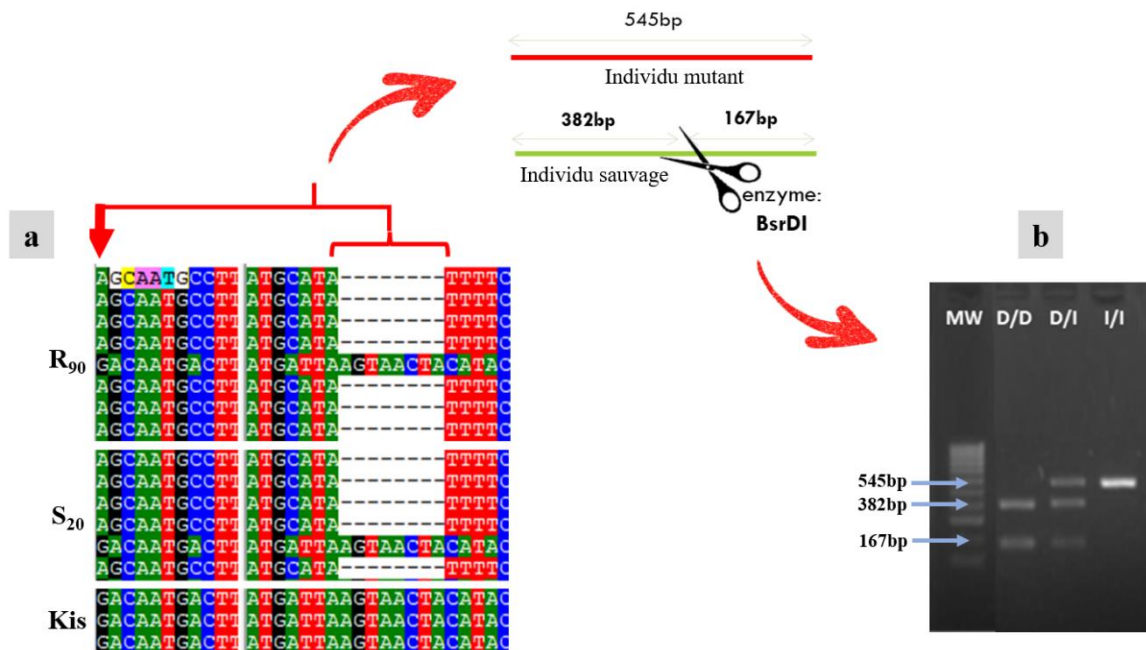


Figure 23 : Outil de détection de la mutation A/G présente dans la région promotrice du gène *CYP6M2* chez *Anopheles gambiae*

Légende : (a) Alignement des séquences d'un fragment de la région promotrice de *CYP6M2* incluant le site de restriction reconnu par l'enzyme BsrDI et associé à l'*InDel* de 8 pb. (b) Profil du génotypage de la mutation cible chez les moustiques de la F₄ avec la PCR-RFLP. D : Délétion ; I : Insertion ; Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; MW : Marqueurs de taille ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Le résultat du génotypage de 54 moustiques R₉₀ a révélé 18 homozygotes AA (génotype DD), 21 hétérozygotes AG (génotype DI) et 15 homozygotes GG (génotype II). Les individus S₂₀ ont quant à eux présenté 10 DD, 32 DI et 16 II (figure 24a). L'évaluation des valeurs du rapport de côte (RC) (figure 24b) a montré que les moustiques homozygotes DD avaient plus de chance de survivre à une exposition à la perméthrine 1× que ceux possédant le génotype DI (RC = 2,67, CI = 1,51 – 4,72, $P = 0,001$). Un résultat similaire a également été obtenu entre les moustiques porteurs du génotype DD et ceux porteurs du génotype II (RC = 1,93, CI = 1,09 – 3,39, $P = 0,03$). Cependant, aucune association n'a été observée entre les moustiques porteurs du génotype DI et ceux porteurs du génotype II (RC = 1,38 CI = 0,79 – 2,42, $P = 0,32$).

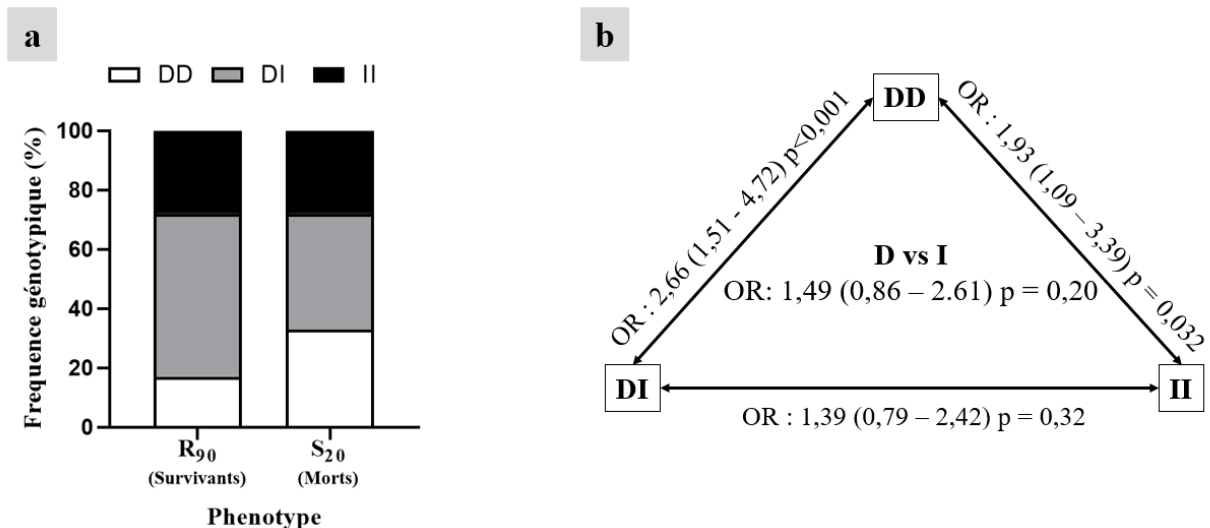


Figure 24 : Association entre l’outil diagnostique à base d’ADN de la région promotrice du gène *CYP6M2* et le phénotype de résistance aux insecticides

Légende : (a) Distribution des différents génotypiques et (b) fréquence allélique de la mutation A/G présent dans la région promotrice du gène *CYP6M2* au sein des spécimens F₄ en fonction de leur phénotype de résistance. D : Délétion ; I : Insertion ; OR : Rapport de côtes ; Kis. : souche d’espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R₉₀ : moustiques hyper-résistant ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Par ailleurs, le génotypage de 19 moustiques sauvages d’*A. gambiae* pour cette mutation a révélé 6 individus DD, 8 hétérozygotes DI et 5 homozygotes II. En revanche, chez les moustiques sensibles Kisumu de référence, 0 individu DD, 3 DI et 14 II ont été enregistrés. Ces résultats suggèrent que cette mutation ne procure un avantage de survie à une exposition à la perméthrine 1× qu’aux individus porteurs de l’allèle D à état homozygote.

III.1.4.2. Génotypage d’un fragment du locus du gène *CYP6M2* couvrant la mutation A392S et association avec le phénotype de la résistance

Un changement de A (Alanine) en S (Sérine) au codon 392 du gène *CYP6M2*, principalement observé chez les moustiques R₉₀, a été utilisé pour génotyper les échantillons d’*A. gambiae*. Ainsi, la présence d’une bande à la taille de 527 paires de bases est caractéristique des homozygotes S392S, tandis qu’une bande à 202 pb est caractéristique des homozygote A392A (figure 25).

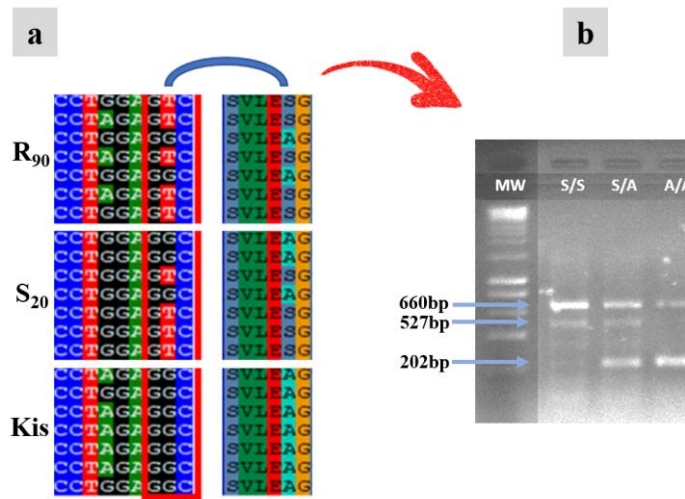


Figure 25 : Outil de détection de la mutation A392S du gène *CYP6M2* chez *Anopheles gambiae*

Légende : (a) Alignement des séquences d'un fragment du gène *CYP6M2*. (b) Profil du génotypage de la mutation A392S avec la PCR-AS. Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; MW : Marqueurs de taille ; R₉₀ : moustiques hyper-résistant ; S : Sérine ; A : Alanine ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Les résultats du génotypage de 50 moustiques R₉₀ et 51 S₂₀ ont révélé que les génotypes S392S (62%), A392S (52%) étaient plus importants dans le groupe des R₉₀ que dans le groupe des moustiques hyper-sensibles S₂₀ (S392S : 28%, A392S : 48%, figure 26 a).

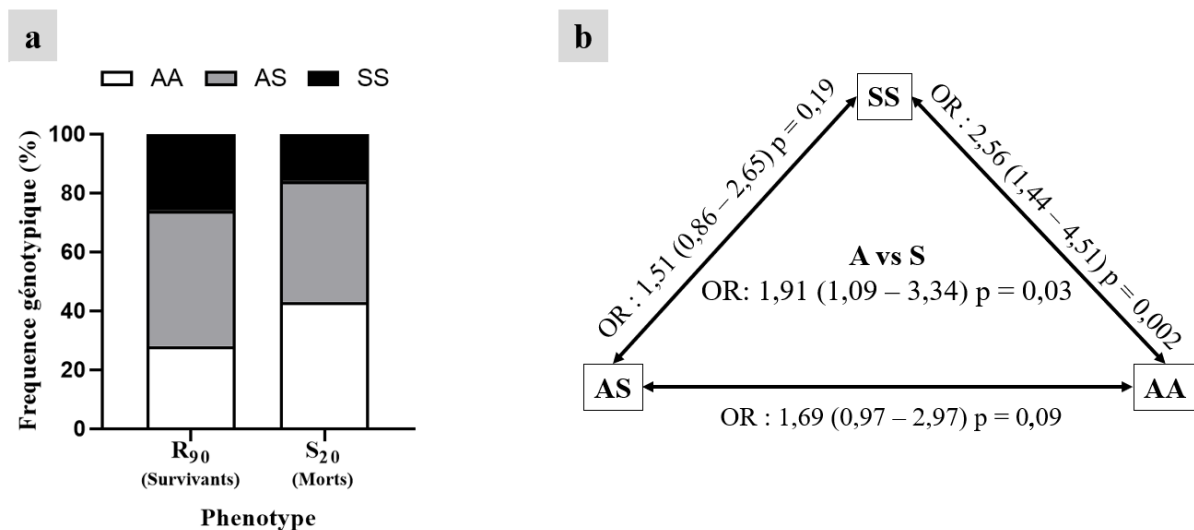


Figure 26 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN du gène *CYP6M2* et le phénotype de résistance aux insecticides

Légende : (a) Distribution des fréquences génotypiques et (b) fréquence allélique de la mutation A392S-CYP6M2 au sein des spécimens F₄ en fonction de leur phénotype de résistance. S : Sérine ; A : Alanine ; OR : Rapport de côtes ; Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R₉₀ : moustiques hyper-résistant ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

A l'inverse, le génotype A392A a été retrouvé à 43% chez des moustiques S₂₀ et à 28% chez les R₉₀. La comparaison des fréquences génotypiques (figure 26 b) a montré que les

moustiques porteurs du génotype S392S avaient une probabilité significativement élevée de survie (RC = 2,56, IC = 1,44 – 4,51, P = 0,002) que ceux porteurs du génotype A392A. Ce résultat n'a pas été observé pour toutes les autres combinaisons.

De plus, le génotypage de 56 moustiques sauvages d'*A. gambiae* pour la mutation A392S-CYP6M2 a révélé 1 homozygote S392S, 6 hétérozygotes et 49 homozygotes A392A. A l'inverse, chez les moustiques sensibles Kisumu de référence, on a obtenu 0 individu S392S, 8 individus A392S et 22 individus A392A.

III.1.4.3. Génotypage d'un fragment de la région promotrice du gène *CYP6P4* couvrant la substitution A/T-273 et association avec le phénotype de la résistance

Un site de restriction reconnu par l'enzyme PvuII, dont le site de coupure est 5'-CAGCTG-3', a été détecté au niveau de la mutation A/T en deuxième position (5'-CT*GCTG-3') du site de restriction situé dans un site de fixation du nrf2/MAF. Des amorces spécifiques ont été conçues pour amplifier un fragment commun d'environ 548 paires de bases, couvrant ladite mutation A/T. L'enzyme PvuII coupe les fragments amplifiés de 548 pb en deux fragments respectivement de 374 pb et 168 pb chez les moustiques porteurs de l'allèle A (figure 27).

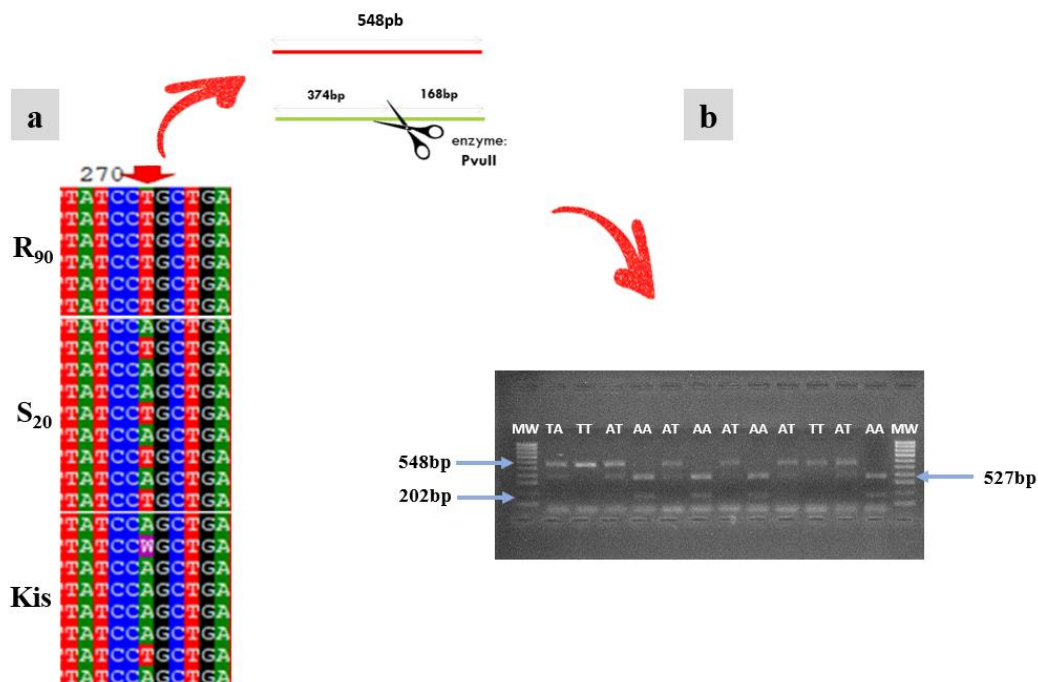


Figure 27 : Outil de détection de la mutation A/T présente dans un site de fixation du nrf2/MAF de la région promotrice du gène *CYP6P4* chez *Anopheles gambiae*

Légende : (a) Alignement des séquences d'un fragment de la région promotrice de *CYP6P4* incluant le site de restriction reconnu par l'enzyme PvuII. (b) Profil du génotypage de la mutation A/T chez les moustiques F₄ avec la PCR-RFLP. A : adénine ; T : thymine ; Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; MW : Marqueurs de taille ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Les résultats portant sur le génotypage de 46 moustiques R_{90} pour la mutation A/T ont révélé que 11% individus étaient homozygotes TT, 54% hétérozygotes AT et 35% homozygotes AA. Un profil similaire a été observé chez les moustiques S_{20} , avec 20% homozygotes TT, 53% hétérozygotes et 28% homozygotes AA (figure 28 a). Cependant, l'évaluation des rapports de côtes (figure 28 b) a révélé une différence significative entre les moustiques de génotype TT et ceux du génotype AA (RC = 2,35, CI = 1,33 – 4,14, $P = 0,005$), ainsi qu'entre les homozygotes TT et les hétérozygotes AT (RC = 1,92, CI = 1,09 – 3,37, $P = 0,03$). En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les porteurs du génotype AT et ceux du génotype AA ($P = 0,57$). Ces résultats indiquent que les moustiques porteurs du génotype TT ont moins de chance de survivre à une exposition à la perméthrine $1\times$ que les moustiques possédant un seul ou pas d'allèle T.

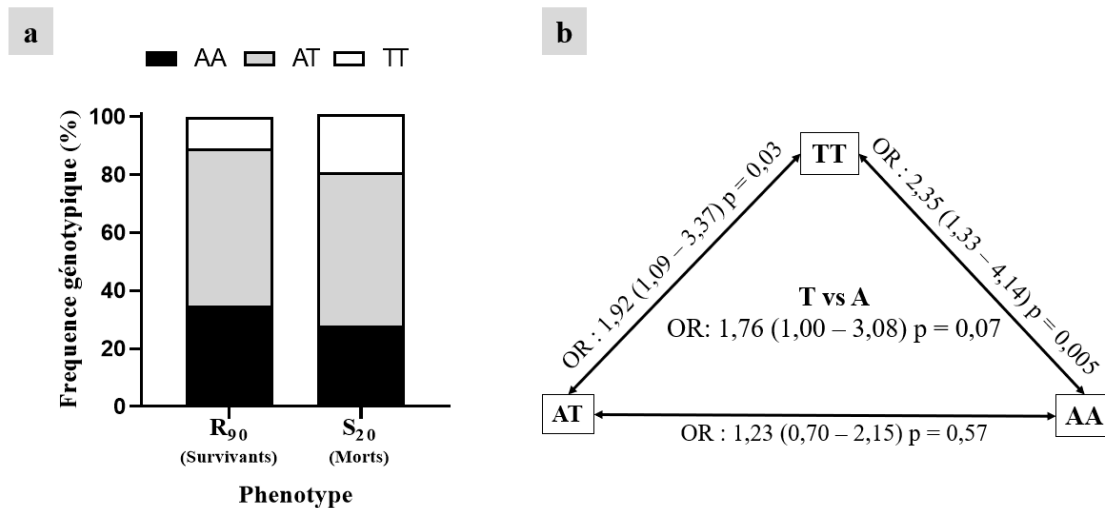


Figure 28 : Association entre l'outil diagnostique à base d'ADN de la région promotrice du gène *CYP6P4* et le phénotype de résistance aux insecticides.

Légende : (a) Distribution des différents génotypiques et (b) fréquence de la mutation A/T présent dans un site de fixation du *nrf2/MAF* chez moustiques F_4 en fonction de leur phénotype de résistance. A : adénine ; T : thymine ; OR : Rapport de côtes ; Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R_{90} : moustiques hyper-résistant ; S_{20} : moustiques hypersensibles ;

Par ailleurs, chez les spécimens sauvages d'*A. gambiae*, 3 individus de génotype TT (15,79%), 5 (26,32%) hétérozygotes AT et 11 (57,89%) homozygotes AA, ont été trouvés. Chez la souche sensible de référence en revanche, on a obtenu 0 individu TT (0%), 6 AT (50%) et 6 AA (50%).

III.1.4.4. Génotypage d'un fragment du locus du gène *CYP6P4* couvrant la substitution 144T/C et association avec le phénotype de la résistance

En ce qui concerne la mutation C/T du codon 144 du gène *CYP6P4*, une PCR-RFLP a été mise en place avec des amorces spécifiques capable d'amplifier un fragment commun d'environ 990 paires de bases, couvrant ladite mutation. Un site de restriction reconnu par l'enzyme *EagI*, qui coupe au niveau du fragment 5'-CGGCCG-3', a été détecté en quatrième position (5'-CGGT*CG-3') du site de restriction. Ainsi, la présence d'une bande de 616 paires de bases, non-digérée par l'enzyme de restriction, était indicatrice de l'homozygote CC, tandis que la digestion du fragment préalablement amplifié en deux fragments respectivement d'environ 357 pb et 633 pb (ou 269 pb si le reste du fragment est de 721 pb) était caractéristique de l'homozygote TT (figure 29).

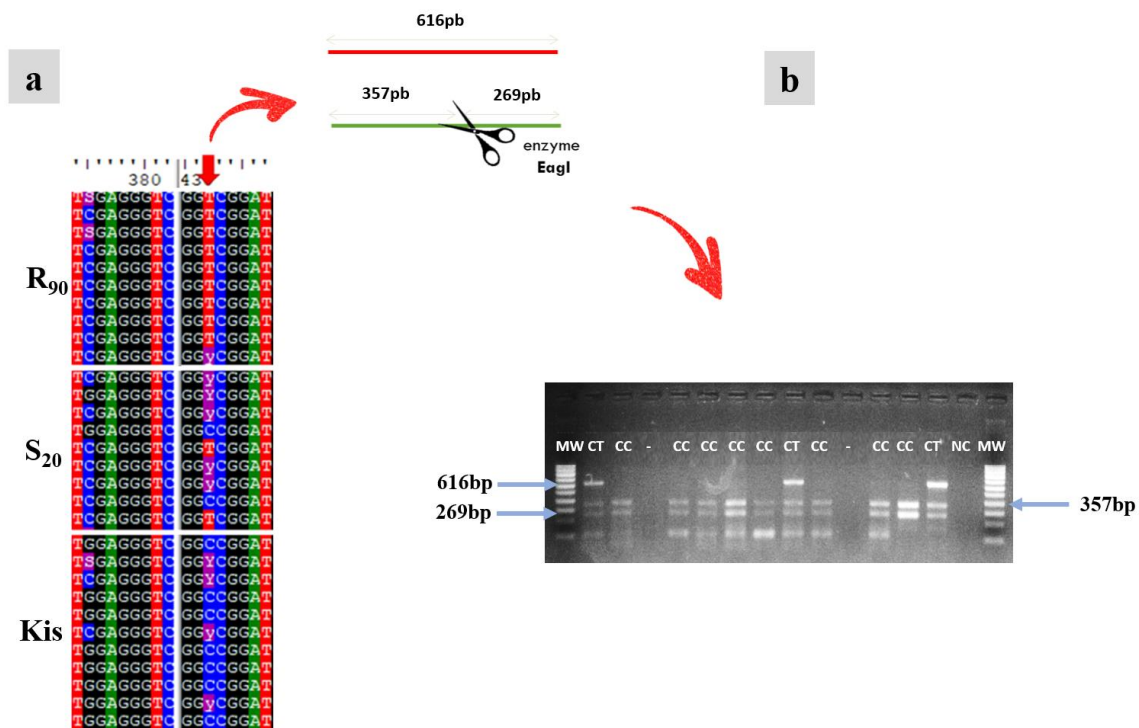


Figure 29 : Outil de détection de la mutation synonyme C/T codon 144 du gène *CYP6P4* chez *Anopheles gambiae*

Légende : (a) Alignement des séquences d'un fragment de la région promotrice de *CYP6P4* incluant le site de restriction reconnu par l'enzyme *EagI*. (b) Profil du génotypage de la mutation synonyme C/T codon 144 du gène *CYP6P4* les moustiques F₄ avec la PCR-RFLP. T : thymine ; C : cytosine ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles ; Kis. : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence.

Les résultats portant sur le génotypage de 44 moustiques R₉₀ et 42 S₂₀ ont révélé que 57% des individus homozygotes TT ont été identifiés chez les moustiques résistants R₉₀ et 38% chez les S₂₀. En revanche, les individus CC ont été rencontrés chez S₂₀ et étaient absents chez les R₉₀ (figure 30 a). La comparaison des fréquences génotypiques (figure 30 b) a montré une

différence significative entre les porteurs du génotype TT et ceux porteurs du hétérozygotes TC (RC = 1,91, CI = 1,09 – 3,56, $P = 0,03$), ainsi qu’entre les porteurs du génotype TT et les porteurs du génotype CC (RC = infini, $P < 0,001$). Un résultat similaire a également été observé entre les moustiques porteurs du génotypes CT et ceux porteurs du génotype CC (RC = infini, $P < 0,001$). Ces résultats suggèrent que les moustiques porteurs d’au moins un allèle T dans leur génotype auraient plus de chance de survivre à une exposition à la perméthrine 1× que les autres moustiques qui ne possèdent pas l’allèle T.

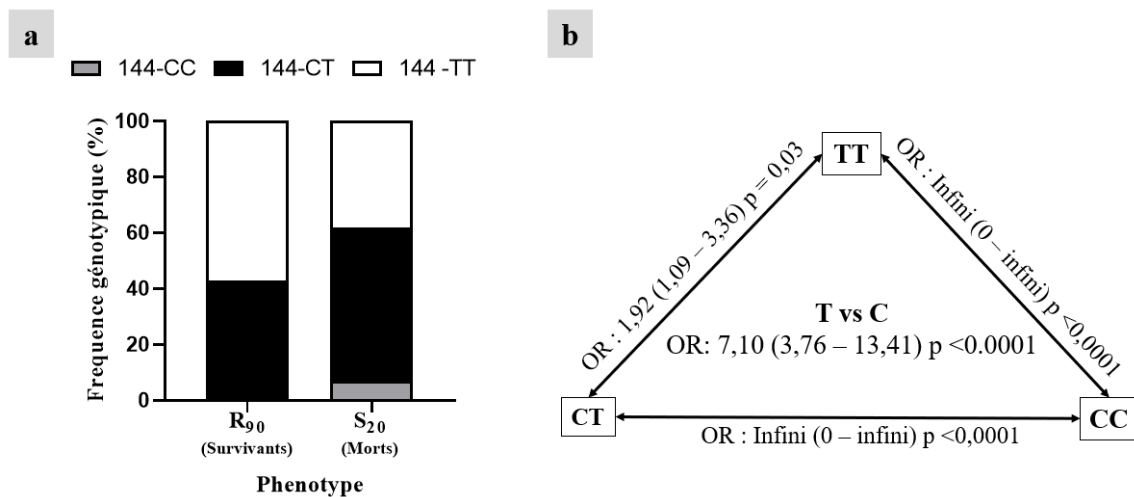


Figure 30 : Association entre l’outil diagnostique à base d’ADN du gène *CYP6P4* et le phénotype de résistance aux insecticides.

Légende : (a) Distribution des différents génotypiques et (b) fréquence de la mutation synonyme C/T codon 144 chez moustiques F₄ en fonction de leur phénotype de résistance. c : Cytosine ; T : thymine ; OR : Rapport de côtes ; Kis. : souche d’espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

De plus, Chez les spécimens sauvages d’*A. gambiae*, 3 individus (15%) étaient homozygotes TT, 5 (25%) étaient hétérozygotes et 12 (60%) étaient homozygotes CC. Chez la souche sensible de référence par contre, aucun individu homozygote TT (0%) n’a été détecté, tandis 8 individus (33,33%) étaient TA et 16 (66,67%) étaient AA.

III.1.4.5. Génotypage d’un fragment du locus du gène *CYP6P4* couvrant la substitution C168S et association avec le phénotype de la résistance

Pour la mutation C168S du gène *CYP6P4*, une PCR-AS a été mise en place pour son génotypage dans les échantillons d’*A. gambiae*. Ainsi, en plus d’une bande commune d’environ de 1 040 pb, la présence d’une bande d’une taille d’environ 614 pb était caractéristique des homozygotes C168S, alors qu’une bande à environ 426 pb était spécifique aux homozygotes

S168S (figure 31). Les hétérozygotes C168S, quant à eux, étaient caractérisés par la présence de ces deux fragments en plus de la bande commune.

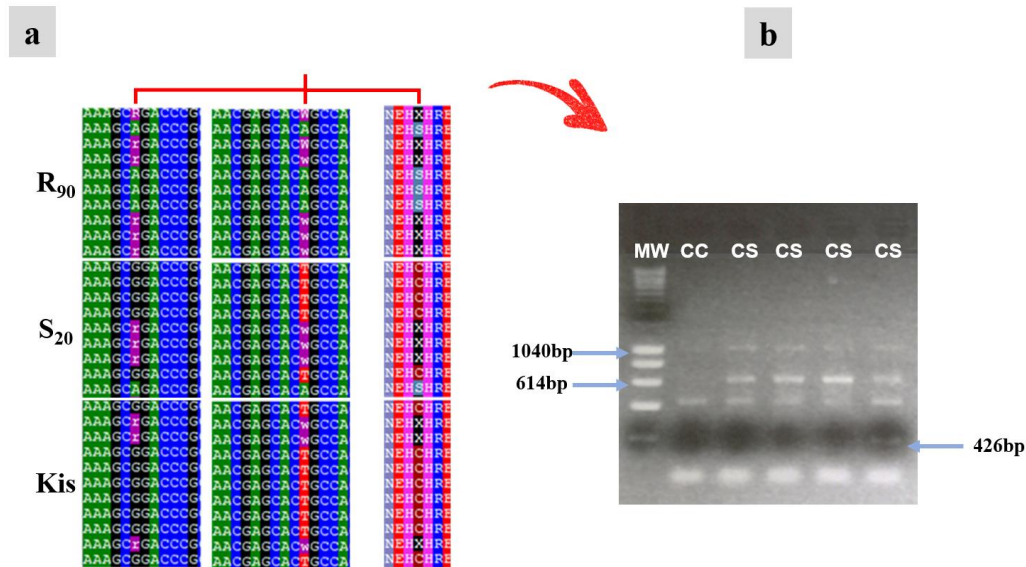


Figure 31 : Outil de détection de la mutation C168S-CYP6P4 chez *Anopheles gambiae*

Légende : (a) Alignement des séquences d'un fragment du gène *CYP6P4* incluant la mutation C168S et les mutations associées au sein des spécimens d'espèce *A. gambiae*. (b) Profil du génotypage de la mutation C168S-CYP6P4 chez les moustiques F₄ avec la PCR-AS. C : Cystéine ; Kis : souche d'espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S : Sérine ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

Les résultats portant sur le génotypage de 30 moustiques résistants R₉₀ à la perméthrine (0,75%) pour cette mutation C168S-CYP6P4 a révélé 3 individus (10%) étaient homozygotes CC, 55 (73%) étaient hétérozygotes CS et 5 (17%) étaient homozygotes SS. Les moustiques sensibles S₂₀ étaient composés de 6 individus (20%) homozygotes CC, 16 individus (53%) hétérozygotes CS et 8 individus (27%) homozygotes SS (figure 32 a). Les résultats de l'analyse des rapports de côtes (figure 32 b) ont révélé une différence significative entre les moustiques homozygotes SS et les hétérozygotes CS (RC = 2,25, CI = 1,28 – 3,97, $P = 0,007$) d'une part et, d'autre part, entre les moustiques hétérozygotes SC pour cette mutation et les homozygotes CC (RC = 2,80, CI = 1,58 – 4,99, $P = 0,0006$). Une absence de différence significative a toutefois été relevée entre les moustiques du génotype CC et ceux du génotype SS (RC = 1,24, CI = 0,69 – 2,22, $P = 0,55$). Ces résultats suggèrent que les individus hétérozygotes CS ont plus d'habilité à survivre à une exposition à la perméthrine que les autres génotypes.

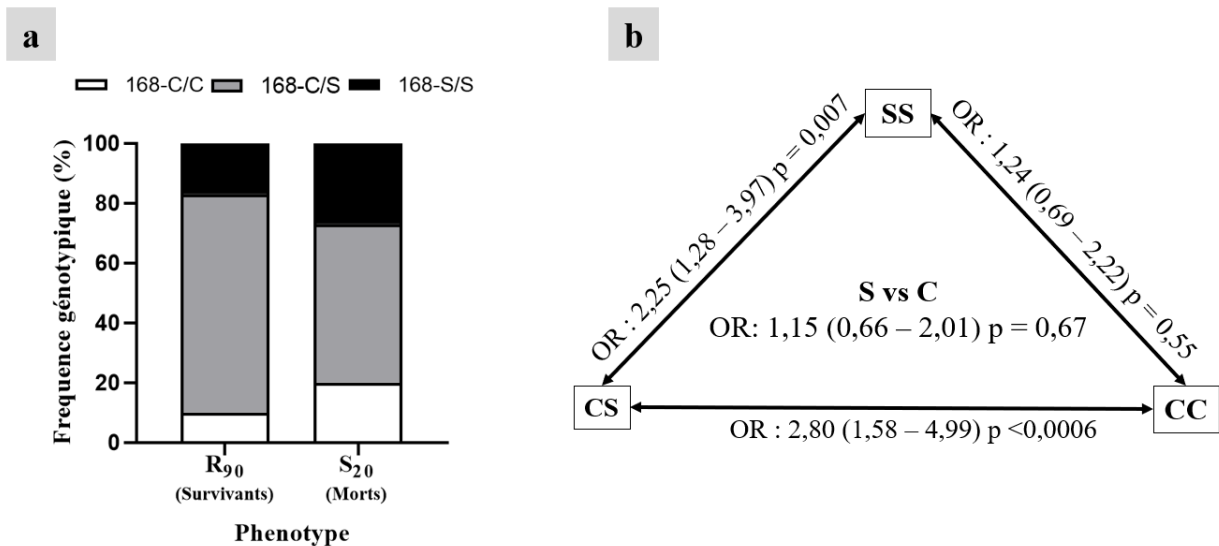


Figure 32 : Association entre l’outil diagnostique à base d’ADN du gène *CYP6P4* (C168S) et le phénotype de résistance aux insecticides.

Légende : (a) Distribution des différents génotypiques et (b) fréquence de la mutation C168S-CYP6P4 chez moustiques F₄ en fonction de leur phénotype de résistance. c : Cytosine ; T : thymine ; OR : Rapport de côtes ; Kis. : souche d’espèce *A. gambiae* sensible de référence ; R₉₀ : moustiques hyper-résistants ; S₂₀ : moustiques hypersensibles.

En outre, le génotypage des spécimens sauvages d’*A. gambiae* a révélé 0 moustique (0%) homozygote CC, 10 moustiques (40%) hétérozygotes et 15 moustiques (60%) homozygotes SS. De façon similaire, 0 individu (0%) CC, 8 spécimens (40%) TA et 12 moustiques (60%) AA ont été trouvés chez la souche sensible de référence.

III.2. Discussion

La résistance aux insecticides constitue un obstacle majeur pour l'efficacité à long terme des outils de lutte contre le paludisme. Outre le mécanisme par modification du site cible, bien documenté aujourd'hui, la résistance métabolique reste l'un des mécanismes les plus importants (Ranson *et al.*, 2011). Cependant, bien que l'expression des gènes de la famille des cytochromes P450, capables de dégrader un insecticide avant qu'il n'atteigne sa cible en phase 1, soit bien documentée, l'adaptation génétique et physiologique des moustiques face à une pression de sélection par les insecticides reste complexe. Les changements capables de moduler l'expression de ces gènes reste mal compris, ce qui limite notre capacité à gérer effectivement cette résistance.

Dans la présente étude, un niveau élevé de résistance chez les moustiques testés a été observé dans les deux zones sélectionnées et à tous les insecticides testés, avec une implication des gènes métaboliques en combinée à des mutations du site cible de type *kdr*. Les espèces collectées dans nos différentes localités suivent les prédictions sur la distribution spatiale des membres du complexe *A. gambiae* dans la zone urbaine et la périphérie de Yaoundé, à savoir *A. coluzzii* en zone urbaine et *A. gambiae* en zone péri-urbaine. Cette distribution spatio-temporelle avait été observée il y a plus de 10 ans (Aguilar *et al.*, 2010; Tene-Fossog *et al.*, 2013; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2016) et n'a pas changé à ce jour. Pourtant l'augmentation continue de la population humaine et de l'urbanisation dans la zone péri-urbaine aurait dû être accompagnée d'une introduction progressive d'*A. coluzzii* dans cette zone (Tene-Fossog *et al.*, 2010; Kamdem *et al.*, 2012). Cette évolution lente est probablement liée à d'autres facteurs écologiques qui restent encore non-élucidés. De plus, la présence des vecteurs dans nos zones de collecte tout au long des saisons suggère sur une transmission pérenne du paludisme.

Indépendamment de la saison de collecte, les tests biologiques avec des doses diagnostiques de DDT, de deltaméthrine et de perméthrine, réalisés sur les deux populations de moustiques cibles, ont révélé des valeurs de mortalité inférieures à 25% 24 heures après exposition de 60 min à un insecticide. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils montrent que les populations des moustiques sont extrêmement résistantes au DDT, avec mortalité de 0% dans la zone maraîchère de Nkolondom. Depuis 2016, l'OMS a décidé d'utiliser, pour certains insecticides, des doses 5× et 10× lorsque les concentrations discriminantes ne renseignent pas sur le profil complet de la résistance observée sur le terrain (WHO, 2018). Le niveau élevé actuel de résistance à la perméthrine et à la deltaméthrine, à ces différentes doses diagnostiques, résulte probablement d'une pression de sélection prolongée, générant des moustiques dotés de mécanismes de résistance multiples : la résistance au site cible et la résistance métabolique. Dans la présente étude, la mutation 1014F, aussi appelé *kdr*-

West, est apparue quasiment fixe dans les deux populations de moustiques testées et a été associée tout au long de l'année à la surexpression de gènes associés à la résistance métabolique. Ce profil particulier de résistance multiplicative pourrait être à l'origine de la forte intensité de la résistance observée (Yewhalaw *et al.*, 2011). Ainsi selon WHO (2018), avec une résistance confirmée aux concentrations d'insecticides 5× et surtout 10×, l'échec opérationnel est probable. Il est donc nécessaire d'opter pour l'utilisation de nouveaux insecticides pour les PID ou l'imprégnation des MILDA ou encore de penser à une approche intégrée prenant en compte le contrôle des larves et des appâts attractifs imprégnés de toxines.

À Nkolondom, notre zone périurbaine d'étude, l'utilisation de pesticides (insecticides et fongicides) agricoles pourrait avoir contribué à une résistance croisée avec les pyréthriinoïdes. De nombreuses études, dont certaines effectuées dans de telles zones, ont confirmé que l'utilisation de pesticides en agriculture peut conduire à la sélection d'une résistance dans les gîtes larvaires d'anophèles, ceci en raison de l'accumulation de ces pesticides dans les sols (Diabate *et al.*, 2002; Yadouleton *et al.*, 2009). Dans la zone urbaine constituée des quartier Etoa-Meki et Ngouso, la sélection de la résistance pourrait être le résultat de la pollution aux hydrocarbures et à certains intrants agricoles, notamment ceux provenant de la gare voyageur, observée dans les gîtes positifs de cette zone. Cette pollution est associée à l'utilisation domestique d'insecticides (spiraies) et de MILDA. Cette hypothèse est également soutenue par de précédentes études qui ont comparé cette zone à d'autres dans la ville de Yaoundé, où des niveaux de pollution des gîtes larvaires étaient plus faibles (Tene-Fossog *et al.*, 2013), et d'autres pays d'Afrique (Diabate *et al.*, 2002; Awolola *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2012b; Poupardin *et al.*, 2012). Il est néanmoins nécessaire de rappeler que la sélection de la résistance ne se produit pas uniquement chez les stades larvaires. Pour les moustiques adultes, l'utilisation intensive des MILDA et les pulvérisations intradomiciliaires sont également un facteur de sélection. En effet, les études menées par Czeher *et al.* (2008) ont révélé une réduction de la sensibilité des vecteurs du paludisme après la mise en place d'une couverture nationale de MILDA au Niger. Sachant qu'au Cameroun en 2018 la couverture en MILDA était d'environ 73%, avec au moins une MILDA par ménage (USAID, 2020), nous pouvons supposer que le niveau de résistance élevé des moustiques observé de nos jours en est une conséquence. Une sélection de souches résistantes de moustiques dotés à la fois les mécanismes de résistance métabolique associés à la présence d'au moins une mutation de type *kdr*, pourrait également être l'un des facteurs sous-jacents de nos observations. En effet, la résistance croisée entraîne une perte de sensibilité aux autres insecticides testés (Chandre *et al.*, 1999).

Les investigations portant sur la fréquence des mutations *kdr* ont montré que la mutation L1014F est presque, voire complètement, fixée dans les populations naturelles de moustiques de terrain. Cette fixation résulte d'une pression de sélection à long terme exercée par (1) les pesticides utilisés en agriculture urbaine/péri-urbaine, (2) les insecticides utilisés dans les MILDA, et (3) les insecticides domestiques (Yadouleton *et al.*, 2009; Yahouédo *et al.*, 2016). De plus, il a été récemment démontré que les substitutions dans la séquence d'acides aminés au locus du canal sodique voltage-dépendant, qui induisent une résistance des moustiques sont plus complexes que ce qui a été précédemment décrit par Clarkson *et al.* (2021). L'implication de certaines mutations encore non-décrites dans la résistance au site cible, comme la mutation V402L (Williams *et al.*, 2022), pourrait expliquer l'absence de fixation des mutations L1014F et L1014S dans les populations de moustiques en étude. Depuis quelques années, le rapport mondial de l'OMS a révélé une stagnation des progrès dans la lutte contre le paludisme illustré par une augmentation des cas de cette maladie entre 2015 et 2020 (WHO, 2022a). Une explication possible de cette situation est la résistance généralisée des vecteurs de cette maladie aux pyréthrinoïdes, seule classe d'insecticides recommandée pour l'imprégnation des MILDA. Au cours de cette étude, un test en cône a été réalisé avec deux formulations des moustiquaires les plus distribuées dans le pays, à savoir l'Olyset® et sa nouvelle version OlysetPlus® imprégnée en plus de la perméthrine, du synergiste butoxyde de piperonyl (PBO). Malgré le niveau de résistance élevé observé dans les populations naturelles de moustiques de terrain, les tests en cônes ont donné des résultats satisfaisants. Si la première version d'Olyset® a perdu son efficacité sur les moustiques de terrain depuis de nombreuses années (Pennetier *et al.*, 2013; Ngongang-Yipmo *et al.*, 2022), sa version améliorée reste bien efficace aujourd'hui avec des taux de mortalité supérieurs à 90%, ceci en grande partie grâce à la présence du synergiste. Ce résultat est surprenant compte tenu de la présence de nombreux mécanismes de résistance dans nos populations de terrain et des résultats des tests en tubes de l'OMS ; il reste cependant intéressant car on dispose encore d'une solution contre ces souches sauvages résistantes de terrain. Cette information, en plus des tests d'efficacité des moustiquaires en conditions semi-contrôlées, faisant usage des cages-pièges, montre déjà une perte d'efficacité de certaines nouvelles formulations de moustiquaires à base de synergistes (Menze *et al.*, 2020), ce qui pourra aider le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) dans le choix des MILDA à utiliser dans les zones du Cameroun où la résistance a été décrite, en attendant que de nouvelles formulations d'insecticides soient disponibles pour une utilisation de masse.

L'étude du profil de résistance en fonction des saisons, réalisée sur *A. coluzzii* collecté en zone urbaine, a révélé une variation significative de la sensibilité au cours de l'année avec différents niveaux de résistance. Nos collectes ayant été effectuées au cours de deux années

consécutives, une comparaison des données de la petite saison sèche (PSS) des deux années a montré une forte similitude dans le profil de résistance sur ces deux années. Cette observation suggère que la variation de la sensibilité des moustiques d'une année à l'autre est relativement faible. Cependant, l'interprétation de ces résultats est faite avec prudence, car ils ne prennent en compte que les données de deux années consécutives. Les fréquences des mutations de type *kdr* étaient élevées et presque sans variation en fonction des saisons, contrairement aux niveaux d'expression des gènes métaboliques. Des études antérieures, menées dans des zones similaires à celles en étude, ont incriminé la pollution urbaine comme facteur stimulant la surexpression des gènes métaboliques (Poupardin *et al.*, 2012; Tene-Fossog *et al.*, 2012; 2013). Cependant, sachant qu'il existe une résistance multiplicative dans de telles situations (Taskin *et al.*, 2016), nous nous attendions à ce que la pollution élevée dans les gîtes larvaires pendant les périodes de faibles pluies, en zone urbaine, conduise à des niveaux élevés de production d'enzymes de détoxification et, par conséquent, à une mortalité plus faible à la perméthrine. Nos résultats suivent ce point de vue pour trois saisons : la grande saison des pluies (GSP), la petite saison de pluies (PSP) et la petite saison sèche (PSS) avec des profils statistiquement similaires. La GSP a présenté la plus faible résistance des moustiques à la perméthrine pour les trois concentrations testées, ainsi que le plus faible ratio de restauration de la sensibilité au PBO. Pendant cette saison, les pluies renouvellent fréquemment l'eau des gîtes larvaires, ce qui diminue leur niveau de pollution et, par conséquent, les niveaux d'expression des enzymes métaboliques. Les profils de résistance des anophèles en PSP et PSS suivent schéma similaire. En revanche, la PSS a enregistré un taux de mortalité des moustiques plus faibles que les saisons de pluies et un ratio de restauration avec le PBO plus élevé. Les observations faites en GSS ont été différentes. En effet, le niveau de restauration de la sensibilité des vecteurs a été deux fois plus élevé que pendant les autres saisons. Cette implication très importante des enzymes métaboliques pourrait résulter d'un niveau élevé de pollution causé par la stagnation de l'eau et la décomposition de la matière organique dans les gîtes larvaires, suivies d'une sélection d'individus dotés d'un niveau élevé d'enzymes de détoxification dont certains peuvent métaboliser des molécules d'insecticides (Muller *et al.*, 2008; Poupardin *et al.*, 2012). Cependant, une telle surexpression d'enzymes de détoxification pour métaboliser les xénobiotiques peut avoir affaibli les moustiques et réduit leur capacité à vivre face aux insecticides. Ce coût biologique devrait expliquer le taux de mortalité élevée observé durant la GSS. L'intensité de la résistance des vecteurs de paludisme 5× et 10 × de perméthrine suit également ce même schéma saisonnier, puisqu'elle augmente en PSS et GSS.

En plus de la mutation *kdr* 1014F, l'implication des enzymes métaboliques a été confirmée par une restauration partielle de la sensibilité des vecteurs après leur exposition au

synergiste PBO et par la suite avec une surexpression de certaines enzymes métaboliques. L'association des cytochromes P450 dans la résistance aux DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine a été démontrée à plusieurs reprises dans la littérature, et certains de ces cytochromes ont précédemment été surexprimés chez *A. gambiae* s.l. ; il s'agit principalement de *CYP6M2*, *CYP6P4*, *CYP9K1* et *CYP6P3* (Ibrahim *et al.*, 2016b; Vontas *et al.*, 2018; Adolfi *et al.*, 2019; Fagbohun *et al.*, 2019). Ce travail met en lumière la relation entre la saisonnalité (saisons des pluies et saisons sèches) et les profils d'expressions géniques. Ces profils d'expressions géniques ont montré une similitude au cours des saisons sèches dans les deux zones étudiées, mais une grande différence au cours des saisons des pluies. En zone urbaine, une surexpression élevée d'enzyme de détoxification a été observée pendant la grande saison sèche. Cela est probablement relié à l'accumulation des produits issus de la décomposition de la matière organique dans les gîtes larvaires et à la concentration d'autres xénobiotiques dans ces gîtes après la réduction du volume d'eau due à l'évaporation (Jones *et al.*, 2012b; Poupardin *et al.*, 2012; Tene-Fossog *et al.*, 2013). Durant cette saison, qui correspond généralement à la période après la récolte où les plantations sont abandonnées, un profil de sensibilité similaire à celui de la zone urbaine a été observé, mais avec une plus forte surexpression des enzymes de détoxification. Cela est probablement due à la présence de résidus de pesticides dans le sol qui pourrait entraîner une sélection au niveau larvaire des individus ayant un bagage génétique approprié pour résister aux insecticides, aboutissant ainsi à l'émergence d'adultes déjà résistants aux insecticides. En revanche, les pluies constantes et abondantes augmentent la taille des gîtes larvaires et renouvellent fréquemment leurs eaux, réduisant fortement la concentration en xénobiotiques. Il y aura alors une pression plus faible sur les larves d'anophèles dans leurs gîtes, ce qui sélectionne moins rigoureusement des individus capables de produire de fortes concentrations d'enzymes de détoxification. En zone périurbaine, la saison des pluies est la période de croissance rapide des cultures, et les cultivateurs utilisent intensément les insecticides pour protéger leurs cultures contre les ravageurs. En cette saison, une forte pression de sélection s'exerce sur les vecteurs, entraînant des expressions enzymatiques plus élevées.

La surexpression constante de certains gènes, à l'instar de *CYP6M2* et *CYP6P4*, chez les moustiques des espèces *A. coluzzii* et *A. gambiae* résistants à la perméthrine dans cette étude, montre leur association avec le schéma de résistance observé dans la ville de Yaoundé au Cameroun (Tene-Fossog *et al.*, 2013). Ces deux gènes ont déjà été enregistrés comme surexprimés chez les moustiques résistants au DDT et aux pyréthroïdes au Cameroun (Tene-Fossog *et al.*, 2013) et plus récemment chez les populations d'*A. gambiae* de la zone périurbaine (Bamou *et al.*, 2019; Piameu *et al.*, 2021b). Par ailleurs, Ibrahim *et al.* (2016b) avaient déjà établi le lien entre le gène *CYP6P4* et la résistance à la perméthrine (utilisée pour l'imprégnation

des moustiquaires) chez des populations d'*A. arabiensis*. De même, Stevenson *et al.* (2011) puis Adolphi *et al.* (2019) ont caractérisé fonctionnellement le gène *CYP6M2* chez la drosophile et *A. gambiae* respectivement. Ces auteurs ont constaté que ce gène est capable de métaboliser le bendiocarbe, le DDT et les pyréthroides de classes I et II, et donc induit la possibilité d'une résistance croisée. Les différences de niveaux d'expression observées entre les études récentes effectuées au Cameroun par Banou *et al.* (2019) et notre travail pourraient être expliqués par la plasticité génétique des populations naturelles de vecteurs du paludisme (Tene-Fossog *et al.*, 2013). Cette plasticité permet aux moustiques de s'adapter à diverses pressions de sélection temporelles. De plus, les différences pourraient également être influencées par des niveaux de sensibilité des méthodes utilisées (Mavridis *et al.*, 2019). De nombreuses études ont montré que l'expression de certains cytochromes P450 peut être modulée par des mutations au niveau des éléments régulateurs en position *cis* dans les régions promotrices, et/ou par des changements au niveau des sites de fixation des facteurs de transcription se lient à ces éléments *cis*-régulateurs (Maitra *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Mugenzi *et al.*, 2019). Ces régions sont caractérisées par un puzzle combinatoire de courtes séquences reconnues par des régulateurs spécifiques de la séquence, qui activent la transcription de ces gènes en ARNm par la polymérase II (Dolfini *et al.*, 2009). Etant admis que d'autres mécanismes tels que les variations alléliques des gènes peuvent également être impliqués dans la résistance des vecteurs de paludisme (Ibrahim *et al.*, 2015), nous avons dans cette étude amplifiée respectivement près de 1 000 pb des régions promotrices et génique complète de *CYP6M2* et de *CYP6P4* chez *A. coluzzii* et chez *A. gambiae* s.s, ceci afin de détecter toute variation qui pourrait influencer l'expression de ces derniers chez les individus résistants.

Les analyses des polymorphismes des séquences du gène *CYP6M2* chez *A. coluzzii*, provenant de la zone urbaine Ngouso, ont révélé que les moustiques hypersensibles S₂₀ étaient plus polymorphe que ceux hyper-résistants R₉₀ pour toutes les régions analysées. Cependant, l'haplotype majoritaire était partagé par les deux souches. Cette observation pourrait s'expliquer par la complexité du mécanisme cellulaire de détoxification des xénobiotiques, qui implique une cascade de gènes multiples liés et coordonnés comme l'a montré Liu (2015). De plus, la fréquence élevée de la mutation *kdr*-1014F presque fixée chez les populations sauvages de terrain pourrait jouer un rôle. Par conséquent, il est possible que l'émergence de la résistance des anophèles associée au gène *CYP6M2* soit due à des pressions de sélection agissant sur des gènes codant pour des protéines régulatrices distantes situées en position *trans* (Hu *et al.*, 2021). Une tendance quasi similaire a été observée chez *A. gambiae* du site péri-urbain de Nkolondom, mais l'analyse de la région promotrice du gène *CYP6M2* chez les moustiques sensibles S₂₀ a révélé un polymorphisme similaire à celui des spécimens de la souche résistante R₉₀, ce qui

suggère qu'il n'y a pas de fort balayage sélectif sur ce gène. Cette hypothèse est soutenue par la grande diversité génétique observée chez les spécimens R₉₀ par rapport aux individus S₂₀. Malgré cette absence d'association avec le phénotype de résistance dans cette étude, la mutation A392S s'est avérée la plus fréquente chez les moustiques de la souche R₉₀ issue du croisement réciproques des moustiques sensibles avec les moustiques de Nkolondom. Elle a également été détectée dans les populations F₀ sauvages de terrain. Cette mutation est proche de la mutation A468S précédemment décrite dans les populations d'*A. gambiae* du Gabon (Wagah *et al.*, 2021). Ainsi la mutation A468S-CYP6M2, n'a été détectée dans aucun des spécimens testés dans ce travail. Des études supplémentaires sont toutefois indispensables pour évaluer l'impact de ces différentes mutations sur le métabolisme des xénobiotiques ou même leur implication dans d'autres fonctions comme la composition du microbiome.

Une analyse détaillée des polymorphismes des régions promotrice et génique du gène *CYP6P4* a révélé que les moustiques sensibles étaient plus polymorphes que les spécimens résistants des populations d'*A. gambiae*. Cette faible diversité observée dans les séquences des moustiques résistants est associée à la présence du polymorphisme A/T en position 273 dans l'un des sites de fixation du facteur de transcription *nrf2/MAF*, ainsi qu'à la variation allélique (C168S) observée dans les séquences des individus R₉₀ et S₂₀. En effet, l'équivalent invertébré de la voie Nrf2-Maf chez la drosophile, à savoir *cnc-Maf-S*, est un petit facteur de transcription à localisation nucléaire qui se lie à des éléments de réponse antioxydants (ARE) dans le génome, qui contrôlent de nombreux gènes impliqués dans la défense contre les xénobiotiques. Plusieurs auteurs ont démontré que cette voie est impliquée dans la régulation des gènes de la familles CYP chez la mouche verte, *Aphis gossypii* (Peng *et al.*, 2016), chez les coléoptères *Tribolium castaneum* et *Leptinotarsa decemlineata* (Kalsi & Palli, 2015, 2017), et plus récemment chez *A. gambiae* (Ingham *et al.*, 2017). Par ailleurs, cette faible diversité observée dans les séquences des résistants R₉₀ pourrait également signaler une sélection directionnelle comme celle qui avait été observée pour les gènes *CYP6P9a/b* (Riveron *et al.*, 2013), indiquant qu'un allèle préférentiel du gène *CYP6P4* pourrait être sélectionné par les moustiques résistants, pour augmenter l'efficacité du métabolisme des pyréthrinoïdes comme décrit précédemment chez *A. funestus* pour les gènes *CYP6P9a/b* (Ibrahim *et al.*, 2015). Cependant, des travaux supplémentaires sur la voie de régulation du gène *CYP6P4* aideraient à détecter les marqueurs causaux conduisant à la résistance aux pyréthrinoïdes médiée par ce gène, comme cela a déjà été observé chez *A. funestus* qui à travers le continent n'exprime pas les mêmes allèles pour certains gènes (à titre d'illustration *CYP6P9a/b*, *CYP325A* (Mugenzi *et al.*, 2019; Weedall *et al.*, 2019; Wamba *et al.*, 2021)). L'allèle de l'Afrique de l'Est peut ne pas être présent ou agir en

Afrique de l'Ouest et du Centre ; ceci justifie pourquoi un tel travail doit être fait en Afrique Centrale.

La répartition de la substitution A/T chez les spécimens sauvages d'*A. gambiae* suggère que cet allèle pourrait faire l'objet d'une sélection et augmenter avec le temps comme ce fut le cas pour le gène *CYP6P9a/b* chez *A. funestus* en Afrique australe (Mugenzi *et al.*, 2019; Weedall *et al.*, 2019). Le changement majeur d'acides aminés c'est-à-dire de la cystéine (C) par la sérine (S) en position 168 dans presque toutes des séquences les individus résistants pourrait également avoir un grand impact sur les propriétés physico-chimiques de cette enzyme ; cette hypothèse reste toutefois à vérifier. L'impact de la variation allélique sur l'efficacité métabolique des gènes de détoxification a déjà été montré chez d'autres espèces d'anophèles, pour les cytochromes P450 tels que *CYP6P9a/b* chez *A. funestus* (Ibrahim *et al.*, 2015). Cette variation est similaire à celle du gène *CYP6A2* chez *Drosophila melanogaster* pour lequel trois substitutions d'acides aminés, situées près du site actif de l'allèle prédominant des mouches résistantes au DDT, ont été impliquées dans le métabolisme accru du DDT (Li *et al.*, 2007). Ces résultats diffèrent de ceux d'une étude en Ouganda où la mutation I236M a été trouvée (Njoroge *et al.*, 2022).

L'absence de l'allèle 236M dans toutes les séquences au Cameroun confirme l'hypothèse d'une variation géographique de l'expression du gène et/ou des haplotypes d'un même gène. Le changement d'acides aminés C168S observé et la mutation présente dans le site de fixation du facteur de transcription *nrf2/MAF* dans la région promotrice de ce même gène semblent être soumis à une sélection positive dans les spécimens d'*A. gambiae* testés. Notre étude apporte de nouvelles informations sur le polymorphisme de ces gènes et leur implication dans la résistance aux insecticides. La détection précoce de la résistance aux insecticides est une condition préalable essentielle pour la mise en œuvre de stratégies de gestion efficaces et durables de la résistance aux insecticides. Dans notre travail, l'association de différentes variations génomiques observées dans les régions promotrices et géniques avec le phénotype de résistance nous a permis de développer des outils diagnostiques basés sur une simple PCR. Ces outils pourront détecter et suivre la résistance métabolique médiée par les gènes *CYP6M2* et *CYP6P4* chez les moustiques facilitant ainsi la détection et la gestion de ce type de mécanisme de résistance des anophèles sur le terrain. Ces outils moléculaires détectant une résistance des anophèles aux pyréthrinoïdes impliquent les monooxygénases chez *A. gambiae*. Ils interviennent à notre connaissance, deux décennies après la conception du premier outil de diagnostic basé sur l'ADN de la résistance au site cible (*kdr*) (Martinez-Torres *et al.*, 1998), et juste quelques temps après la première détection d'un trio de mutations (*CYP6P4*-236M, insertion d'un élément transposable (ET) de type Zanzibar et d'une duplication dans le locus

du gène *CYP6A1*) chez des moustiques résistants en Afrique de l'Est (Njoroge *et al.*, 2022). Un autre outil de diagnostic avait également été conçu pour détecter la mutation I114T-GSTe2 chez *A. gambiae* ; il est associé de manière significative à la résistance au DDT dans les populations d'*A. coluzzii* en Afrique de l'Ouest, en relation avec les mutations du canal sodique voltage-dépendant (N1575Y et L1014F) (Mitchell *et al.*, 2014).

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, dont l'objectif était de faciliter l'identification rapide de la résistance métabolique de *A. gambiae* s.l. aux insecticides au Cameroun et d'élucider les bases moléculaires de ce type de mécanisme en développant des outils de diagnostic simples pour la détection et le suivi de cette résistance sur le terrain, plusieurs conclusions importantes ont été tirées.

Toutes les espèces d'anophèles collectées pendant notre étude ont montré une résistance confirmée à tous les insecticides testés, avec des niveaux d'intensités élevés pour la classe des pyréthrinoïdes, principalement à la perméthrine. Cette résistance est associée à une baisse de l'efficacité des MILDA sans synergiste PBO. De plus, cette résistance à la perméthrine a montré une dynamique temporelle liée à la variation saisonnière de la pression de sélection exercée sur ces vecteurs de paludisme dans les gîtes larvaires. Cette information est cruciale pour la mise en œuvre des programmes de lutte antivectorielle, notamment dans le choix des types de MILDA à déployer, ou de toute autre activité de lutte antivectorielle, afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. Une période de moindre résistance associée à des densités de vecteurs plus faibles sera idéale pour mettre en œuvre des activités de lutte antivectorielle.

Les monooxygénases à cytochrome P450 jouent un rôle dans la résistance métabolique des échantillons testés. Une surexpression significative des gènes *CYP6M2* et *CYP6P4* a été observée chez les populations testées au cours de cette étude. Cependant, il est possible que d'autres familles d'enzymes ou mécanismes soient impliqués dans cette résistance observée chez ces moustiques sauvages. Ce résultat est renforcé par la présence de la mutation *kdr-1014F* à des fréquences élevées chez les deux espèces de moustiques étudiées.

Dans les échantillons d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae*, l'analyse génétique de ces deux cytochromes P450 surexprimés a révélé des différences importantes entre les moustiques R₉₀ et les S₂₀, avec la présence de la mutation A/T-273 dans la région promotrice du gène *CYP6P4* d'*A. gambiae* qui semble être liée à une diminution importante des paramètres de diversité génétique. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier.

Des marqueurs moléculaires A/T-273, C/T144-CYP6P4, C168S-CYP6P4, ont été identifiés dans le gène *CYP6P4* chez *A. gambiae*. Ces marqueurs méritent d'être approfondis dans le contexte de la résistance des anophèles au Cameroun. Cependant, aucun marqueur moléculaire associé à la résistance n'a été trouvé dans le gène *CYP6M2* chez les deux espèces étudiées, ce qui confirme les résultats des études précédentes. Ces résultats confortent également l'hypothèse selon laquelle les populations à travers le continent en général et le Cameroun en particulier n'expriment pas les mêmes allèles pour un gène donné.

À l'issue de ces travaux nous recommandons :

- aux populations humaines camerounaise, une utilisation rationnelle des pesticides agricoles en période d'intensification des cultures, surtout pendant la saison des pluies. Le but de cette mesure est de réduire la sélection des souches de plus en plus résistante ;
- aux chercheurs, d'accentuer des approches multidisciplinaires sur les régions promotrices des gènes de détoxification en prenant en compte les résultats issus de ce travail, afin d'approfondir les recherches permettant de mieux comprendre les phénomènes de résistance des vecteurs et la persistance du paludisme dans notre contexte ;
- aux pouvoirs publics, d'intégrer les approches de génomiques dans les programmes de surveillance entomologique en prenant en compte les différentes mutations identifiées dans ce travail mais également en prenant en compte la saisonnalité.

Dans nos travaux futurs, nous nous proposons :

- d'étendre cette étude aux nouveaux insecticides avec lesquels on imprègne les moustiquaires, ainsi qu'aux nouvelles génération de moustiquaires, en utilisant des techniques de génomiques. Cette approche permettra d'avoir une vue globale des adaptations génétiques et physiologique responsables de la survie des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. après exposition aux insecticides ;
- de surveiller constamment l'évolution de ces principaux gènes métaboliques en utilisant des techniques d'étude du génome entier. L'objectif sera d'évaluer la contribution de ces gènes dans la résistance croisée avec les autres classes d'insecticides, ainsi que les nouvelles classes d'insecticides ;
- d'évaluer *in vitro* l'impact des différentes mutations identifiées dans les régions promotrices des différents gènes surexprimés dans un contexte de résistance sur la compétence du moustique, à l'aide de la méthode de RNA-interférence et de CRISPR-cas9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abiy, E., Gebre-Michael, T., Balkew, M., Medhin, G. (2015). Repellent efficacy of DEET, Mygga, neem (*Azadirachta indica*) oil and chinaberry (*Melia azedarach*) oil against *Anopheles arabiensis*, the principal malaria vector in Ethiopia. *Malaria Journal* 14, 1-6.
- Achoundong, G. (1996). Les forêts sommitales au Cameroun : végétation et flore des collines de Yaoundé. *Bois et Forêts Des Tropiques* 247, 37-53.
- 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.
- Aguilar, R., Simard, F., Kamdem, C., Shields, T., Glass, G.E., Garver, L.S., Dimopoulos, G. (2010). Genome-wide analysis of transcriptomic divergence between laboratory colony and field *Anopheles gambiae* mosquitoes of the M and S molecular forms. *Insect Molecular Biology* 19, 695-705.
- Ahnad, 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 Scienc* formerly *Pesticide Science* 62, 805-810.
- Akogbéto, M.C., Djouaka, R.F., Kindé-Gazard, D.A. (2006). Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malaria Journal* 5, 1-9.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 59, 205-224.
- Alphey, L., Nimmo, D., O'Connell, S., Alphey, N. (2008). Insect population suppression using engineered insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 627, 93-103.
- Antonio-Nkondjio, C., Doumbe-Belisse, P., Djamouko-Djonkam, L., Ngadjju, C., Talipouo, A., Kopya, E., Bamou, R., Mayi, M.A., Sonhafouo-Chiana, N., Nkahe, D. (2021). High efficacy of microbial larvicides for malaria vectors control in the city of Yaounde Cameroon following a cluster randomized trial. *Scientific Reports* 11, 17101-17115.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J.D., Awono-Ambene, P., Etang, J., Ekobo, A.S., Wondji, C.S. (2019). Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors* 12, 1-23.
- Antonio-Nkondjio, C., Sonhafouo-Chiana, N., Ngadjju, C.S., 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.

- Antonio-Nkondjio, C., Poupardin, R., Tene-Fossog, B., Kopya, E., Costantini, C., Awono-Ambene, P., Wondji, C.S. (2016). Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria Journal* 15, 1-11.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Costantini, C., Awono-Ambene, P., Fontenille, D., Simard, F. (2009). Distribution and larval habitat characterization of *Anopheles moucheti*, *Anopheles nili*, and other malaria vectors in river networks of southern Cameroon. *Acta Tropica* 112, 270-276.
- Antonio-Nkondjio, C., Atangana, J., Ndo, C., Awono-Ambene, P., Fondjo, E., Fontenille, D., Simard, F. (2008a). Malaria transmission and rice cultivation in Lagdo, northern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, 352-359.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Kengne, P., Mukwaya, L., Awono-Ambene, P., Fontenille, D., Simard, F. (2008b). Population structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in the equatorial forest region of Africa. *Malaria Journal* 7, 1-10.
- Antonio-Nkondjio, C., Kerah, C.H., Simard, F., Awono-Ambene, P., Chouaibou, M., Tchuinkam, T., Fontenille, D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology* 43, 1215-1221.
- Antonio-Nkondjio, C., Simard, F., Awono-Ambene, P., Ngassam, P., Toto, J.-C., Tchuinkam, T., Fontenille, D. (2005). Malaria vectors and urbanization in the equatorial forest region of south Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99, 347-354.
- Awolola, T., Oduola, A., Obansa, J., Chukwurar, N., Unyimadu, J. (2007). *Anopheles gambiae* s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases* 44, 241-244.
- Awono-Ambene, H., Kengne, P., Simard, F., Antonio-Nkondjio, C., Fontenille, D. (2004). Description and bionomics of *Anopheles* (*Cellia*) *ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *Journal of Medical Entomology* 41, 561-568.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* 27, 68-74.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., Macclean, M., Blomquist, G., J., Tittiger, C., Juárez, M., P., Mijailovsky, S., J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G., J., Vontas, J. (2016). Cytochrome P450 associated with

- insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 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, 741-753.
- Bass, C., Nikou, D., Donnelly, M.J., Williamson, M.S., Ranson, H., Ball, A., Vontas, J., Field, L.M. (2007). Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal* 6, 111-124.
- 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.
- Bhatt, S., Weiss, D.J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K.E., Moyes, C.L., Henry, A., Eckhoff, P.A., Wenger, E.A., Briet, O., Penny, M.A., Smith, T.A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T.P., Griffin, J.T., Fergus, C.A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J.M., Murray, C.L., Smith, D.L., Hay, S.I., Cibulskis, R.E., Gething, P.W. (2015). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526, 207-211.
- Bigoga, J.D., Manga, L., Titanji, V.P.K., Etang, J., Coetzee, M., Leke, R.G.F. (2007). Susceptibility of *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) to pyrethroids, DDT and carbosulfan in coastal Cameroon. *African Entomology* 15, 133-139.
- Binyang, A.J., Elanga-Ndille, E., Tene-Fossog, B., Ndo, C., Nouage, L., Assatse, T., Fotso-Toguem, Y., Tabue, R., Zeukeng, F., Nguiffo, D.N. (2022). Distribution of acetylcholinesterase (Ace-1R) target-site G119S mutation and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae sensu lato* populations from Cameroon. *Parasites & Vectors* 15, 1-13.
- BNS-MINEPAT (2021). Rapport de la troisième enquête camerounaise auprès des ménages (ECAM III) : Analyse des principales tendances socio-économiques au Cameroun de 2001 à 2014., MINEPAT, ed. (Cameroun, Institut National de Statistique), p. 148.
- Bonizzoni, M., Ochomo, E., Dunn, W.A., Britton, M., Afrane, Y., Zhou, G., Hartsel, J., Lee, M.-C., Xu, J., Githeko, A. (2015). RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites & Vectors* 8, 1-13.

- Bradley, J., Rehman, A.M., Schwabe, C., Vargas, D., Monti, F., Ela, C., Riloha, M., Kleinschmidt, I. (2013). Reduced prevalence of malaria infection in children living in houses with window screening or closed eaves on Bioko Island, Equatorial Guinea. *PLoS One* 8, 1-7.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 4, 605-613.
- Brown, A., Pal, R. (1971). *Insecticide resistance in arthropods*, Vol 38, 2nd Edition. Organisation Mondiale de la Santé, Geneva, 491 p.
- Bureau Central des Renseignements et des Etudes de Populations/BUCREP (2016). Projections démographiques et estimations des cibles prioritaires des différents programmes et interventions de santé : p. 26-87.
- Carnevale, P., Robert, V. (2009). *Anopheles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Éditions, Marseille, France : p. 15-292.
- Carnevale, P., Mouchet, J. (2001). La lutte antivectorielle au Cameroun. Passé-présent-avenir. Réflexions. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 94, 202-209.
- Carnevale, P., Baudon, D., Molez, J.-F., Guiguemde, T. (1984). Aspects classiques et modernes des cycles de développement des plasmodiums humains. *Etudes Médicales*, 61-78.
- Carter, A.D. (2014). Are housing improvements an effective supplemental vector control strategy to reduce malaria transmission? A Systematic Review. *Public Health thesis, School of Public Health, Georgia State University, Atlanta, Georgia* : 58 p.
- Carter, J.A., Ross, A.J., Neville, B.G., Obiero, E., Katana, K., Mung'ala-Odera, V., Lees, J.A., Newton, C.R. (2005). Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Tropical Medicine & International Health* 10, 3-10.
- Cattell, J., Faucon, F., Le Péron, B., Sherpa, S., Monchal, M., Grillet, L., Gaude, T., Laporte, F., Dusfour, I., Reynaud, S. (2020). Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evolutionary Applications* 13, 303-317.
- Centre national d'Expertise sur les Vecteurs/CNEV (2014). Utilisation des insecticides et gestion de la résistance, INRA, Rennes, France : 71 p.
- Chambers, G.K., Curtis, C., Millar, C.D., Huynen, L., Lambert, D.M. (2014). DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investigative Genetics* 5, 1-11.
- Chandor-Proust, A., Bibby, J., Régent-KloECKner, M., Roux, J., Guittard-Crilat, E., Poupardin, R., Riaz, M.A., Paine, M., Dauphin-Villemant, C., Reynaud, S. (2013). The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochemical Journal* 455, 75-85.

- Chandre, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S., Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivoracious fish. *Indian Journal of Medical Research* 127, 13-27.
- Chandre, F., Darriet, F., Manguin, S., Brengues, C., Carnevale, P., Guillet, P. (1999). Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15, 53-59.
- Charlwood, J.D., Pinto, J., Sousa, C.A., Ferreira, C., Petrarca, V., do E Rosario, V. (2003). 'A mate or a meal'—Pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Malaria Journal* 2, 1-11.
- 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.
- Choi, L., McIntyre, S., Furnival-Adams, J. (2019). Indoor residual spraying for preventing malaria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1-7.
- Chouaïbou, M., Etang, J., Brévault, T., Nwane, P., Hinzoumbé, C.K., Mimpfoundi, R., Simard, F. (2008). Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Tropical Medicine & International Health* 13, 476-486.
- Christiansen-Jucht, C.D., Parham, P.E., Saddler, A., Koella, J.C., Basáñez, M.-G. (2015). Larval and adult environmental temperatures influence the adult reproductive traits of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasites & Vectors* 8, 1-12.
- Chung, H., Bogwitz, M.R., McCart, C., Andrianopoulos, A., Ffrench-Constant, R.H., Batterham, P., Daborn, P.J. (2007). Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene Cyp6g1. *Genetics* 175, 1071-1077.
- Clarkson, C.S., Miles, A., Harding, N.J., O'Reilly, A.O., Weetman, D., Kwiatkowski, D., Donnelly, M.J., The *Anopheles gambiae* Genomes (2021). The genetic architecture of target-site resistance to pyrethroid insecticides in the African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Molecular Ecology* 30, 5303-5317.
- Coetzee, M. (2020). Key to the females of Afrotropical *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal* 19, 1-20.
- Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, M.B., Besansky, N.J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619, 246-274.
- Coetzee, M., Fontenille, D. (2004). Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry Molecular Biology and Evolution* 34, 599-605.

- Coluzzi, M., Petrarca, V., di Deco, M.A. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Italian Journal of Zoology* 52, 45-63.
- Combemorel, P. Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*. Planet Vie, <https://planet-vie.ens.fr/auteurs/pascal-combemorel>, Access Date: 16 juin 2023.
- Cox, F.E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 3, 1-9.
- Czeher, C., Labbo, R., Arzika, I., Duchemin, J.-B. (2008). Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malaria Journal* 7, 1-12.
- Dabire, R.K., Namountougou, M., Diabaté, A., Soma, D.D., Bado, J., Toe, H.K., Bass, C., Combary, P. (2014). Distribution and frequency of kdr mutations within *Anopheles gambiae* s.l. populations and first report of the ace. 1 G119S mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PloS One* 9, 1-13.
- Daborn, P., Yen, J., Bogwitz, M., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P. (2002). A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297, 2253-2256.
- 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.
- Danis, M., Mouchet, J. (1991). *Paludisme*, Marketing/Ellipses Edition. Collection Université Francophones de l'UREF, 32, Rue Bague 75015, Paris, 249 p.
- David, J.-P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J.I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 368, 1-12.
- David, J.-P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H. (2005). The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 4080-4084.
- Davies, T., G., Field, L., M., Usherwood, P., N., Williamson, M., S. (2007). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology* 16, 361-375.

- De Meeûs, T. (2012). *Initiation à la génétique des populations naturelles*. IRD éditions: p. 17-111.
- Deletre, E., Schatz, B., Bourguet, D., Chandre, F., Williams, L., Ratnadass, A., Martin, T. (2016). Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. *Chemoecology* 26, 127-142.
- Denisov, I., G., Makris, T., M., Sligar, S., G., Sxhlichting, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* 105, 22532-22278.
- Dia, I., Guelbeogo, M.W., Ayala, D. (2013). Advances and perspectives in the study of the malaria mosquito *Anopheles funestus*, In: Manguin, S. (Ed.) *Anopheles mosquitoes- New insights into malaria vectors*. IntechOpen, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia : p. 197-220.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akoobeto, M., Guiguemde, T.R., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G.J., Hougard, J.M. (2002). The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 617-622.
- Ding, Y., Hawkes, N., Meredith, J., Eggleston, P., Hemingway, J., Ranson, H. (2005). Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochemical Journal* 387, 879-888.
- 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.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbeto, M.C., Ranson, H., Hemingway, J., Strode, C. (2008). Expression of the cytochrome P450s, *CYP6P3* and *CYP6M2* are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics* 9, 1-10.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Bankole, H.S., Doannio, J.M., Coulibaly, O.N., Kossou, H., Tamo, M., Basene, H.I., Popoola, O., Akogbeto, M.C. (2007). Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malaria Journal* 6, 1-10.
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pavesi, G., Mantovani, R. (2009). A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell Cycle* 8, 4127-4137.
- Edi, C.V., Koudou, B.G., Jones, C.M., Weetman, D., Ranson, H. (2012). Multiple-insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, Southern Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 18, 1508-1511.

- Eisenstein, B.I. (1990). The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New England Journal of Medicine* 322, 178-183.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Ndo, C., Binyang, A., Assatse, T., Nguiffo-Nguete, D., Djonabaye, D., Irwing, H., Tene-Fossog, B., Wondji, C.S. (2019). 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.
- Etang, J., Mbida, A.M., Akono, P.N., Binyang, J., Moukoko, C.E.E., Lehman, L.G., Awono-Ambene, P., Talipouo, A., Eyisab, W.E., Tagne, D. (2016). *Anopheles coluzzii* larval habitat and insecticide resistance in the island area of Manoka, Cameroon. *BMC Infectious Diseases* 16, 217.
- Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P., Chouaibou, M., Ndjemai, H., Simard, F. (2006). First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 74, 795-797.
- Etang, J., Manga, L., Chandre, F., Guillet, P., Fondjo, E., Mimpfoundi, R., Toto, J.-c., Fontenille, D. (2003). Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology* 40, 491-497.
- Fadel, A.N., Ibrahim, S.S., Tchouakui, M., Terence, E., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Wanji, S., Wondji, C.S. (2019). A combination of metabolic resistance and high frequency of the 1014F kdr mutation is driving pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii* population from Guinea savanna of Cameroon. *Parasites & Vectors* 12, 1-13.
- Fagbohun, I.K., Oyeniyi, T.A., Idowu, T.E., Otubanjo, O.A., Awolola, S.T. (2019). Cytochrome P450 mono-oxygenase and resistance phenotype in DDT and deltamethrin-resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and *Culex quinquefasciatus* in Kosofe, Lagos, Nigeria. *Journal of Medical Entomology* 56, 817-821.
- Farenhorst, M., Mouatcho, J., Kikankie, C., Brooke, B., Hunt, R., Thomas, M., Koekemoer, L., Knols, B., Coetzee, M. (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Science* 106, 17443-17447.
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Roselló, L., Albà, M.M., Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research Journal* 31, 3651-3653.

- Ferguson, H.M., Dornhaus, A., Beeche, A., Borgemeister, C., Gottlieb, M., Mulla, M.S., Gimnig, J.E., Fish, D., Killeen, G.F. (2010). Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS Medicine* 7, 1-7.
- Feyereisen, R. (2015). Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. *Pest Management Science* 71, 793-800.
- Floore, T.G. (2006). Mosquito larval control practices: past and present. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22, 527-533.
- Foote, R.H., Cook, D.R. (1959). *Mosquitoes of medical importance*. Agricultural Research Service US Department of Agriculture : p. 6-11.
- Fourmier, D. (2005). Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-biological Interactions* 157, 257-261.
- Fu, Y.-X., Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Gabrieli, P., Smidler, A., Catteruccia, F. (2014). Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases. *Genome Biology* 15, 535.
- Gallup, Sachs (2001). The Economic Burden of Malaria, In: Breman, Egan, Keusch (Eds.) *The Intolerable Burden of Malaria: A New Look at the Numbers*. Northbrook (IL): American Society of Tropical Medicine and Hygiene : p. 85-96.
- Gatton, M., L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M., J., Ghani, A., C., Gadfray, H., C., J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H. (2013). The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 67, 1218-1230.
- Gething, P.W., Casey, D.C., Weiss, D.J., Bisanzio, D., Bhatt, S., Cameron, E., Battle, K.E., Dalrymple, U., Rozier, J., Rao, P.C. (2016). Mapping Plasmodium falciparum mortality in Africa between 1990 and 2015. *New England Journal of Medicine* 375, 2435-2445.
- Gillies, M. (1953). The duration of the gonotrophic cycle in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*, with a note on the efficiency of hand catching. *East African Medical Journal* 30, 129-135.
- Gillies, M.T., De Meillon, B. (1968). *The anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*, Vol 54, 2nd Edition. South African Institute for Medical Research, Johannesburg : p. 105-119.
- Gimonneau, G., Bouyer, J., Morand, S., Besansky, N.J., Diabate, A., Simard, F. (2010). A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behavioral Ecology* 21, 1087-1092.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S., Benelli, G. (2015a). Ovicidal activity of *Pithecellobium dulce* (Family: Fabaceae) leaf and seed extracts against filariasis vector

- mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medicinal Herbs Ethnomedicine* 1, 116-119.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S., Bhattacharyya, A., Benelli, G., Amsath, A. (2015b). Mosquito repellent activity of *Delonix elata* (fabaceae) leaf and seed extracts against the primary dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Pure and Applied Zoology* 3, 312-317.
- Grover, A., Sharma, P.C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 290-302.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hammock, B. (1985). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Pergamon Press, New York Edition : p. 431-472.
- Harbach, R. (2013). The Phylogeny and Classification of Anopheles, In: Manguin, S. (Ed.) *Anopheles mosquitoes: New insights into malaria vectors*. IntechOpen : p. 1-55.
- Harbach, R. Genus *Anopheles* Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory. <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/subgenus-anopheles-meigen-1818>, Access Date: 04 Février 2022.
- Hardstone, M., Leichter, C., Scott, J. (2009). Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 416-423.
- Harris, C., Lambrechts, L., Rousset, F., Abate, L., Nsango, S.E., Fontenille, D., Morlais, I., Cohuet, A. (2010). Polymorphisms in *Anopheles gambiae* immune genes associated with natural resistance to *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens* 6, 1-12.
- Harrop, T.W., Sztal, T., Lumb, C., Good, R.T., Daborn, P.J., Batterham, P., Chung, H. (2014). Evolutionary changes in gene expression, coding sequence and copy-number at the *cyp6g1* locus contribute to resistance to multiple insecticides in *Drosophila*. *PLoS One* 9, 1-8.
- Hawley, W.A., Phillips-Howard, P.A., ter Kuile, F.O., Terlouw, D.J., Vulule, J.M., Ombok, M., Nahlen, B.L., Gimnig, J.E., Kariuki, S.K., Kolczak, M.S., Hightower, A.W. (2003). Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 121-127.
- Hemingway, J. (2014). The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 369, 1-5.

- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 653-665.
- Hemingway, J., Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371-391.
- 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.
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.C., Wides, R. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149.
- Hu, B., Huang, H., Hu, S., Ren, M., Wei, Q., Tian, X., Abdalla Elzaki, M.E., Bass, C., Su, J., Palli, S.R. (2021). Changes in both trans- and cis-regulatory elements mediate insecticide resistance in a lepidopteron pest, *Spodoptera exigua*. *PloS Genetics* 17, 1-22.
- Ibrahim, S.S., Ndula, M., Riveron, J.M., Irving, H., Wondji, C.S. (2016a). The P450 *CYP6Z1* confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Molecular Ecology* 25, 3436-3452.
- Ibrahim, S.S., Riveron, J.M., Stott, R., Irving, H., Wondji, C.S. (2016b). The cytochrome P450 *CYP6P4* is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 68, 23-32.
- 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, 1-25.
- Imbahale, S.S., Githeko, A., Mukabana, W.R., Takken, W. (2012). Integrated mosquito larval source management reduces larval numbers in two highland villages in western Kenya. *BMC Public Health* 12, 362-371.
- Ingham, V.A., Elg, S., Nagi, S.C., Dondelinger, F. (2021). Capturing the transcription factor interactome in response to sub-lethal insecticide exposure. *Current Research in Insect Science* 1, 1-12.
- Ingham, V.A., Pignatelli, P., Moore, J.D., Wagstaff, S., Ranson, H. (2017). The transcription factor Maf-S regulates metabolic resistance to insecticides in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *BMC genomics* 18, 1-11.

- Institut National de la Statistique et The DHS Program/INS/ICF (2020). Enquête Démographique et de Santé du Cameroun 2018, Yaoundé, Cameroun et Rockville, Maryland, USA : p. 297-325.
- Islam, J., Zaman, K., Duarah, S., Raju, P.S., Chattopadhyay, P. (2017). Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. *Acta Tropica* 167, 216-230.
- Jones, C., M., Liyanapathirana, M., Agossa, F., R., Weetman, D., Ranson, H., Donnelly, M., J., Wilding, C., S. (2012a). Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6614-6619.
- Jones, C.M., Toé, H.K., Sanou, A., Namountougou, M., Hughes, A., Diabaté, A., Dabiré, R., Simard, F., Ranson, H. (2012b). Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS One*.
- Kalsi, M., Palli, S.R. (2015). Transcription factors, *CncC* and *Maf*, regulate expression of CYP6BQ genes responsible for deltamethrin resistance in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry Molecular Biology and Evolution* 65, 47-56.
- Kalsi, M., Palli, S.R. (2017). Transcription factor *cap n collar C* regulates multiple cytochrome P450 genes conferring adaptation to potato plant allelochemicals and resistance to imidacloprid in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry Molecular Biology and Evolution* 83, 1-12.
- Kamdem, C., Fossog, B.T., Simard, F., Etouna, J., Ndo, C., Kengne, P., Boussès, P., Etoa, F.-X., Awono-Ambene, P., Fontenille, D. (2012). Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 7, 1-12.
- Killeen, G.F., Masalu, J.P., Chinula, D., Fotakis, E.A., Kavishe, D.R., Malone, D., Okumu, F. (2017). Control of malaria vector mosquitoes by insecticide-treated combinations of window screens and eave baffles. *Emerging Infectious Diseases* 23, 782-789.
- Kirby, M.J., Ameh, D., Bottomley, C., Green, C., Jawara, M., Milligan, P.J., Snell, P.C., Conway, D.J., Lindsay, S.W. (2009). Effect of two different house screening interventions on exposure to malaria vectors and on anaemia in children in The Gambia: a randomised controlled trial. *The Lancet* 374, 998-1009.
- Kojom Foko, L.P., Kumar, A., Hawadak, J., & Singh, V. (2023). *Plasmodium cynomolgi* in humans: current knowledge and future directions of an emerging zoonotic malaria parasite. *Infection*, 51(3), 623-640.

- Kopya, E., Ndo, C., Djamouko-Djonkam, L., Nkahe, L., Awono-Ambene, P., Njiokou, F., Wondji, C.S., Antonio-Nkondjio, C. (2021). *Anopheles lesoni* Evans 1931, a Member of the *Anopheles funestus* Group, Is a Potential Malaria Vector in Cameroon. *Advances in Entomology* 10, 99-109.
- Kouamo, M., Mersimine, F., Ibrahim, S.S., Hearn, J., Riveron, M., Jacob, Kusimo, M., Tchouakui, M., Ebai, T., Tchapga, W., Wondji J., M., Irving, H., Boudjeko, T., Boyom F., F., Wondji, S., Charles (2020). 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* 12, 1-17.
- Krishnan, P., Meile, L., Plissonneau, C., Ma, X., Hartmann, F.E., Croll, D., McDonald, B.A., Sánchez-Vallet, A. (2018). Transposable element insertions shape gene regulation and melanin production in a fungal pathogen of wheat. *BMC Biology* 16, 78-95.
- 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.
- Kwiatkowska, R., Platt, N., Poupardin, R., Irving, H., Dabire, R., Mitchell, S., Jones, C., Diabate, A., Ranson, H., Wondji, C. (2013). Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallee du Kou, Burkina Faso. *Genes* 519, 98–106.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C., Bouizegarene, P., Bogard, M. (2008). DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23, 260-279.
- Lane, R.P., Crosskey, R.W. (2012). *Medical insects and arachnids*. Springer Science & Business Media : p. 120-240.
- Lee, T.-Y., Chang, W.-C., Hsu, J.B.-K., Chang, T.-H., Shien, D.-M. (2012). GPMiner: an integrated system for mining combinatorial cis-regulatory elements in mammalian gene group. *BMC genomics* 13, 1-12.
- Leigh, J.W., Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1110-1116.
- Lengeler, C. (2004). Insecticide-treated nets for malaria control: real gains. *Bulletin of the World Health Organization* 82, 84-84.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231-253.

- Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W., Zhang, X., Wang, H., Hua, W. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods* 8, 1-9.
- Liu, N. (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology* 60, 537-559.
- Liu, Z., Furnier, G. (1993). Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics* 87, 97-105.
- 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.
- 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.
- Lucas, E.R., Miles, A., Harding, N.J., Clarkson, C.S., Lawniczak, M.K., Kwiatkowski, D.P., Weetman, D., Donnelly, M.J., Consortium, A.g.G. (2019). Whole-genome sequencing reveals high complexity of copy number variation at insecticide resistance loci in malaria mosquitoes. *Genome Research* 29, 1250-1261.
- Lwetoijera, D.W., Kiware, S.S., Mageni, Z.D., Dongus, S., Harris, C., Devine, G.J., Majambere, S. (2013). A need for better housing to further reduce indoor malaria transmission in areas with high bed net coverage. *Parasites & Vectors* 6, 1-9.
- Main, B., J., Everitt, A., Cornel, A., J., Hormozdiari, F., Lanzaro, G. (2018). Genetic variation associated with increased insecticide resistance in the malaria mosquito, *Anopheles coluzzii*. *Parasites & Vectors* 11, 1-9.
- Maitra, S., Dombrowski, S.M., Basu, M., Raustol, O., Waters, L.C., Ganguly, R. (2000). Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 248, 147-156.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology* 7, 179-184.
- Matowo, J., Weetman, D., Pignatelli, P., Wright, A., Charlwood, J.D., Kaaya, R., Shirima, B., Moshi, O., Lukole, E., Mosha, J. (2022). Expression of pyrethroid metabolizing P450 enzymes characterizes highly resistant *Anopheles* vector species targeted by successful deployment of PBO-treated bednets in Tanzania. *PloS One* 17, 1-17.

- Mavridis, K., Wipf, N., Medves, S., Erquiaga, I., Muller, P., Vontas, J. (2019). Rapid multiplex gene expression assays for monitoring metabolic resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors* 12, 1-13.
- McLaughlin, L., Niazi, U., Bibby, J., David, J.P., Vontas, J., Hemingway, J., Ranson, H., Sutcliffe, M., Paine, M. (2008). Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. *Insect Molecular Biology* 17, 125-135.
- 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, 143-159.
- 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, 317-326.
- 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, 1-14.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 9828-9832.
- Ministère de la Santé Publique-Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme/MINSANTE-PNLP (2019). *Plan Strategique Nationale de Lutte Contre le Paludisme au Cameroun 2019–2023*, ICF/MEASURE Edition : 117 p.
- Minetti, C., Ingham, V., A. , Ranson, H. (2020). Effects of insecticide resistance and exposure on Plasmodium development in *Anopheles* mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science* 39, 42-49.
- 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., Djogbenou, L., Muskavitch, M.A., Ranson, H., Paine, M.J., Mayans, O., Donnelly, M.J. (2014). Metabolic and target-site mechanisms combine to confer strong DDT resistance in *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 9, 1-10.
- 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.
- MobiliseYourCity (2019). Plan de Mobilité Urbaine Soutenable pour la Communauté Urbaine de Yaoundé : Rapport de synthèse. (Communauté Urbaine de Yaoundé), p. 217.
- Mohammed, B.R., Wilding, C.S., Collier, P.J., Deeni, Y.Y. (2014). Bioinformatic analysis of regulatory elements within the promoter region of the cytochrome P450 Gene, *CYP6M2* in *Anopheles gambiae*. *European Journal of Biotechnology Bioscience*, 24-31.
- 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.
- Morrisette, N.S., Sibley, L.D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews* 66, 21-38.
- 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. (2019). Cis-regulatory CYP6P9b P450 variants associated with loss of insecticide-treated bed net efficacy against *Anopheles funestus*. *Nature Communications* 10, 1-11.
- Müller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., Yawson, A.E., Mitchell, S.N., Ranson, H., Hemingway, J., Paine, M.J., Donnelly, M.J. (2008). Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress *CYP6P3*, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genetics* 4, 1-10.
- Müller, P., Donnelly, M.J., Ranson, H. (2007). Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC genomics* 8, 1-12.
- Mutuku, F.M., Khambira, M., Bisanzio, D., Mungai, P., Mwanzo, I., Muchiri, E.M., King, C.H., Kitron, U. (2013). Physical condition and maintenance of mosquito bed nets in Kwale County, coastal Kenya. *Malaria Journal* 12, 46-59.
- Naciri, M. (2019). La bactérie *Wolbachia* bloque l'infection des moustiques par différents pathogènes humains. *médecine/sciences* 35, 584-585.
- Nájera, J.A., González-Silva, M., Alonso, P.L. (2011). Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Medicine* 8, 1-7.
- Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* 63, 628-633.
- Neafsey, D.E., Christophides, G.K., Collins, F.H., Emrich, S.J., Fontaine, M.C., Gelbart, W., Hahn, M.W., Howell, P.I., Kafatos, F.C., Lawson, D. (2013). The evolution of the *Anopheles* 16 genomes project. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 3, 1191-1194.

- Ngadjeu, C.S., Doumbe-Belisse, P., Talipouo, A., Djamouko-Djonkam, L., Awono-Ambene, P., Kekeunou, S., Toussile, W., Wondji, C.S., Antonio-Nkondjio, C. (2020). Influence of house characteristics on mosquito distribution and malaria transmission in the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria Journal* 19, 53-66.
- Ngnikam, E., Nkouathio, D.G., Pokam, M., Tematio, P. (2020). Caractérisation du régime pluviométrique et modélisation des écoulements dans le bassin versant de la ville de Yaoundé (Cameroun). *Ghana Journal of Geography* 12, 65-80.
- 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. *Parasites & Vectors* 15, 230-244.
- Nguegang, P.A. (2008). L'agriculture urbaine et périurbaine à Yaoundé: analyse multifonctionnelle d'une activité montante en économie de survie. *Université Libre de Bruxelles, Editions universitaires europeennes* : 200 p.
- Njoroge, H., Van't Hof, A., Oruni, A., Pipini, D., Nagi, S.C., Lynd, A., Lucas, E.R., Tomlinson, S., Grau-Bove, X., McDermott, D. (2022). Identification of a rapidly-spreading triple mutant for high-level metabolic insecticide resistance in *Anopheles gambiae* provides a real-time molecular diagnostic for antimalarial intervention deployment. *Molecular Ecology* 31, 4307-4318.
- Nkemngo, N., Francis, M., Mugenzi, M., J., Leon, Terence, E., Niang, A., Wondji J., M., Tchoupo, M., Nguete, N., D., Tchapgwa, W., Irving, H., Ntabi, M., Jacques D., Agonhossou, R., Boussougou-Sambe, T., S., Akoton, R., B., Koukouikila-Koussounda, F., Pinilla, Y.T., Ntoumi, F., Djogbenou, L., S., Ghogomu, S., M., Ndo, C., Adegnika, A., A., Borrmann, S., Wondji, C.S. (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, 146-171.
- Nkwemoh, C.A., Tchindjang, M., Afungang, R.N. (2017). The impact of urbanization on the vegetation of Yaounde,(Cameroon). *International Journal Of Innovative Research & Development* 6, 6-18.
- Nwane, P., Etang, J., Chouaibou, M., Toto, J., Kerah-Hinzoumbe, C., Mimpfoundi, R. (2009). Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. Populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infectious Diseases* 9, 163-172.

- Nwane, P., Etang, J., Chouaibou, M., Toto, J., Koffi, A., Mimpfoundi, R. (2013). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasites & Vectors* 6, 41-54.
- Ogoma, S.B., Lweitoijera, D.W., Ngonyani, H., Furer, B., Russell, T.L., Mukabana, W.R., Killeen, G.F., Moore, S.J. (2010). Screening mosquito house entry points as a potential method for integrated control of endophagic filariasis, arbovirus and malaria vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, 1-8.
- Ohm, J.R., Baldini, F., Barreaux, P., Lefevre, T., Lynch, P.A., Suh, E., Whitehead, S.A., Thomas, M.B. (2018). Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasites & Vectors* 11, 1-9.
- Okumu, F. (2020). The fabric of life: what if mosquito nets were durable and widely available but insecticide-free? *Malaria Journal* 19, 260-288.
- Organisation Mondiale de la Santé/OMS (2021). Dépenses publiques en santé: les tendances mondiales qui se dégagent, , Genève, Suisse : 60 p.
- Organisation Mondiale de la Santé/OMS (2019). *La lutte antivectorielle : Méthode à usage individuel et communautaire*, Genève, Suisse : p. 78-158.
- Organisation Mondiale de la Santé/OMS (2017). *Cadre conceptuel d'un plan national de suivi et de gestion de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme*, Genève, Suisse : 42 p.
- Organisation Mondiale de la Santé/OMS (2014). *Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle : Module de formation à la lutte contre le paludisme*, Genève, Suisse : p. 132-139.
- Overgaard, H.J., Reddy, V.P., Abaga, S., Matias, A., Reddy, M.R., Kulkarni, V., Schwabe, C., Segura, L., Kleinschmidt, I., Slotman, M.A. (2012). Malaria transmission after five years of vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Parasites & Vectors* 5, 1-14.
- Oxborough, R.M. (2016). Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008–2015): urgent need for affordable, long-lasting insecticides. *Malaria Journal* 15, 146-154.
- 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, 264-274.

- Peng, T., Pan, Y., Gao, X., Xi, J., Zhang, L., Yang, C., Bi, R., Yang, S., Xin, X., Shang, Q. (2016). Cytochrome P450 *CYP6DA2* regulated by cap 'n' collar isoform C (CncC) is associated with gossypol tolerance in *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology* 25, 450-459.
- Pennetier, C., Bouraima, A., Chandre, F., Piameu, M., Etang, J., Rossignol, M., Sidick, I., Zogo, B., Lacroix, M.-N., Yadav, R. (2013). Efficacy of Olyset® Plus, a new long-lasting insecticidal net incorporating permethrin and piperonyl-butoxide against multi-resistant malaria vectors. *PLoS One* 8, 135-145.
- Perkins, S.L., Austin, C. (2009). Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: integrating morphology and molecules. *Journal of Parasitology* 95, 424-433.
- Piameu, M., Nwane, P., Toussile, W., Mavridis, K., Wipf, N.C., Kouadio, P.F., Mbakop, L.R., Mandeng, S., Ekoko, W.E., Toto, J.C. (2021a). Pyrethroid and etofenprox resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* from vegetable farms in Yaoundé, Cameroon: dynamics, intensity and molecular basis. *Molecules* 26, 5543-5561.
- Piameu, M., Nwane, P., Toussile, W., Mavridis, K., Wipf, N.C., Kouadio, P.F., Mbakop, L.R., Mandeng, S., Ekoko, W.E., Toto, J.C. (2021b). Pyrethroid and Etofenprox Resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* from Vegetable Farms in Yaoundé, Cameroon: Dynamics, Intensity and Molecular Basis. *Molecules* 26, 5543.
- Pickett, J.A., Birkett, M.A., Logan, J.G. (2008). DEET repels ORNery mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13195-13196.
- Pluess, B., Tanser, F.C., Lengeler, C., Sharp, B.L. (2010). Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, 1-47.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Jones, C.M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., David, J.-P. (2012). Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicology* 114, 49-57.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme/PNLP (2018). Profil entomologique du paludisme du Cameroun : p. 78.
- Protopopoff, N., Mosha, J.F., Lukole, E., Charlwood, J.D., Wright, A., Mwalimu, C.D., Manjurano, A., Mosha, F.W., Kisinza, W., Kleinschmidt, I. (2018). 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. *The Lancet* 391, 1577-1588.
- QIAGEN (2003). *QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*, 78 p.

- Ralph, S.A., Van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S., McFadden, G.I. (2004). Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews Microbiology* 2, 203-216.
- Ranson, H., Lissenden, N. (2016). Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends in Parasitology* 32, 187-196.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology* 27, 91-98.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, 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., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F., H., Hemmigway, J. (2001). 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., 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.
- 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: Manguin, S., Dev, V. (Eds.) *Towards malaria elimination-a leap forward*. IntechOpen : p. 149-175.
- 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., Ibrahim, S.S., Chanda, E., Mzilahowa, T., Cuamba, N., Irving, H., Barnes, K.G., Ndula, M., Wondji, C.S. (2014a). The highly polymorphic *CYP6M7* cytochrome P450 gene partners with the directionally selected *CYP6P9a* and *CYP6P9b* genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *BMC Genomics* 15, 817-835.
- Riveron, J.M., Yunta, C., Ibrahim, S.S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B.D., Ismail, H.M., Hemingway, J., Ranson, H., Albert, A. (2014b). A single mutation in the *GSTe2* gene

- allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome biology* 15, 1-20.
- Riveron, J.M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K.G., Ibrahim, S.S., Paine, M.J.I., 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.
- Robert, V., Carnevale, P. (1984). Les vecteurs des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes Médicales* 2, 79-90.
- Roll Back Malaria/RBM (2015). Housing and Malaria Consensus Statement : 7 p.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34, 3299-3302.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison, C., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z., Della Torre, A. (2008). Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal* 7, 163-173.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.
- Service, M.W (2012). Anopheline mosquitoes (Anophelinae), In: Service, M. (Ed.) *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, Cambridge : p. 34-53.
- Service, M.W. (1993). Sampling the larval population, In: *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. Springer, Dordrecht : p. 75-209.
- Sighomnou, D. (2004). Analyse et redéfinition des régimes climatiques et hydrologiques du Cameroun : perspectivesmd'évolution des ressources en eau. *Université de Yaoundé I* :293 p.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3, 1-34.
- Skovmand, O. (2010). Insecticidal Bednets for the Fight Against Malaria – Present Time and Near Future. *The Open Biology Journal* 3, 92-96.
- Slutsker, L., & Newman, R. D. (2009). Malaria scale-up progress: is the glass half-empty or half-full?. *The Lancet* 373(9657), 11-13.

- Smith, G. (1949). Kern MAD has circumstantial evidence on DDT resistance. In *California Mosquito Control Association, Inc. (Mosquito Buzz)* : 2 p.
- Sougoufoura, S., Doucouré, S., Backé Sembéne, P., M., Harry, M., Sokhna, C. (2017). Challenges for malaria vector control in sub-Saharan Africa: Resistance and behavioral adaptations in *Anopheles* populations. *Journal of Vector Borne Diseases* 54, 4-15.
- Staedke, S.G., Gonahasa, S., Dorsey, G., Kanya, M.R., Maiteki-Sebuguzi, C., Lynd, A., Katureebe, A., Kyohere, M., Mutungi, P., Kigozi, S.P. (2020). Effect of long-lasting insecticidal nets with and without piperonyl butoxide on malaria indicators in Uganda (LLINEUP): a pragmatic, cluster-randomised trial embedded in a national LLIN distribution campaign. *The Lancet* 395, 1292-1303.
- Stevenson, B.J., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P.M., Lian, L.Y., Muller, P., Nikou, D., Steven, A., Hemingway, J., Sutcliffe, M.J., Paine, M.J. (2011). Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 492-502.
- Suchel, B. (1988). *Les climats du Cameroun*. Université de Bordeaux III : 186 p.
- Sutherland, C.J., Tanomsing, N., Nolder, D., Oguike, M., Jennison, C., Pukrittayakamee, S., Dolecek, C., Hien, T.T., Do Rosário, V.E., Arez, A.P. (2010). Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *The Journal of Infectious Diseases* 201, 1544-1550.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Talom, A.D., Tchuinkam, T., Zeukeng, F., Demano, M.L., Kuate, A.F., Lehman, G.L., Djouaka, R. (2020). Susceptibility of *Anopheles gambiae* s.l. to pyrethroid insecticides in vegetable farms in the city of Yaoundé, Cameroon. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8, 1851-1858.
- Taskin, B.G., Dogaroglu, T., Kilic, S., Dogac, E., Taskin, V. (2016). Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pesticide Biochemistry Physiology* 129, 14-27.
- 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, 1-16.
- 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, 5772-5783.
- Tchuinkam, T., Mpoame, M., Make-Mveinhyia, B., Simard, F., Lele-Defo, E., Zebaze-Togouet, S., Tateng-Ngouateu, A., Awono-Ambéné, H-P, Antonio-Nkondjio, C., Njiné, T. & Fontenille, D. (2011). Optimization of breeding output for larval stage of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): prospects for the creation and maintenance of laboratory colony from wild isolates. *Bulletin of entomological research*, 101(3), 259-269.
- Technelysium DNA sequencing software. Chromas. Version 2.6.6. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>, Access Date: Janvier 2019.
- Tene-Fossog, B., Poupardin, R., Costantini, C., Awono-Ambene, P., Wondji, C.S., Ranson, H., Antonio-Nkondjio, C. (2013). Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PLoS One* 8, 1-9.
- Tene-Fossog, B., Kopya, E., Ndo, C., Menze-Djantio, B., Costantini, C., Njiokou, F., Awono-Ambene, P., Antonio-Nkondjio, C. (2012). Water Quality and *Anopheles gambiae* Larval Tolerance to Pyrethroids in the Cities of Douala and Yaounde (Cameroon). *Journal of Tropical Medicine* 2012, 1-10.
- Tene-Fossog, B., Antonio, C.N., Kamdem, C., Bousses, P., Fontenille, D., Besansky, N.J., Costantini, C. (2010). Spatial distribution, habitat characterization and dynamics of *Anopheles gambiae* molecular forms larval biotopes along an urbanization gradient in the city of Yaounde, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 83, 384-385.
- The *Anopheles gambiae* Genomes Consortium/Ag1000g (2017). Genetic diversity of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nature* 552, 96-100.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: 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.
- Townson, H., Nathan, M. B., Zaim, M., Guillet, P., Manga, L., Bos, R., & Kindhauser, M. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(12), 942-947.
- Tusting, L.S., Thwing, J., Sinclair, D., Fillinger, U., Gimnig, J., Bonner, K.E., Bottomley, C., Lindsay, S.W. (2013). Mosquito larval source management for controlling malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1-88.

- Twohig, K.A., Pfeffer, D.A., Baird, J.K., Price, R.N., Zimmerman, P.A., Hay, S.I., Gething, P.W., Battle, K.E., Howes, R.E. (2019). Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa. *PLoS neglected tropical diseases* 13, 1-16.
- Uhel, F., Zafrani, L. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation* 28, 464-472.
- United States Agency for International Development/USAID (2020). U.S. President's Malaria Initiative. Malaria operational plan FY 2020. (Cameroon, USAID/PMI (www.pmi.gov)) : 124 p.
- Van Dooren, G.G., Kennedy, A.T., McFadden, G.I. (2012). The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. *Antioxidants & Redox Signaling* 17, 634-656.
- Vontas, J., Grigoraki, L., Morgan, J., Tsakireli, D., Fuseini, G., Segura, L., Niemczura de Carvalho, J., Nguema, R., Weetman, D., Slotman, M.A., Hemingway, J. (2018). Rapid selection of a pyrethroid metabolic enzyme *CYP9K1* by operational malaria control activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 4619-4624.
- Wagah, M.G., Korlević, P., Clarkson, C., Miles, A., Lawniczak, M.K., Makunin, A. (2021). Genetic variation at the *Cyp6m2* putative insecticide resistance locus in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Malaria Journal* 20, 1-13.
- Walter Reed Biosystematics Unit/WRBU *Anopheles moucheti* Evans, 1923: Afrotropical Region. <http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/moucheti>, Access Date: 26 juin 2022.
- 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 Molecular Biology and Evolution* 138, 1-12.
- Wang, L., Nomura, Y., Du, Y., Liu, N., Zhorov, B., S., Dong, K. (2015). A mutation in the intracellular loop III/IV of mosquito sodium channel synergizes the effect of mutations in helix IIS6 on pyrethroid resistance. *Molecular Pharmacology* 87, 421-429.
- 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, 1-13.
- Weetman, D., Djogbenou, L.S., Lucas, E. (2018a). Copy number variation (CNV) and insecticide resistance in mosquitoes: evolving knowledge or an evolving problem? *Current Opinion in Insect Science* 27, 82-88.

- Weetman, D., Wilding, C.S., Neafsey, D.E., Müller, P., Ochomo, E., Isaacs, A.T., Steen, K., Rippon, E.J., Morgan, J.C., Mawejje, H.D. (2018b). Candidate-gene based GWAS identifies reproducible DNA markers for metabolic pyrethroid resistance from standing genetic variation in East African *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports* 8, 1-12.
- Wéry, M. (1995). Les plasmodiums parasites de l'homme - Paludisme ou Malaria, In : *Protozoologie médicale*. De Boeck, Universités francophones : 273 p.
- Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M. (2008). Analysis of global pesticide resistance in arthropods, In: *Global pesticide resistance in arthropods*. Cabi, K by Cromwell Press, Trowbridge : 165 p.
- Wheelock, C., E., Shan, G., Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science* 30, 75-83.
- White, M.T., Conteh, L., Cibulskis, R., Ghani, A.C. (2011). Costs and cost-effectiveness of malaria control interventions - a systematic review. *Malaria Journal* 10, 337-350.
- White, N.J. (2011). Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. *Malaria Journal* 10, 1-36.
- Wilding, C.S. (2018). Regulating resistance: *CncC*: *Maf*, antioxidant response elements and the overexpression of detoxification genes in insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* 27, 89-96.
- Williams, J., Cowlishaw, R., Sanou, A., Ranson, H., Grigoraki, L. (2022). In vivo functional validation of the V402L voltage gated sodium channel mutation in the malaria vector *An. gambiae*. *Pest Management Science* 78, 1155-1163.
- Wondji, C.S., Dabire, R., K., Tukr, Z., Irving, H., Djouaka, R., Moran, J., C. (2011). Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 484-491.
- 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.
- Wondji, C.S., Morgan, J., Coetzee, M., Hunt, R.H., Steen, K., Black, W.C., Hemingway, J., Ranson, H. (2007). Mapping a quantitative trait locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *BMC Genomics* 8, 34-47.
- Wondji, C.S., Simard, F., Petrarca, V., Etang, J., Santolamazza, F., Torre, A.D., Fontenille, D. (2005). Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with

- special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Journal of Medical Entomology* 42, 998-1005.
- World Health Organization/WHO (2023a). *Malaria report 2023*. Geneva, Suisse : p. 68-98.
- World Health Organization/WHO Prequalification (2023b). Prequalified Vector Control Products. <https://extranet.who.int/prequal/vector-control-products>, Access Date: 18 juin 2023.
- World Health Organization/WHO (2022a). *Malaria report 2022*. Geneva, Suisse : p. 90-108.
- World Health Organization/WHO (2022b). Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions. Geneva, Suisse : 70 p.
- World Health Organization/WHO (2021). *Malaria report 2021*. Geneva, Suisse : p. 78-101.
- World Health Organization/WHO (2019a). *Malaria report 2019*. Geneva, Suisse : p. 46-55.
- World Health Organization/WHO (2019b). Guidelines for malaria vector control. Geneva, Suisse : 161 p.
- World Health Organization/WHO (2018). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*, Second Edition. Geneva, Suisse : 54 p.
- World Health Organization/WHO (2017). *Malaria report 2017*. Geneva, Suisse : p. 32-43
- World Health Organization/WHO (2015). *Global technical strategy for malaria 2016-2030*. Geneva, Suisse : 40 p.
- World Health Organization/WHO (2013a). *Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets*. Geneva, Suisse : 102 p.
- World Health Organization/WHO (2013b). *Malaria entomology and vector control: guide for participants*. Geneva, Suisse : 190 p.
- World Health Organization/WHO (2012a). *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors: executive summary*. Geneva, Suisse : 131 p.
- World Health Organization/WHO (2012b). *Handbook for integrated vector management*. Geneva, Suisse : 78 p.
- World Health Organization/WHO (2006). Indoor residual spraying : use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination : WHO position statement. WHO (Ed.) : 10 p.
- World Health Organization/WHO (1998). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces: report of the WHO informal consultation, Geneva, Suisse : 46 p.
- Worrall, E., Fillinger, U. (2011). Large-scale use of mosquito larval source management for malaria control in Africa: a cost analysis. *Malaria Journal* 10, 338-358.

- Wray, G.A. (2007). The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics* 8, 206-216.
- 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.
- Yadouleton, A.W.M., Asidi, A., Djouaka, R.F., Braïma, J., Agossou, C.D., Akogbeto, M.C. (2009). Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal* 8, 1-8.
- Yahouédo, G.A., Cornelie, S., Djègbè, I., Ahlonsou, J., Aboubakar, S., Soares, C., Akogbéto, M., Corbel, V. (2016). Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasites & vectors* 9, 1-9.
- Yang, H.-B., Kang, W.-H., Nahm, S.-H., Kang, B.-C. (2015). Methods for Developing Molecular Markers, In: Koh, H.-J., Kwon, S.-Y., Thomson, M. (Eds.) *Current Technologies in Plant Molecular Breeding: A Guide Book of Plant Molecular Breeding for Researchers*. Springer Netherlands, Dordrecht : p. 15-50.
- Yao, F.A., Millogo, A.-A., Epopa, P.S., North, A., Noulin, F., Dao, K., Drabo, M., Guissou, C., Kekele, S., Namountougou, M.J.N.C. (2022). Mark-release-recapture experiment in Burkina Faso demonstrates reduced fitness and dispersal of genetically-modified sterile malaria mosquitoes. *Nature Communications* 13(1), 1-11.
- Yewhalaw, D., Wassie, F., Steurbaut, W., Spanoghe, P., Van Bortel, W., Denis, L., Tessema, D.A., Getachew, Y., Coosemans, M., Duchateau, L. (2011). Multiple insecticide resistance: an impediment to insecticide-based malaria vector control program. *PLoS One* 6, 1-7.
- Yunta, C., Hemmings, K., Stevenson, B., Koekemoer, L., L., Matambo, T., Pignatelli, P., Voice, M., Nász, S., Paine, M.J.I. (2019a). Cross-resistance profiles of malaria mosquito P450s associated with pyrethroid resistance against WHO insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 161, 61-67.
- Yunta, C., Hemmings, K., Stevenson, B., Koekemoer, L.L., Matambo, T., Pignatelli, P., Voice, M., Nász, S., Paine, M.J. (2019b). Cross-resistance profiles of malaria mosquito P450s associated with pyrethroid resistance against WHO insecticides. *Pesticide biochemistry and physiology* 161, 61-67.
- Zhu, F., Lavine, L., O'Neal, S., Lavine, M., Foss, C., Walsh, D. (2016). Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects* 7, 1-26.

ANNEXES

Annexe 1 : Clairance éthique

a) Autorisation du Comité National Ethique pour la Recherche en Santé Humaines

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

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

N° 2019/10/~~1195~~CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 24 octobre 2019

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session ordinaire du 1^{er} octobre 2019, a examiné le projet de recherche intitulé: «**Molecular markers of metabolic resistance to pyrethroids in *Anopheles coluzzii*, major malaria vector**» soumis par le Docteur TENE FOSSOG Billy, Investigateur Principal, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID).

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'identifier les marqueurs moléculaires de la résistance métabolique chez *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* du Cameroun qui peuvent être utilisés pour identifier les facteurs de résistance aux insecticides chez ces vecteurs et mesurer l'impact de la résistance sur les interventions de lutte antivectorielle. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. La notice d'information et les formulaires de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

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

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

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

Ampliations

- MINSANTE

Le Président

Pr Lazare KAPTUE

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

b) Autorisation du comité d'éthique institutionnel de la *Liverpool School of Tropical Medicine* (protocole de recherche 19-011)

Prof. Charles Wondji
Liverpool School of Tropical Medicine
Pembroke Place
Liverpool L3 5QA



Wednesday, 13 November 2019

Dear, Prof Wondji

Re. Research Protocol (19-011) Molecular markers of metabolic resistance to pyrethroids in *Anopheles coluzzii*, major malaria vector

Thank you for your letter providing the necessary in-country approvals for this project. I can confirm that the protocol now has formal ethical approval from the LSTM Research Ethics Committee.

The approval is for a fixed period of three years and will therefore expire on 12th November 2022. The Committee may suspend or withdraw ethical approval at any time if appropriate.

Approval is conditional upon:

- Continued adherence to all in-country ethical requirements.
- Notification of all amendments to the protocol for approval before implementation.
- Notification of when the project actually starts.
- Provision of an annual update to the Committee.
Failure to do so could result in suspension of the study without further notice.
- Reporting of new information relevant to patient safety to the Committee
- Provision of Data Monitoring Committee reports (if applicable) to the Committee

Failure to comply with these requirements is a breach of the LSTM Research Code of Conduct and will result in withdrawal of approval and may lead to disciplinary action. The Committee would also like to receive copies of the final report once the study is completed. Please quote your Ethics Reference number with all correspondence.

Yours sincerely

Chair
Graham Devereux
LSTM Research Ethics Committee

Annexe 2 : Table des codes d'ambiguïté des nucléotides de l'ADN

Code IUPAC	Correspondance	Base complémentaire
A	A	T
C	C	G
G	G	C
T/U	T	A
M	A ou C	K
R	A ou G	Y
W	A ou T	W
S	C ou G	S
Y	C ou T	R
K	G ou T	M
V	A ou C ou G	B
H	A ou C ou T	D
D	A ou G ou T	H
B	C ou G ou T	V
N	G ou A ou T ou C	V

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

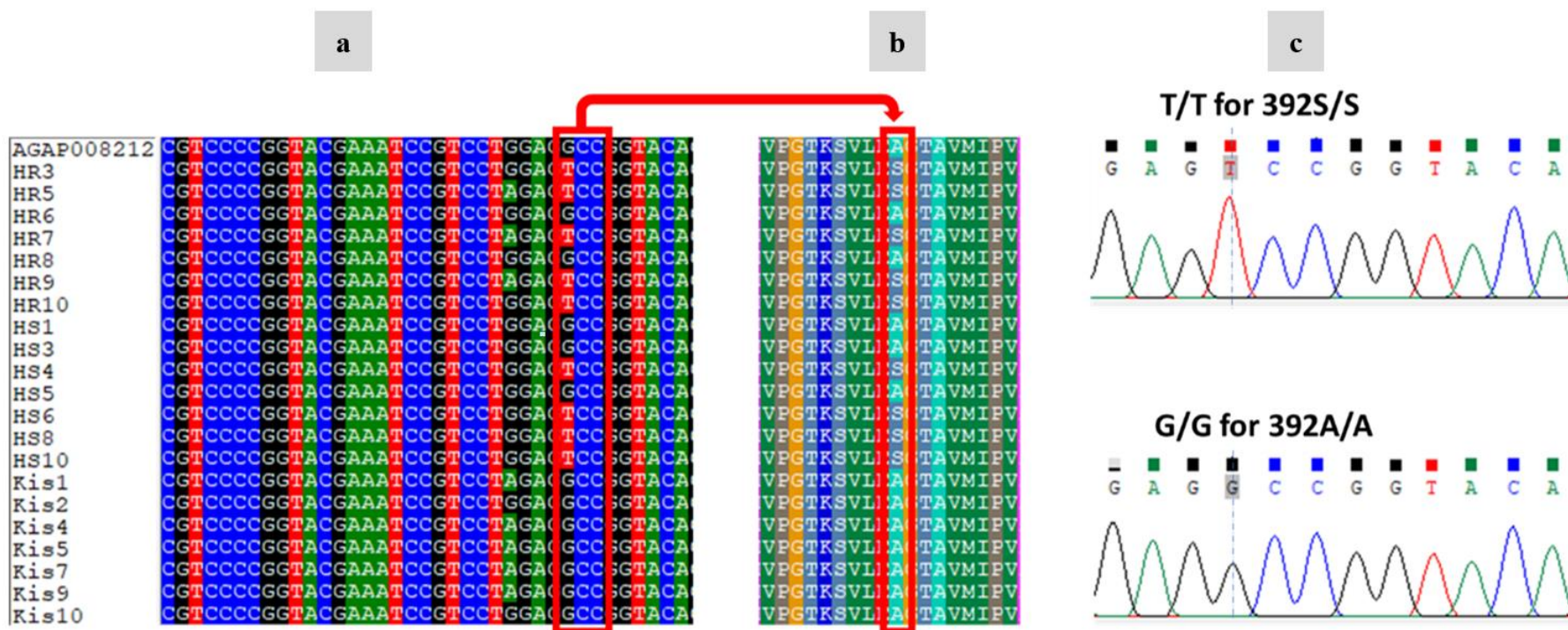
Annexe 3 : Taux de mortalités enregistrées pour les pyréthrinoïdes au cours des quatre saisons à Etoa-Meki (*A. coluzzii*) et Nkolondom (*A. gambiae*) en 2019 et 2020.

Espèces	Année	Saison	Deltaméthrine (1X : DC)	Deltaméthrine (5X)	Deltaméthrine (10X)	PBO+Deltaméthrine (1X : DC)	Perméthrine (1X : DC)	Perméthrine (5X)	Perméthrine (10X)	PBO+Perméthrine (1X : DC)
<i>A. coluzzii</i>	2019	GSS		-	-	-	-	-	-	-
		GSP		-	-	-	-	-	-	-
		PSS	7,92	-	-	-	1,65	58,26	83,50	24,34
		PSP		-	-	-	9,73	64,57	84,03	31,83
		Moyenne	7,92	-	-	-	5,69	61,42	83,77	28,08
	2020	GSS	14,83	-	-	-	10,84	91,43	100,00	63,14
		GSP		-	-	-	18,94	75,26	95,90	39,65
		PSS		-	-	-	-	-	-	-
		PSP	33,64	-	-	-	2,46	48,54	78,96	23,82
		Moyenne	23,24	-	-	-	10,75	71,74	91,62	42,20
	2019 - 2020	GSS	14,83	-	-	-	10,84	91,43	100,00	63,14
		GSP		-	-	-	18,94	75,26	95,90	39,65
		PSS	25,06	-	-	-	2,11	54,37	81,23	23,99
		PSP		-	-	-	9,73	64,57	84,03	31,83
		Moyenne	19,95	-	-	-	10,40	71,41	90,29	39,65
<i>A. gambiae</i>	2019	GSS	7,50	-	-	-	1,00	-	-	-
		GSP		-	-	-	-	-	-	-
		PSS		-	-	-	9,98	-	-	19,64
		PSP		-	-	-	-	-	-	-
		Moyenne	7,50	-	-	-	5,49	-	-	19,64
	2020	GSS	36,94	-	-	-	18,81	99,17	-	76,92
		GSP	21,14	-	-	-	10,70	-	-	22,00
		PSS	3,53	-	77,50	-	4,76	57,83	96,33	-
		PSP	2,27	29,88	79,50	79,38	3,75	79,32	-	-
		Moyenne	15,97	29,88	78,50	79,38	9,51	78,77	96,33	49,46
	2019 - 2020	GSS	22,22	-	-	-	11,69	99,17	-	76,92
		GSP	21,14	-	-	-	10,70	-	-	22,00
		PSS	3,53	-	77,50	-	8,24	57,83	96,33	19,64
		PSP	2,27	29,88	79,50	79,38	3,75	79,32	-	-
		Moyenne	12,29	29,88	78,50	79,38	8,59	78,77	96,33	39,52

Annexe 4 : Séquence et température d'hybridation des amorces spécifiques des régions promotrices et géniques de *CYP6M2* et *CYP6P4*

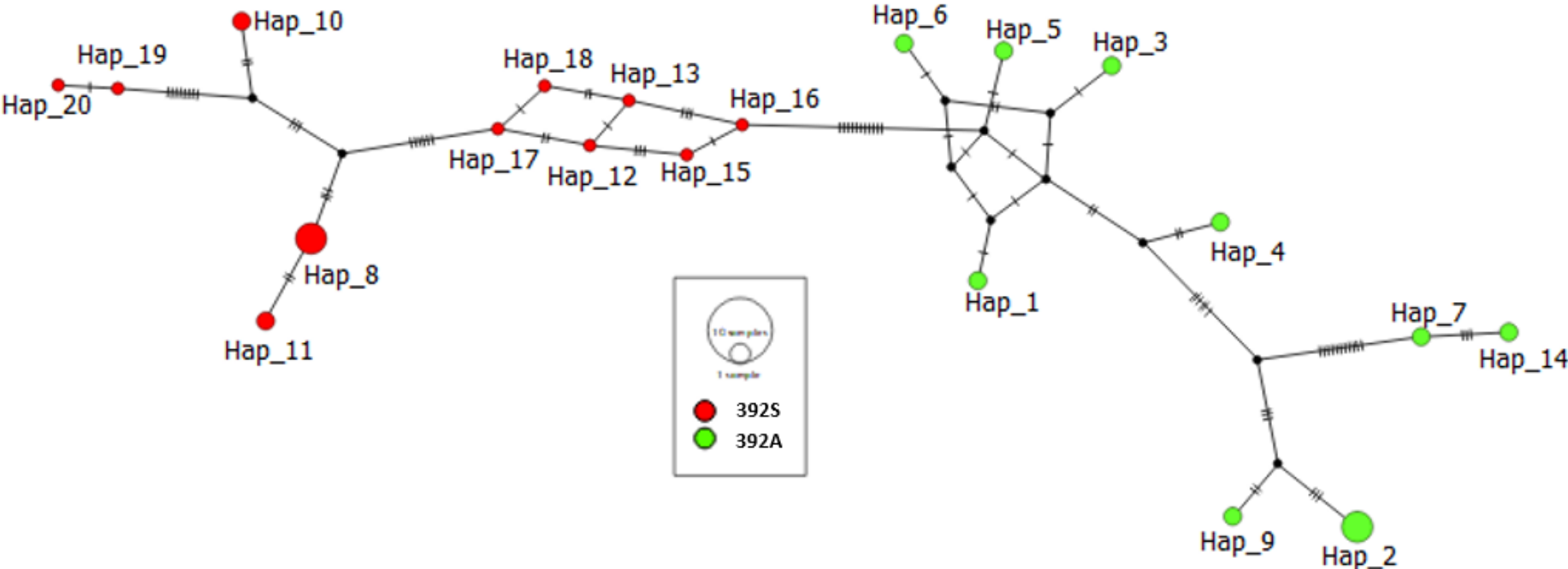
Noms du gène	Noms des amorces	Séquence 5'-3'	Taille du produits	T°C d'hybridation
<i>CYP6M2</i>	6M2p3i-sens	AGTACTTCACAGCGCCCAAC	1 020 pb	58°C
	6M2pr3-antisens	CACCACGATCCTGCCAGTAG		
	6M2full-sens	GTCGGTGGACAGTCAAATTCA	1 600 pb	56°C
	6M2full-antisens	CTAAATCTTATCCACCTTCAA		
	6P4.ful2-antisens	ACAGTACACTTACAATTCCTTCGG		
<i>CYP6P4</i>	6P4.pr1-sens	GACACCGTACACGTTTCTGC	835 pb	65°C
	6P4.pr1-antisens	ATGTACGATGCGTGCTTGGA		
	6P4.full1-sens	GCGCATGAAAGCTAGGGAT	1 600 pb	67°C
	6P4.ful2-antisens	ACAGTACACTTACAATTCCTTCGG		

Annexe 5 : Photographie de l'alignement des séquences d'une portion du locus du gène *CYP6M2* couvrant la mutation A392S au sein des échantillons d'*A. gambiae*

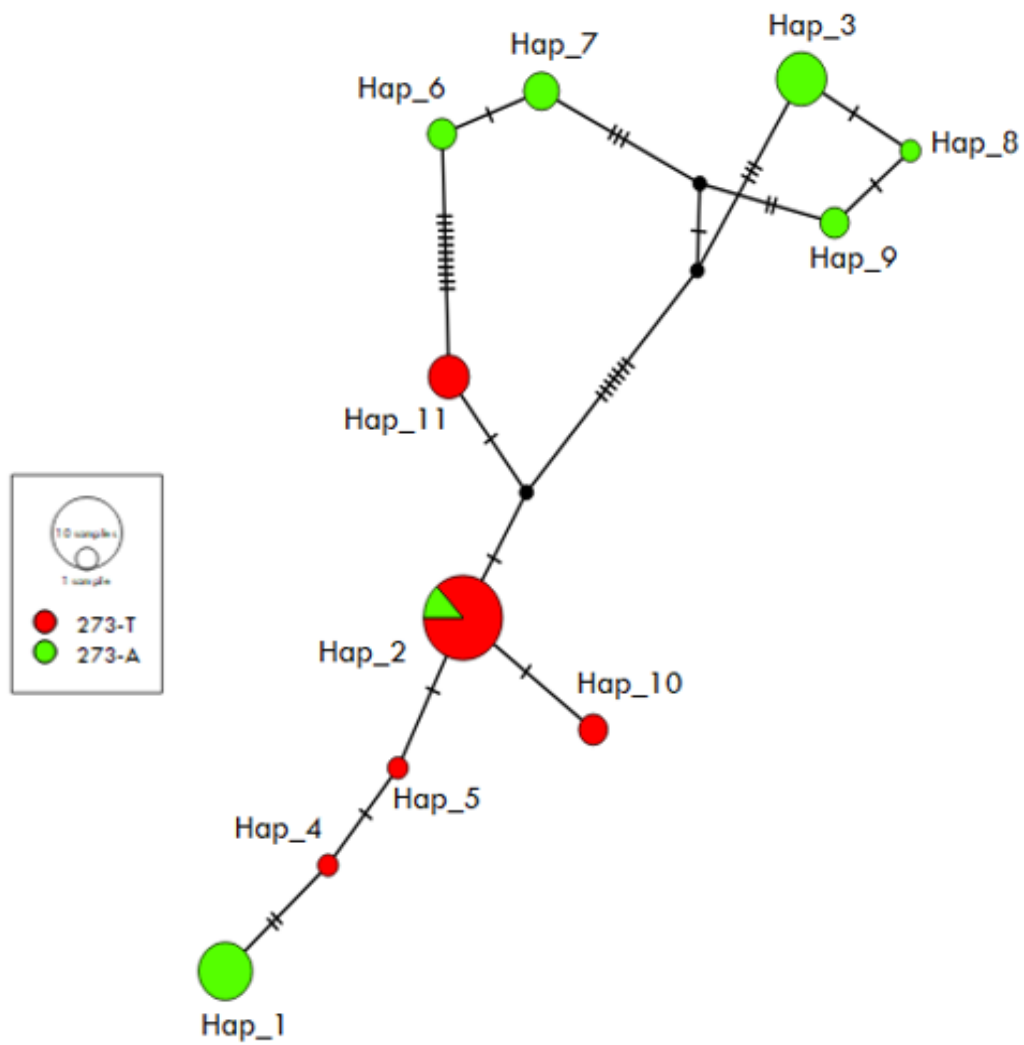


Légende : (a) Alignement des séquences des moustiques hyper-résistants (HR), hypersensibles (HS) d'*A. gambiae* et de la souche sensible Kisumu (Kis) présentant la mutation G/T en position 1 252 ; (b) Changement en acide aminé d'une portion du locus du gène *CYP6M2* présentant la distribution de la mutation A392S en fonction du phénotype de résistance ; (c) Chromatogramme présentant les différents génotypes de la mutation A392S du locus du gène *CYP6M2*.

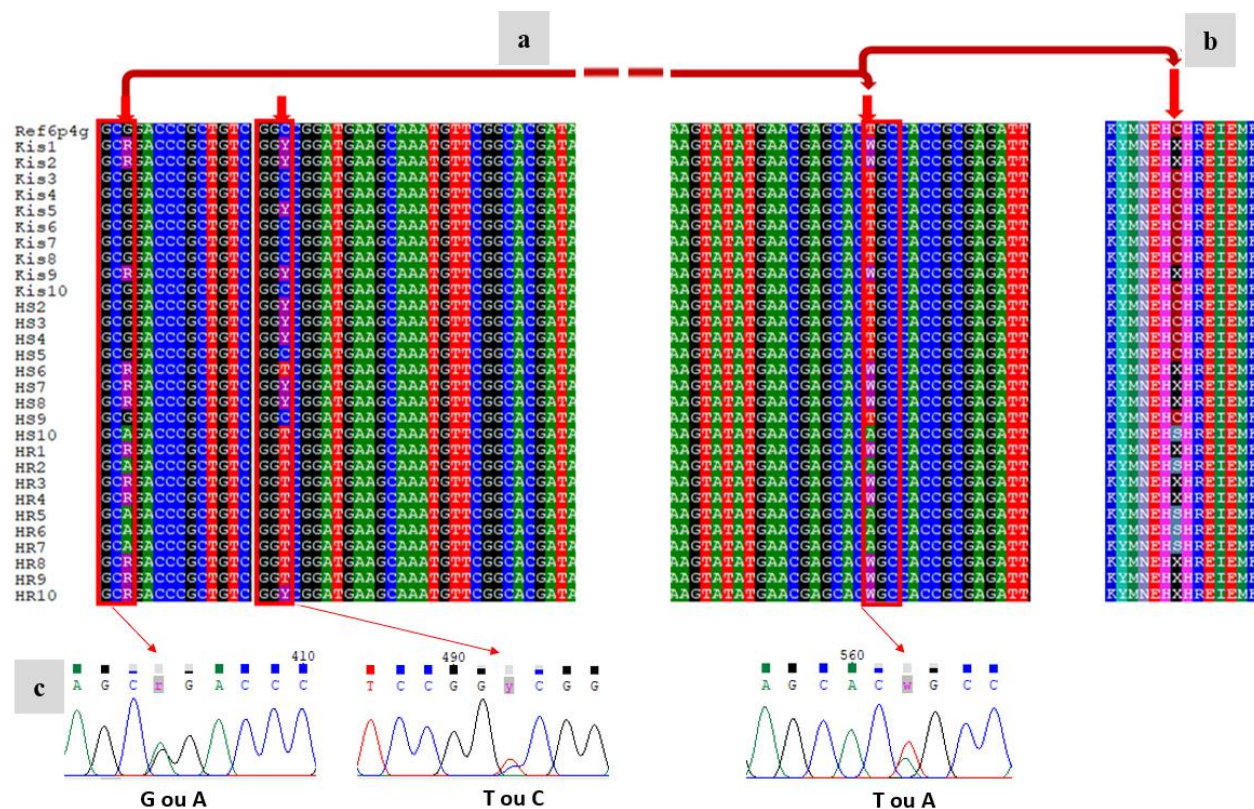
Annexe 6 : Réseau d'haplotypes de la mutation A392S-CYP6M2 par allèle dans les échantillons d'*A. gambiae*



Annexe 7 : Réseau d'haplotypes de la mutation A/T, position 273 de la région promotrice du gène *CYP6P4* par allèle dans les échantillons d'*A. gambiae*

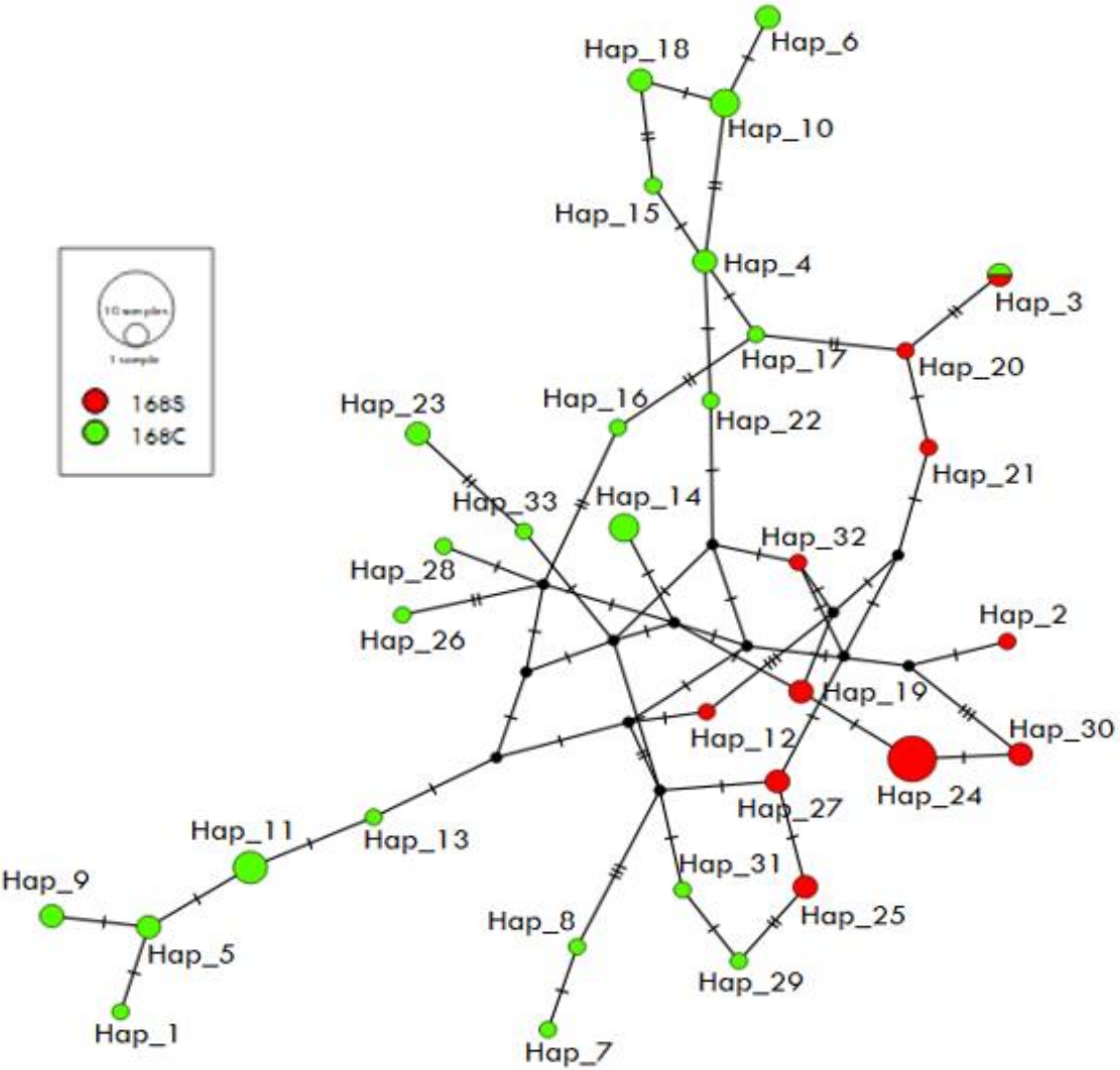


Annexe 8 : Photographie de l'alignement des séquences d'une portion du locus du gène *CYP6P4* couvrant la mutation C168S au sein des échantillons d'*A. gambiae*



Légende : (a) Alignement des séquences des moustiques hyper-résistants (HR), hypersensibles (HS) d'*A. gambiae* et de la souche sensible Kisumu (Kis) présentant les mutations au niveau du locus du gène *CYP6P4* ; (b) Changement en acide aminé d'une portion du locus du gène *CYP6P4* présentant la distribution de la mutation C168S en fonction du phénotype de résistance ; (c) Chromatogramme présentant les différents génotypes les mutations observées au niveau du locus du gène *CYP6P4*.

Annexe 9 : Réseau d'haplotypes de la mutation C168S-CYP6P4 par allèle dans les échantillons d'*A. gambiae*



Annexe 10 : Listes des présentations orales présentées à différentes conférences

- 1. FOTSO TOGUEM YVAN GAËTAN, TENE FOSSOG BILLY, MUGENZI JEAN LEON, NJIOKOU FLOBERT, RANSON HILARY AND WONDJI CHARLES S., 2021.**
Polymorphism analysis of *CYP6M2*, a main metabolic resistance gene in *Anopheles gambiae* from Yaoundé, Cameroon. [Présentation orale], *2^{ème} Conférence annuelle de PAMCA (Cameroon Chapter), salle de conférence de la Croix Rouge, Yaoundé, Cameroun, du 06 au 07 Juillet 2021.*

Annexe 11 : Listes des posters présentées à différentes conférences

- 1. FOTSO TOGUEM YVAN GAËTAN, TENE FOSSOG BILLY, MUGENZI JEAN LEON, NJIOKOU FLOBERT, RANSON HILARY AND WONDJI CHARLES S., 2020.**
Identification of molecular markers of metabolic resistance in *Anopheles gambiae* Giles 1902 (Diptera: Culicidae) population from Cameroon. [Poster presentation], *1st PIIVeC Annual Scientific Meeting, September 26-27, 2019, Yaoundé, Cameroon.*
- 2. FOTSO TOGUEM YVAN GAËTAN, TENE FOSSOG BILLY, MUGENZI JEAN LEON, NJIOKOU FLOBERT, RANSON HILARY AND WONDJI CHARLES S., 2020.**
Genetic diversity of *CYP6M2* promoter and its possible association with permethrin resistance pattern in *Anopheles gambiae* s.s population from Cameroon. [Poster presentation], *2^{ème} Conférence Scientifique Annuelle du projet PIIVeC, en ligne via Zoom, du 21 au 24 Septembre 2020.*



Identification of molecular markers of metabolic resistance in *Anopheles gambiae* Giles 1902 (Diptera : Culicidae) population from Cameroon

Yvan Gaétan FOTSO TOGUEM^{1,2*}, Billy TENE FOSSOG^{2*}, Flobert NJIOKOU^{1,2}, Hilary RANSON³ and Charles S. WONDJI^{2,3}

¹Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, P.O. Box 812, Cameroon, ²Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé, P.O. Box, 13591, Cameroon, ³Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, L35QA, Liverpool, UK. *Corresponding author: yvan.fotso@crid-cam.net; billy.tene@crid-cam.net

Background

- The malaria control in Africa relies heavily on insecticide-based interventions such as long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS). However, the efficacy of these tools is threatened by insecticide resistance.
- Between the two main resistance mechanisms, only target site resistance is well characterised with the first DNA-based marker designed 20 years.
- Such tool is not available for metabolic resistance in *An. gambiae* however that there are more and more evidences of metabolic resistance implication in the failure of vector control strategies (Tene et al., 2013).
- Designing a simple and direct tool to detect the genes involved in this type of resistance on the field (as done for *An. funestus* (Weedall et al., 2019, Riveron et al., 2014)) could help to implement suitable resistance management strategies.

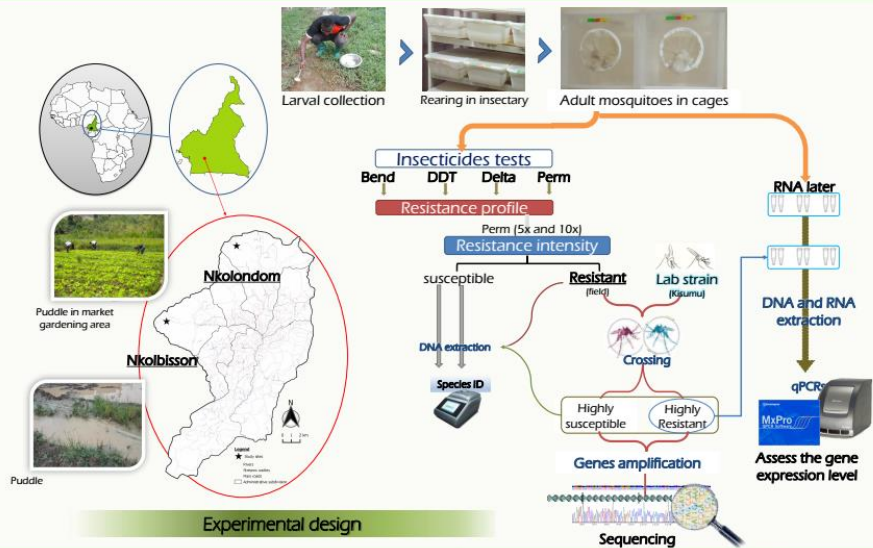


Proof of insecticides resistance: blood feed mosquito resting on bed-net.

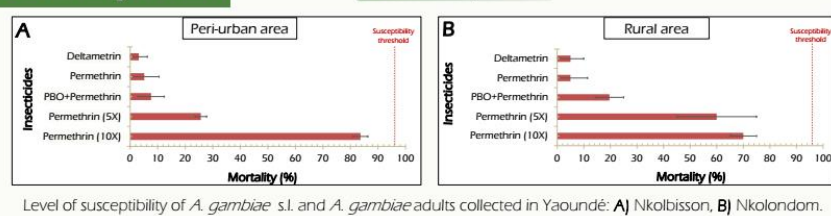
The proposed study aims to elucidate the molecular basis of metabolic resistance in *Anopheles gambiae* and design suitable DNA-based marker to map and track this resistance.

Methods

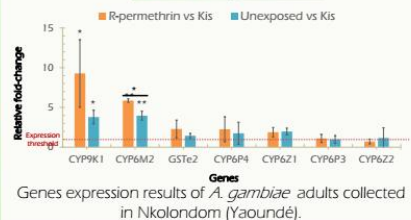
- Larval collection**
in two peri-urban localities in Yaoundé (Cameroon);
- Bioassay susceptibility and synergists tests**
on adults according to the WHO protocol (WHO, 2016 revised);
- Molecular identification**
of the members of *Anopheles gambiae* complex
- Evaluation of the expression level of the main detoxification genes**
by RT-qPCR : (field population vs. lab susceptible strains);
- Comparative allelic variations and promoter analysis of the main overexpressed genes**
between resistant strains and susceptible mosquitoes;
- Design of simple DNA-based tools**
To easily detect metabolic based resistance in the field.



Preliminary results



Genes expression



Potential impact

This study will contribute in the development of a DNA-based molecular diagnostic tool for rapid detection, monitoring and tracking of metabolic resistance in *A. gambiae* field populations and therefore will help malaria control programs to implement suitable insecticide resistance management strategies.

References

1. Tene, B.F., Poupardin, R., Costantini, C., Awono-Ambene, P., Wondji, C.S., Ranson, H. and Antonio-Nkondjo, C. 2013. Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *Plos one*, 8(4), p.e61408. 2. Weedall, G.D., Mugenzi, L.M., Meme, B.D., Tchouaoui, M., Ibrahim, S.S., Arango-Adja, N., Irving, H., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Djouaka, R. and Riveron, J.M. 2019. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11(494), p.ea7386. 3. Riveron, J.M., Yunta, C., Ibrahim, S.S., Djouaka, R., Irving, H., Meme, B.D., Ismail, H.M., Hemingway, J., Ranson, H., Albert, A. and Wondji, C.S. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome biology*, 15(2), p.R27. 4. WHO 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed, 54p. 2016. ISBN 978 92 4 151157 5.



Genetic diversity of *CYP6M2* promoter and its possible association with permethrin resistance pattern in *Anopheles gambiae* s.s populations' from Cameroon

Yvan Gaétan FOTSO TOGUEM^{1,2*}, Billy TENE FOSSOG^{2*}, Flobert NJIOKOU^{1,2}, Hilary RANSON³ and Charles S. WONDJI^{2,3}

¹Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, P.O. Box 812, Cameroon, ²Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé, P.O. Box, 13591, Cameroon, ³Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, L350A, Liverpool, UK. *Corresponding author: yvan.fotso@crid-cam.net, billy.tene@crid-cam.net

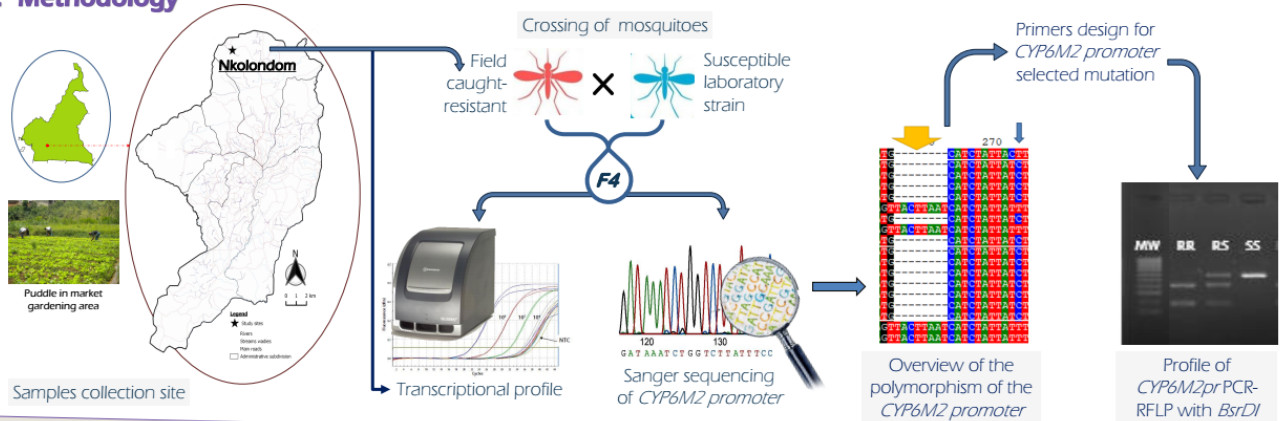
1. Background

- Malaria control relies on insecticide-based interventions (LLINs, IRS), but their effectiveness is now threatened by the spreading of insecticide resistance (Protopopoff *et al.*, 2018).
- Resistance can arise through metabolic mechanisms which allows mosquitos to digest the chemicals and detoxify them before they reach their targets.
- Lot of genes have been implicated such as *CYP6M2* which is considered as one of main pyrethroid metabolising enzymes (Adolfi *et al.*, 2019), but little is known about the enhancers promoting their overexpression in resistant mosquitoes.

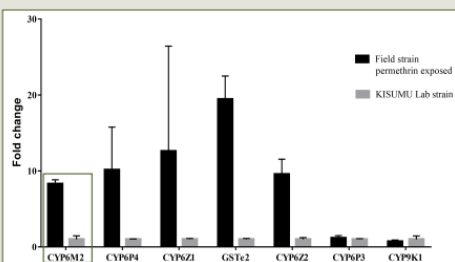
2. Questions/knowledge gaps

- Recent progress made in *An. funestus*, revealed one causative mutations located in the cis-regulatory region of key P450 genes were shown to drive the over-expression of the P450s *CYP6P9a* and *CYP6P9b* (Mugenzi *et al.*, 2020).
- Is it possible to design a same diagnostic tool to easily track the spread of the associated insecticide resistance in natural populations of *An. gambiae* from Cameroon?

3. Methodology



4. Results

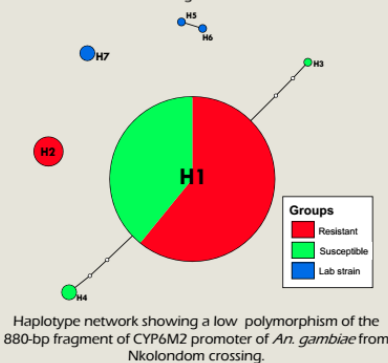


Differential expression by qRT-PCR of major insecticide resistance genes of field-caught *An. gambiae* from Nkolondom compared with the susceptible KISUMU colony.

- The core promoter elements detected using GPminer include CCAAT boxes (2 in resistant colony and 1 GC box in each strain). Several transcription factor binding sites were also detected including CncC nrf2/MAF (in both strains).
- The 880-bp fragment analysed after sequencing was polymorphic in all populations with many segregating sites (66) and haplotypes ($h = 7$; $hd = 0.366$) as well as high nucleotide diversity ($\pi = 0.011$).



Diagnostic PCR based on 8-bp insertion in *An. gambiae* PCR results indicating the presence (SS) or absence (RR) of the insertion for F4 field-caught resistant x Kisumu crosses.



Haplotype network showing a low polymorphism of the 880-bp fragment of CYP6M2 promoter of *An. gambiae* from Nkolondom crossing.

F4 phenotype	Homoygous with insertion (SS)	Heteroygous (RS)	Homoygous without insertion (RR)	Total	χ^2	p^b
Resistant	16	32	10	58	4.9	0.8ns
Susceptible	15	21	18	54	5.34	0.06ns
Total	31	53	28	112	0.45	0.77ns
χ^2	4.00	4.00	0.6			
p^a	0.04*	0.04*	0.68ns			

^aTested for an expected 1 : 1 segregation, ^btested for an expected 1 : 2 : 1 segregation

Genotyping of the 8-bp insertion on CYP6M2 promoter using one associated substitution T/C by RFLP-PCR in F4 field-caught resistant x Kisumu crosses and their association with resistance pattern.

Regarding the result obtained after genotyping, the association using the Chi-deux test is not significant.

5. Conclusion

The insertion of 8 bp in the promoter region does not appear to be associated with overexpression of CYP6M2, but it's important to highlights the role of each allele for this promoter by the luciferase assay technics.

Regarding the spray of resistance to insecticides tools for early detection and tracking metabolic resistance which can be exploited for surveillance and monitoring are critical to resistance management.

6. References

Adolfi A., Poulton B., Anthoni A., MacIwee S., Ranson H. & Lycett G.L., 2019. Functional genetic validation of key genes conferring insecticides resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 116(51): 25764-25772.

Protopopoff, N., Moshia, J.F., Lukole, E., Charwood, J.D., Wright, A., Mwalimu, C.D., Manjurano, A., Moshia, F.W., Kisinza, W., Kleinschmidt, I., 2018. 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. *The Lancet* 391, 1577-1588.

Weedall G.D., Mugenzi L.M., Menze B.D., Tchouaku M., Ibrahim S.S., Amvongo-Ajja N., Irving H., Wondji M.J., Tchoupo M., Djouaka R. & Riveron J.M., 2019. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11(484): eaat7386.

Annexe 12 : Articles publiés en relation avec la thèse

1. **FOTSO-TOGUEM, Y.**, TENE-FOSSOG, B., MUGENZI J. L.M., WONDJI M.J., NJIOKOU F., RANSON H., AND WONDJI C.S. (2023). Genetic diversity of Cytochrome P450s *CYP6M2* and *CYP6P4* associated with pyrethroid resistance in the major malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* from Yaoundé, Cameroon. *Genes*. 14(1): 52.
2. TENE-FOSSOG, B., **FOTSO-TOGUEM, Y.G.**, AMVONGO-ADJIA, N., RANSON, H., WONDJI, C.S. (2022). Temporal variation of high-level pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. in Yaoundé, Cameroon, is mediated by target-site and metabolic resistance. *Medical and Veterinary Entomology*. 36(3) 247–259.

Temporal variation of high-level pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. in Yaoundé, Cameroon, is mediated by target-site and metabolic resistance

Billy Tene-Fossog¹  | Yvan Gaetan Fotso-Toguem^{1,2}  | Nathalie Amvongo-Adjia^{1,3} | Hilary Ranson⁴  | Charles S. Wondji^{1,4}

¹Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé, Cameroon

²Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon

³Medical Research Centre, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon

⁴Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK

Correspondence

Billy Tene-Fossog, Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé 13591, Cameroon. Email: billy.tene@lstmed.ac.uk

Funding information

UK Research and Innovation Global Challenges Research Fund, Grant/Award Number: MR/P027873/1

Abstract

Constant assessment of insecticide resistance levels is mandatory to implement adequate malaria control tools, but little information is available on the annual dynamics of resistance. We, therefore, monitored variations in resistance in *Anopheles gambiae* s.l. over four seasons during 2 years in two localities of Yaoundé: urban Etoa-Meki and peri-urban Nkolondom. Mosquitoes were collected seasonally at larval stage and reared to adults for insecticide susceptibility tests and molecular analysis of resistance mechanisms. *Anopheles coluzzii* was found in Etoa-Meki and *An. gambiae* in Nkolondom. Low mortalities to pyrethroids were observed (permethrin <10%, deltamethrin <21%), and resistance extended to 5× and 10× diagnostic doses, revealing a marked increase compared to previous studies. A seasonal variation in resistance was observed with the highest levels within dry seasons in Etoa-Meki and rainy seasons in Nkolondom. The 1014F *kdr* allele shows a high frequency (0.9), associated with overexpression of metabolic genes (Cyp6M2, Cyp6P4, Cyp9K1, Cyp6Z1, and Cyp6Z2) varying significantly seasonally. This study reveals an escalation in resistance to pyrethroids in Yaoundé's malaria vectors with seasonal variations. An adequate choice of the implementation period of punctual vector control actions according to the resistance profile will help to potentiate the desired effect and thus improve its efficiency.

KEYWORDS

Anopheles gambiae, *Anopheles coluzzii*, insecticide resistance, resistance dynamic, resistance intensity, seasons, vector control

BACKGROUND

Despite significant progress made in the past decade in reducing the malaria burden, this disease remains a huge challenge for sub-Saharan African countries including Cameroon in Central Africa. Prevention strategies for malaria rely mainly on insecticide-based control interventions including long-lasting insecticidal nets (LLINs) and Indoor

Residual Spraying (IRS). However, the effectiveness of these tools is threatened by the increasing reports of resistance to main insecticides (WHO, 2019). In Cameroon, resistance is increasingly reported nationwide in several vectors notably in the main vectors *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Antonio-Nkondjio et al., 2019; Nwane et al., 2013) and *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Tchouakui et al., 2019; Wondji et al., 2011). Furthermore, there are increasing reports of loss of

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Medical and Veterinary Entomology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Royal Entomological Society.

efficacy of LLINs which remain the only mass intervention in the country (Etang et al., 2016; Menze et al., 2020), highlighting the need to continuously monitor the dynamics and evolution of resistance while continuing to assess its impact on vector control.

Resistance to two of the main insecticides used for LLINs (the pyrethroids permethrin and deltamethrin) has increased in the main vector *An. gambiae* s.l. (Menze et al., 2018) in Cameroon since first detected (Etang et al., 2006) although its annual dynamics and evolution in field populations remain less studied particularly in metropolitan areas such as Yaoundé, the capital city of Cameroon, where several factors can drive resistance (Tene et al., 2012). Previous studies highlighted a clear contrast in the vector's resistance profile between various environmental settings of Yaoundé classified as polluted, unpolluted and cultivated, pointing out a significant variation in the dynamics and evolution of resistance in the city with an implication of pollution in the selection of resistance (Tene et al., 2013). As some of those elements such as xenobiotics and agricultural pesticide concentration in breeding sites are dependent on rainfall levels, this could possibly result in a variation of the related insecticide resistance profile according to season.

Two mechanisms are mainly implicated in resistance to pyrethroids: target-site and metabolic resistance. Target-site mutations in the voltage-gated sodium channel (VGSC), referred to as knock-down resistance (*kdr*), impact response to pyrethroids and DDT. Two amino acid modifications at locus 1014; L1014F and L1014S were first identified in West and East Africa respectively (Martinez-Torres et al., 1998; Ranson et al., 2000) but are now widely distributed. In Cameroon, they have both been detected in the main malaria vector *An. gambiae* s.l. (Nwane et al., 2013; Tene et al., 2013) and their frequencies have significantly increased, from 0% in 2000 to 21.0% for the L1014S and 98.0% for the L1014F variant in 2017 (Antonio-Nkondjio et al., 2019). This is noted as a result of selection pressure from vector control insecticidal activities such as high distribution of LLINs in addition to the use of pesticides in agriculture, mainly in market gardening where accumulated water in furrows serves as larvae breeding sites (Antonio-Nkondjio et al., 2011). A third substitution, the N1575Y, has been found in West and Central Africa and shown to increase resistance in association with L1014F (Jones, Liyanapathirana, et al., 2012) and recent studies detected and confirmed the link between new mutations in the VGSC gene and resistance phenotype in several African vectors populations (Clarkson et al., 2021, Williams et al., 2021).

The second important resistance mechanism is the increased detoxification enzyme activities in mosquitoes with over-expression of some specific genes able to metabolize insecticides. Three gene families are involved in this process: esterases, glutathione S-transferases, and P450 monooxygenases (Lui, 2015) and their over-expression has been associated with resistance to pyrethroids, especially P450s in *An. gambiae* s.l. (Fagbohun et al., 2019). The use of some synergists that are able to inhibit the activity of specific metabolic enzyme families helps to evaluate their involvement in observed resistance (B-Bernard & Philogène, 1993).

Mitigating the threat of insecticide resistance in African malaria vector populations requires comprehensive information on the

distribution and strength of resistance, and how it is evolving. Estimating these trends is complicated by the sparse and heterogeneous distribution of resistance phenotypes in field populations. Previous studies in Cameroon have reported the presence of the two main modes of resistance to pyrethroids in malaria vectors, and a combination of both is producing high-level resistance (Menze et al., 2016; Nwane et al., 2013). Characterization of the *kdr* mutations as well as the implication of metabolic processes has proven the association of these mechanisms in the observed and growing level of resistance (Antonio-Nkondjio et al., 2015; Etang et al., 2007). In the urban area of Yaoundé, a longitudinal study on the distribution of vectors establish that there was a strong seasonal variation in anopheles density (Kamdem et al., 2012) as well as a strong correlation between the level of urban pollution and the overexpression of metabolic enzymes involved in insecticide resistance (Tene et al., 2013). As there are seasonal variations in breeding site pollution levels due to water refreshment by rainfall, the profile of resistance might also be impacted.

To optimize upcoming vector control activities by defining the best period according to the target and objectives, it is crucial to understand how resistance may fluctuate during the year. This study aimed to assess the level and the seasonal fluctuations of pyrethroids resistance in urban and peri-urban areas of Yaoundé, and the involvement of various factors in the observed resistance intensity.

METHODS

In the urban area of Yaoundé, seasonal mosquito collections were carried out for 2 years to assess vector susceptibility to insecticides and the dynamics of this resistance across the year. Larval collections were performed using the dipping method, followed by lab rearing, bioassays, and molecular analysis of F_0 adults.

The study was conducted after obtaining ethical approval from the Cameroon National Ethics Committee under the ethical clearance No 2019/10/1195/CE/CNERSH/SP and the institutional ethical committee of the Liverpool School of Tropical Medicine (Research Protocol 19-011).

Study area

The study was carried out in the city of Yaoundé which is characterized by several hills and lowlands with small watercourses. Two collection sites were selected: Etoa-Meki (urban) in the core of the city and Nkolondom (peri-urban) in the outskirts. The urban collection site is located within the core of the town and was selected based on previous works which have shown a strong metabolic resistance linked to urban pollution with an exclusive presence of *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 (Kamdem et al., 2012). The collection points are located at Etoa-Meki (3°52' 56", 11°31' 49"), in the slums, and around the railway station (Figure 1). The area profile shows small temporal and semi-temporal breeding sites. These water collections are replenished mainly by rains so are therefore very rare during dry

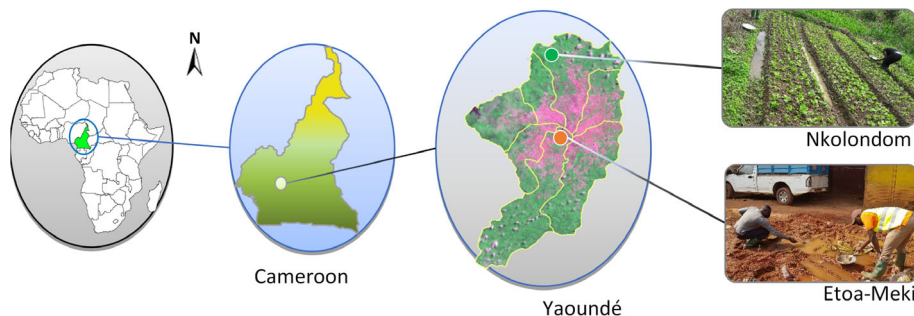


FIGURE 1 Study sites localization in Yaoundé (Cameroon): The urban collection areas Etoa-Meki is in the core of the city and colonized by *Anopheles coluzzii* (□) while Nkolondom is in the peri-urban area, about 10 km away, exclusively colonized by *Anopheles gambiae* (□). The map of Yaoundé was extracted from Landsat8 2010, the green representing vegetation and the reddish the structures.

seasons and those that persist show signs of pollution due to water evaporation and concentration of xenobiotics and organic matter. On the other hand, the peri-urban site of Nkolondom (3° 57' 05", 11° 29' 24") is located around 10 km from the urban sites. It was selected to collect *An. gambiae* and have previously shown strong resistance to pyrethroids (Antonio-Nkondjio et al., 2016). In this locality, agriculture especially market gardening in swampy areas is the main activity for decades (Figure 1) with aromatic herbs, lettuce, and other vegetables being the main products. The crops are constantly protected from plant pests through the intensive use of pesticides by the farmers. The standing water in the furrows serves as breeding sites for mosquitoes, *Anopheles* and *Culex*. They are mainly semi-permanent and probably contain traces of the pesticides used on crops in soil and water as was found in a study in Burkina (Akogbeto et al., 2006). Here, cultivation is done throughout the year, but there are some short periods left for ground regeneration. These periods, just after the harvests, last from 3 weeks to a month during the long-dry season.

Mosquito collection

The city of Yaoundé is situated within the Congo-Guinean phytogeographical zone characterized by a typical equatorial climate named 'type Yaoundéen' (Suchel, 1972) with four seasons whose lengths vary slightly from 1 year to another, delimited as follows:

- a long rainy season (LRS) from mid-August to mid-November;
- a long dry season (LDS) from mid-November to mid-March;
- a short rainy season (SRS) from mid-March to mid-June;
- a short dry season (SDS) from mid-June to mid-August.

Collections were performed for 2 years, from March 2019 to December 2020 and were made over 2 weeks each season, around season's medium period to be sure to capture the real seasonal profile. *Anopheles* larvae were collected in breeding sites, following the dipping method (Service, 1993), and directly identified morphologically. The larvae were then brought to CRID's insectary for rearing to the adult stage, under controlled standard laboratory conditions (25 ± 2°C, 70%–80% relative humidity). They were kept in breeding

site water in which distilled water was added progressively to avoid fermentation of organic matter. The F₀ adults obtained were provided with a 10% sugar solution and used for susceptibility tests and molecular analysis.

Insecticide susceptibility tests

Insecticide susceptibility tests were done on F₀ females obtained from reared field-collected larvae and morphologically identified as members of *An. gambiae* complex (Gillies & de Meillon, 1968). This allowed us to be sure of mosquito ages (3 to 5 days) and physiological status (non-blood-fed). The exposure to insecticides follows the WHO tubes test protocol: 60 min exposure to insecticides and 24 h observation for 20 to 25 mosquitoes per test tube, with at least 4 tubes for the tested insecticide and 2 tubes as controls (WHO, 2016). The Ngoussou lab susceptible strain was primarily used as a test control to confirm the quality of impregnated papers. Those insecticide-impregnated papers were obtained from the WHO collaboration centre at the Vector Control Research Unit, University Sains, Malaysia. The insecticides included DDT 4%, type I pyrethroid, permethrin 0.75%, and type II pyrethroid deltamethrin 0.05%. An evaluation of the resistance intensity for pyrethroids was also done using 5× and 10× the discriminating concentration for permethrin (3.5% and 7.5%) and deltamethrin (0.25% and 0.5%) impregnated papers. WHO criteria were used to evaluate the resistance and susceptibility status of the tested mosquito population (WHO, 2016). Control mosquitoes were exposed to non-impregnated papers and when their mortality was above 5%, Abbott's formula was used to correct the results (Abbott, 1987). The mortality rates were monitored 24 h post-exposure to insecticide and resistance status was defined following WHO guidelines on insecticide susceptibility.

Synergist assays

To assess the contribution of metabolic enzymes in the resistance profile, especially cytochrome P450s, synergist assays were performed with Piperonyl Butoxide (PBO), an inhibitor of oxidases

including P450s. For these tests, four replicates of 20–25 adult mosquitoes (3 to 5 days old) were pre-exposed to PBO impregnated papers (4%) for 60 min and then immediately exposed to permethrin (0.75%) or deltamethrin (0.05%) for 60 min again. In addition, control assays using only the synergist impregnated papers for 60 min were also performed and mortality was recorded 24 h later. The mortality rate obtained was compared to those of insecticide tests without synergist's exposure to evaluate the level of susceptibility restoration and thus the implication of P450s in resistance to the tested insecticide.

Cone tests

To evaluate the efficacy of bed-nets, cone bioassays were performed using two LLINs (Olyset® Net (containing 2% permethrin) and OlysetPlus® Net (containing 2% permethrin plus 1% PBO) from Sumitomo Chemical Co., obtained from the National Malaria Control Program in 2019 from a batch of nets for the mass distribution campaign. Following the WHO procedure, five unfed female mosquitoes aged 2–5 days were introduced into each cone placed on the LLIN for 3 min. After exposure, mosquitoes were immediately transferred to paper cups and supplied with 10% sucrose. Mosquitoes that were knocked down were recorded after 60 min and mortality was recorded 24 h after exposure. Two replicates were exposed to an untreated net as control.

Molecular analysis

Molecular identification was done as these subspecies belonging to the *An. gambiae* s.l. complex are not morphologically distinguishable. The aim is to check whether the geographical distribution of species is still following the same pattern as described by previous studies. Genomic DNA used for this identification of *An. gambiae* complex members was extracted from adult mosquitoes following the Livak technique (Livak, 1984). For each seasonal collection, a sub-sample of 30 F_0 adults mosquitoes randomly selected from larvae reared per collection site was used to perform the short interspersed elements PCR (SINE) that differentiate members of the *An. gambiae* s.l. complex (Santolamazza et al., 2008). This identification was made before the insecticide tests. In addition, a supplementary verification was done later, on a smaller set of samples (5–10) of female mosquitoes used for insecticide tests.

Genotyping of KDR mutations (L1014F, L1014S, and N1575Y) was done following TaqMan assays as previously described (Bass et al., 2007; Jones, Liyanapathirana, et al., 2012). Thus, 90 samples of *An. coluzzii* and 100 *An. gambiae* randomly selected in unexposed F_0 were used to assess the presence of these KDR mutations. TaqMan reactions were undertaken using the Agilent MX3005P machine. Each reaction was conducted in a 10 μ l final volume with 1xSensiMix (Bioline), 800 nM of each primer, and 200 nM of each probe. The primers used are listed in Table 1.

Gene expression level was assessed for the two vector species collected during the main dry and rainy seasons. Six of the most reported detoxification genes listed by Mavridis (Mavridis et al., 2019) were selected for this study (Table 1). Using three biological replicates of 10 F_0 females alive after exposure to permethrin and 3 batches of 10 susceptible females as control, total RNA was extracted followed by cDNA synthesis using Superscript III (Invitrogen®) based on manufacturer instructions. The qRT-PCR reactions were performed as previously described by Riveron (Riveron et al., 2013). Fold change and expression of each gene in resistant and control samples were computed for each species according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen & Livak, 2008) using housekeeping genes for standardization: ribosomal protein S7 (RPS7; VectoBase ID: AGAP010592) and Elongation factor (VectoBase ID: AGAP005128). The primers used, previously by Mavridis et al. (2019), are presented in Table 1.

Data analysis

Following the WHO guidelines on insecticide susceptibility, mosquito populations were considered susceptible if mortality was $\geq 98\%$ and resistant if mortality was less than 90%. Mortality rates ranging between 90% and 97% indicate a potential resistance needing to be confirmed by additional tests (WHO, 2016). A chi-square test was used to compare mortality data for insecticides and synergists, in addition to Fisher's exact test. The Pearson test helps to evaluate the correlation of susceptibility profiles between seasons. Data from the two-year collections were computed by seasons as no significant difference was found between years. Microsoft Excel software was used to enter data and analyses were done with the R software version 4.0.2 (R_Core_Team, 2012).

RESULTS

Vector species composition

More than 6000 adult female *Anopheles* mosquitoes were obtained after larval rearing from the two sites and were morphologically identified as belonging to the *An. gambiae* complex. We used around 30 randomly selected adults per collection period for each of the two collection points for molecular identification. As result, we identified exclusively *An. coluzzii* in the urban area (Etoa-Meki) on the 228 results for 240 samples tested, and *An. gambiae* in the rural market gardening area (Nkolondom) on 220 tested samples.

Resistance profile of malaria vectors

The phenotypic resistance to insecticides was done using WHO test tubes. Insecticide susceptibility tests were carried out on a total of 5209 samples (excluding the controls) for insecticides and in association with synergist (1952 for Nkolondom and 3257 for Etoa-Meki).

TABLE 1 Primers used to evaluate metabolic and target site resistances in Yaoundé's malaria vectors

Gene group	Gene name	Primer name	Primer sequences (5' to 3')	Efficiency (%)
House keeping genes	Elongation factor	EFq_F	GGCAAGAGGCATAACGATCAATGCCG	95.6
		EFq_R	GTCCATCTGCGACGCTCCGG	
	RPS7	RPS7q_F	CCACCATCGAACACAAAGTTGA	93.4
		RPS7q_R	TGCTGCAAACCTTCGGCTATTC	
Metabolic genes	CYP6M2	6M2q_F	CTGGCGTTGAATCCAGAGGT	80.7
		6M2q_R	GATACTTGCGCAGTGATTCATTAAG	
	CYP6P3	6P3q_F	ACAATGTGATTGACGAAACCCT	93
		6P3q_R	GGATCACATGCTTTGTGCCG	
	CYP9K1	9K1q_F	CCGACACGTGGTATGGATAC	101.9
		9K1q_R	CGTCGTCGGTCCAGTCAAC	
	CYP6P4	6P4q_F	CTGGACAACGTTATCAATGAAACC	96.1
		6P4q_R	GCACGGTGAATCACGCATC	
	CYP6Z1	6Z1q_F	CCCGCCAACTGTATCGGTCTG	98.6
		6Z1q_R	TTCGGTGCCAGTGTGATTGA	
CYP6Z2	6Z2q_F	AGGCCACGAAGAACTACGAT	106.1	
	6Z2q_R	ACTTTTGCAGGAGTTGTGGC		
Kdr mutations	Kdr primers	kdr_F	CATTTTTCTTGCCACTGTAGTGAT	
		kdr_R	CGATCTTGGTCCATGTTAATTTGCA	
	Kdr probes	FAM L1014F	ACGACAAAATTC	
		FAM L1014S	ACGACTGAATTC	
		HEX susceptible	CTTACGACTAAATTC	
		1575-F	TGGATCGCTAGAAATGTTTCATGACA	
		1575-R	CGAGGAATTGCCTTTAGAGGTTTCT	
		Y1575	3'NFQ-TTTTTTCATTGCATAATAGTAC	
		N1575	3'NFQ-ATTTTTTTCATTGCATTATAGTAC	

The bioassays results expressed as annual averages of the observed mortality rates for the whole collection period are presented in Figure 2.

The profile of *An. coluzzii* showed resistance to all tested insecticides. Resistance to DDT was high, with 9.21% (± 2.92) mortality recorded (Table 2). Deltamethrin and permethrin also showed low mortality, 20.4% (± 4.01) and 8.87% (± 2.82) respectively. An increase in mortality with PBO-permethrin was observed, with 36.4% (± 2.89) of mortality, that is a recovery of 23%. Resistance escalation tested for 5 \times and 10 \times permethrin-impregnated papers showed a resistance of urban *An. coluzzii* to both, with 68.0% (± 4.44) mortality to 5 \times and 87.5% (± 2.27) to 10 \times indicating a high resistance level (Figure 2). Resistance escalation was not tested for deltamethrin in *An. coluzzii* due to an insufficient number of samples not allowing us to obtain valid results.

For the peri-urban strain *An. gambiae*, full resistance to DDT with no single mortality (0%) was obtained on the 112 tested samples. For pyrethroids, this population was also resistant with low mortality observed: 14.7% (± 4.08) for deltamethrin and 9.69% (± 2.11) for permethrin. The implication of metabolic enzymes in this resistance to pyrethroids was confirmed by mortality rising to 79.4% (± 1.94) for PBO-deltamethrin and 46.9% (± 9.13) for PBO-permethrin, showing partial recovery of

susceptibility of 64% and 37% respectively. Given these results, we ran a test with 5 \times and 10 \times concentrated permethrin and deltamethrin and obtained high levels of resistance with 75% (± 3.49) mortalities for 5 \times and 96.3% (± 2.49) for 10 \times permethrin, 29.9% (± 6.83) for 5 \times and 78.5% (± 9.79) for 10 \times deltamethrin (Figure 2).

Bed nets efficacy evaluation

Low mortality rates were recorded against Olyset[®] Net compared to the PBO-based OlysetPlus[®] Net (Figure 3). The mortality rates with Olyset[®] Net were 10.85% (± 1.52) and 13.68% (± 3.78) for *An. gambiae* and *An. coluzzii*, respectively. For the net containing PBO as a synergist (OlysetPlus[®]), the recorded mortalities were 93.33% (± 4.08) and 96.28% (± 1.52) respectively, above the threshold of suspected resistance.

KDR mutations frequencies

The L1014F mutation was found at a very high frequency in tested field populations with allelic frequencies of 0.90 for *An. coluzzii* and

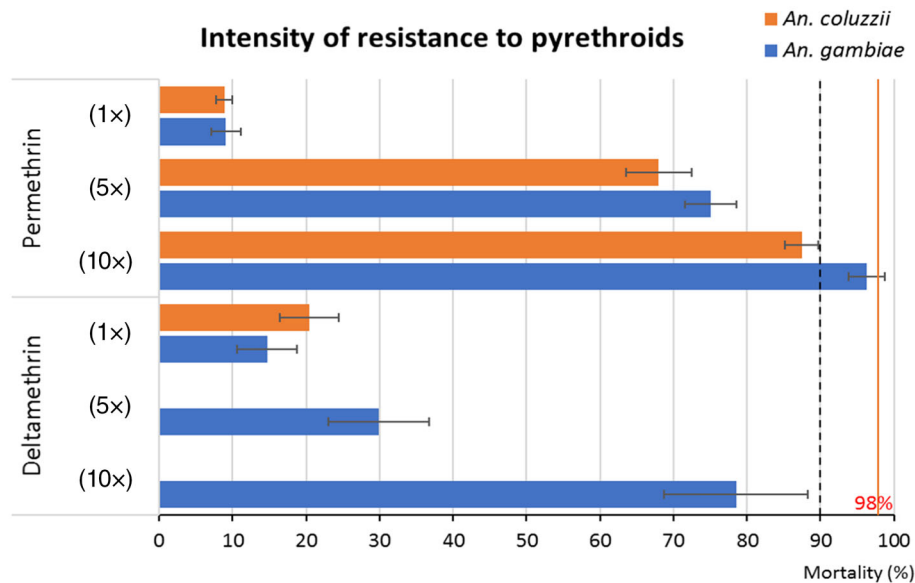


FIGURE 2 Resistance intensity to permethrin (1×, 5×, and 10×) and deltamethrin (1×, 5×, and 10×) for the two malaria vectors species collected from March 2019 to December 2020 in Yaoundé: *Anopheles gambiae* from Nkolondom (peri-urban area) and *Anopheles coluzzii* from Ngusso (urban area), with 95% error bars

TABLE 2 Annual means of mortalities of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations respectively from Nkolondom and Ngusso (Yaoundé, Cameroon) to DDT and pyrethroids in from March 2019 to December 2020

Insecticides	<i>An. coluzzii</i>			<i>An. gambiae</i>		
	Nb exp	Mortality	SD	Nb exp	Mortality	SD
DDT	164	9.21	2.92	112	0.00	0.00
Permethrin	976	8.87	1.10	571	9.07	2.04
Permethrin (05×)	600	68.00	4.44	197	75.02	3.49
Permethrin (10×)	493	87.47	2.27	84	96.33	2.49
PBO + Permethrin	738	36.37	2.90	270	46.99	9.13
Deltamethrin	246	20.41	4.01	252	14.67	4.08
Deltamethrin (05×)				117	29.88	6.83
Deltamethrin (10×)				83	78.50	9.79
PBO + Deltamethrin				102	79.38	1.94
Total	3217			1788		

Note: Nb exp, number of mosquitoes exposed to insecticides; SD, standard deviation.

0.93 for *An. gambiae*. Only four susceptible homozygotes (SS) were found in *An. coluzzii* and just a single one in *An. gambiae* on 90 and 73 samples tested respectively (Table 3). No L1014S or N1575Y mutations were detected in all tested samples despite an increase in the sample size.

Seasonal permethrin resistance monitoring

Larval collections were performed for 2 years, during the four different seasons. Initially, an analysis was done on samples from the same season but collected in different years in urban areas, to assess the

level of variation between the two annual datasets. The average permethrin mortality 1×, 5× and 10× and with PBO was compared between the two collection years, season by season (Table S1). A strong correlation was obtained ($r: 0.994, p = 0.006$) showing that there is no significant variation from 2019 to 2020. In addition, a more in-depth analysis was performed for the season presenting a complete set of data on the two collection years, the SDS. A multivariate ANOVA analysis shows that the general SDS profile is not significantly different between 2019 and 2020 ($p = 0.47$) nor by insecticide concentrations per year ($p = 0.79$), but rather shows a strong similarity ($r: 0.994$). Following these observations, we decided to mix the 2 years' results and analyse them as a single data set.

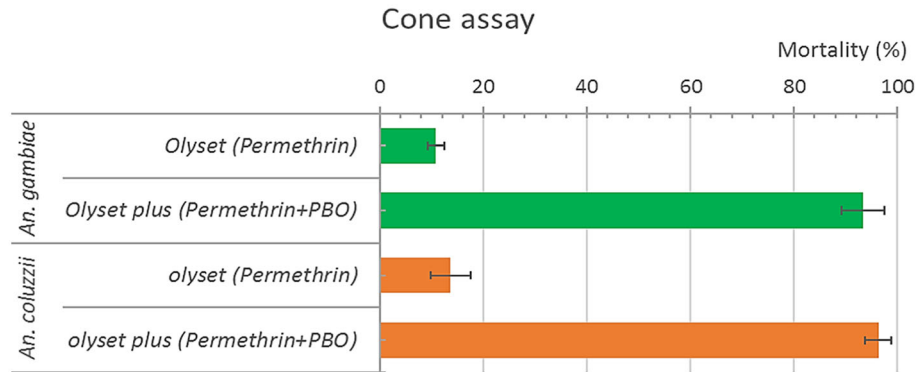


FIGURE 3 Mortalities of female *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations respectively from Nkolondom and Ngouso (Yaoundé, Cameroon) to WHO cone bioassay with two LLINs (Olyset® and OlysetPlus®) in November 2020 with error bars at 95% confidence interval

TABLE 3 *KDR* mutation genotypic frequencies in the two malaria vectors species of Yaoundé *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations, respectively, from Nkolondom and Ngouso (Yaoundé, Cameroon) from March to December 2019

Mutation	Genotype	Species			
		<i>An. coluzzii</i>		<i>An. gambiae</i>	
		Nb. samples	Frequency	Nb. samples	Frequency
L1014F	RR	76	0.84	70	0.96
	RS	10	0.11	2	0.03
	SS	4	0.04	1	0.01
L1014S	RR	0	0	0	0
	RS	0	0	0	0
	SS	180	1	180	1
N1575Y	RR	0	0	0	0
	RS	0	0	0	0
	SS	178	1	177	1

The general resistance profile observed in the urban area for *An. coluzzii* was analysed seasonally. For each season, permethrin was used at three concentrations: the recommended dose here named 1× (0.75%) and two higher concentrations at 5× and 10×. For *An. gambiae* unfortunately, some seasons did not provide sufficient data to perform a statically valid analysis on a full-year period.

For *An. coluzzii*, the highest resistance to permethrin 1× was observed within the SDS, with the lowest mortality of only 2.1% (±0.73) (Figure 4). The lowest resistance was observed during the long rainy season (LRS) with 18.9% (±1.52) mortality. The observed mortalities to the 3 concentrations were significantly different between the four seasons (F-stat = 33.92, $p = 0$), presuming a probable impact of parameters linked to seasons on pyrethroid resistance in this vector species. Concerning susceptibility to 5× and 10× permethrin, the highest resistances were observed during SDS with 54.4% (±7.84) and 81.2% (±3.41) mortalities respectively for 5× and 10× and the lowest resistance in LDS with the highest mortalities of 91.4% (±3.8) for 5× and 100% for 10× (Figure 4). During the LRS, 10× mortality reached 95.9% (±2.28) thus remaining in the resistance interval defined by WHO (under 98% mortality).

Seasonal implication of P450s metabolic detoxification genes in resistance

The insecticide tests with pre-exposure to synergist showed different levels of restoration of susceptibility for each season (Figure 5), significantly different from the permethrin alone tests (t-test $p = 0.03$). The mortalities with PBO were 31.8% (±1.74), 24.0% (±1.68), 39.6% (±2.53) and 63.1% (±5.04) for SRS, SDS, LRS, and LDS, giving a restoration of susceptibility respectively of 22.1%, 21.9%, 20.7% and 52.3%. The results show a quite similar restoration for all seasons apart from the LDS showing more than the double of metabolic genes implication in resistance. To evaluate the level of implication of metabolic genes in permethrin resistance, we did a ratio between PBO + permethrin and permethrin1x mortalities. We found that the SDS had the highest ratio of P450-based metabolic implication in resistance (11.35) due to the low permethrin mortality (2.11%), followed by LDS (5.83), SRS (3.27) and LRS (2.09). An analysis of the annual correlations between permethrin1x mortality and PBO + permethrin is showing that the correlation is stronger

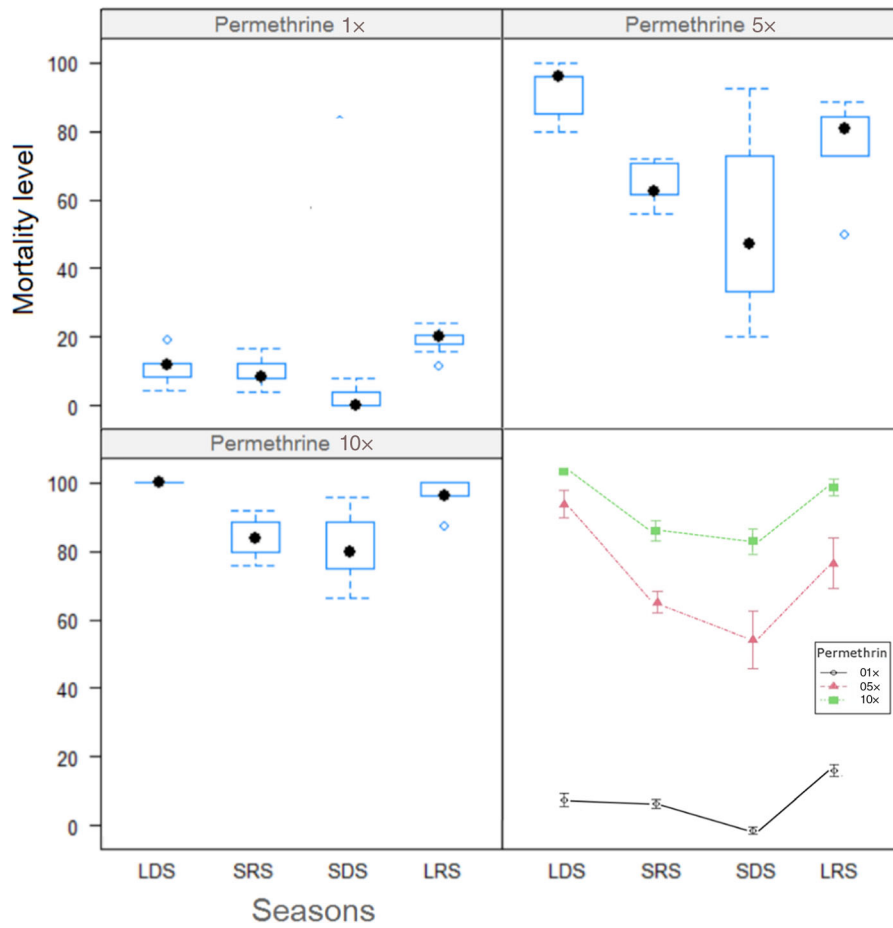


FIGURE 4 Plots of seasonal mortalities (%) of *Anopheles coluzzii* from Ngouso, an urban area of Yaoundé (Cameroon) to three permethrin concentrations (1×, 5×, and 10×) and the overall view of resistance profiles for a year with SE on means from March 2019 to December 2020. LDS, long dry season; LRS, the long rainy season; SDS, short dry season; SRS, the short rainy season.

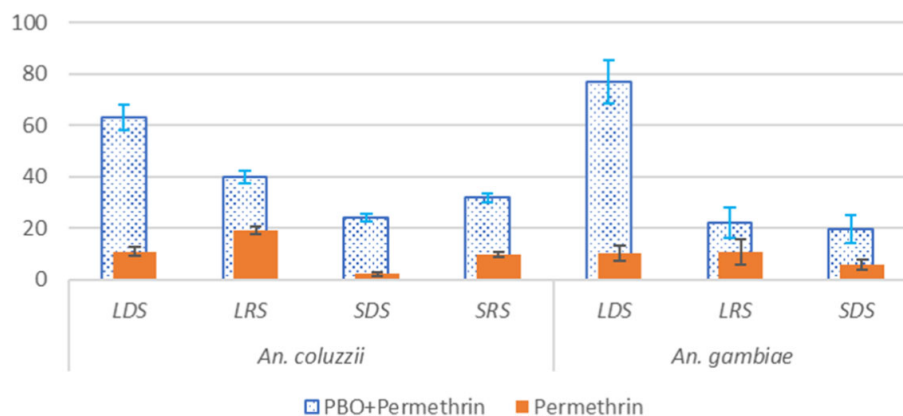


FIGURE 5 Synergist susceptibility profile of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations respectively from Nkolondom and Ngouso (Yaoundé, Cameroon) after 60 min exposure to permethrin and combined permethrin and PBO from March 2019 to December 2020. Data shown as mean mortality with $\pm 95\%$ confidence interval bars. LDS, long dry season; LRS, the long rainy season; SDS, short dry season; SRS, the short rainy season.

when analysing 3 seasons SDS, SRS, and LRS ($r: 0.99, p = 0.03$) than when the LDS is included ($r: 0.41, p = 0.58$). This is linked to the high resistance restoration by PBO observed during this season.

Seasonal variation in metabolic genes expression level

The profile of six of the main metabolic genes was assessed during the main dry and rainy seasons in the two localities.

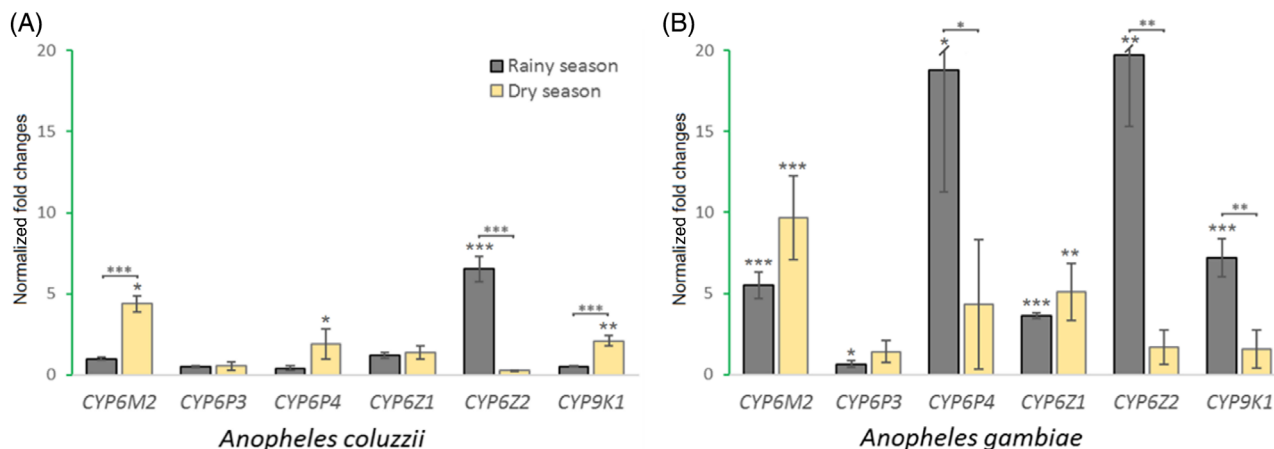


FIGURE 6 The normalized values of fold change variation in main metabolic genes expression level between rainy and dry seasons in malaria vectors populations *Anopheles coluzzii* (a) and *Anopheles gambiae* (b) populations respectively from Nkolondom and Ngouso (Yaoundé, Cameroon) in October 2019. The stars indicate the significance of the expression level of a single gene, or the difference in expression levels between wet and dry seasons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; the first level analyses single gene expression significance while the upper level is comparing difference in expression between two seasons.

In the urban site, a comparison of the differences in the gene expression fold changes for *An. coluzzii* between the rainy and dry seasons (Figure 6a) shows three genes overexpressed during the rainy season and not the dry season (Cyp6M2, Cyp6P4 and Cyp9K1) and one gene with the opposite profile (Cyp6Z2). A comparison by seasons shows three genes with significant differences in expression: Cyp6M2, Cyp6Z2 and Cyp9K1.

For the peri-urban area, *An. gambiae* presented higher levels of over-expression with all the six tested genes showing significant fold change at least during one of the two seasons (Figure 6b): During the rainy season, when farmers are doing high cropping, all the 6 genes were significantly over-expressed. Within the dry season, Cyp6M2 and Cyp6Z1 were the only significantly over-expressed genes. By comparing the fold changes between seasons, we observed three genes with significant variations: Cyp6P4, Cyp6Z2, and Cyp9K1.

Do we have any similarities between both collection areas in terms of gene expression? A r. comparing the 6 genes expression profiles for the two areas reveals a strong similarity within the dry season ($r: 0.83, p = 0.02$) but not for rainy seasons ($r: 0.59, p = 0.16$) thus the two areas show similar profile during the dry season but differ within the rainy season.

DISCUSSION

In this study, we investigated the level of resistance to insecticides of malaria vectors in the urban environment of Yaoundé, the implication of different resistance mechanisms in the process, the seasonal variations in resistance, as well as the mechanism involved. A high level of resistance was observed in the selected areas to all insecticides used, with an implication of metabolic genes in association with target-site mutations. Pyrethroid resistance has been widespread in Cameroon for several years and especially in our study sites (Antonio-Nkondjio et al., 2017).

Vector species composition, correlation with previous studies

The species collected in both localities follow our predictions on the spatial distribution of *An. gambiae* complex members in the urban area and periphery of Yaoundé. This situation has been observed for nearly 10 years (Aguilar et al., 2010; Antonio-Nkondjio et al., 2016; Tene et al., 2013) and has not changed up to today. While this could be predictable in an urban area, it was not the case for the peri-urban site where the ongoing increase in population and urbanization should have been accompanied by a progressive introduction of *An. coluzzii* in the area, following the patterns of both the species distribution in the town (Kamdem et al., 2012; Tene et al., 2010). The evolution may therefore be slower and there are probably other ecological factors involved that are not well clarified. Also, the continuous presence of vectors during all seasons stipulates a perennial transmission of malaria throughout the year.

Observed resistance and intensity at 5× and 10× for pyrethroids

The bioassays carried on the two targeted populations with diagnostic doses of DDT, deltamethrin, and permethrin resulted in mortality rates below 25% after 60 min of insecticide exposure, regardless of collection season. Furthermore, the results of the bioassays for DDT are of particular interest, as they show that the populations are extremely resistant, with no single mortality (0%) in the peri-urban market-gardening area.

Since 2016, WHO decides to incorporate for certain insecticides the 5× and 10× doses when discriminant concentrations are not providing information on the full resistance profile in the field (WHO, 2016). The current high level of resistance to permethrin and

deltamethrin at 5× and 10× is likely to be the result of prolonged selection pressure resulting in mosquitoes with multiple resistance mechanisms: target-site resistance and metabolic resistance. In our vectors, the *KDRw* mutation is nearly fixed in both populations and is associated throughout the year with the overexpression of genes linked to metabolic resistance. This particular profile of multiplicative resistance could be at the base of the observed resistance intensity (Yewhalaw et al., 2011). ‘When resistance is confirmed at the 5× and especially at the 10× concentrations, operational failure is likely’ (WHO, 2016). There is thus a need to move in this area to new insecticides for IRS/LLIN or implement new methods such as larval control and attractive toxic sugar baits.

Causes of high resistance to pyrethroid

In Nkolondom, the peri-urban area, the use of agricultural pesticides may have contributed to the increase in pyrethroid resistance. Many studies, among which some in this particular area, have confirmed that the use of pesticides in agriculture can lead to the selection of resistance in breeding sites due to the bio-accumulation of those pesticides in soils (Diabate et al., 2002; Yadouleton et al., 2009). In Etoa-Meki, the urban area, the selection of resistance could be a result of the pollution observed in breeding sites in the collection area, associated with the domestic use of insecticides and LLINs. Previous studies comparing this area to others in the same town but with the lowest breeding sites pollution (Tene et al., 2013) support this hypothesis, and similar observations on the link between water pollutants and resistance have been made in other countries (Awolola et al., 2007; Diabate et al., 2002; Djouaka et al., 2007; Jones, Toé, et al., 2012; Poupardin et al., 2012). It is nevertheless necessary to remember that selection of resistance is not occurring only in larval stages. For adult mosquitoes, the intensive use of insecticides in LLINs and domestic indoor sprayings is also a factor of selection as observations have been made on a reduction of susceptibility of malaria vectors after LLINs implementations (Czeher et al., 2008). Knowing that in Cameroon the coverage of LLINs was around 73% of houses with at least one LLIN in 2018 (USAID 2020), we can assume that the observed high level of resistance should also be linked to selection pressure from the insecticides used in LLINs. A selection of metabolic resistant strains, in association with *kdr* mutations, could be one of the factors underlying this figure, with cross-resistance leading to loss of susceptibility to other tested insecticides (Chandre et al., 1999).

The investigations of *kdr* mutation frequencies show that the L1014F mutation is nearly (but not fully) fixed in our field populations, this being the result of long-term selection pressure by agricultural pesticides, LLINs insecticides, and domestic insecticides (Yadouleton et al., 2009; Yahouédo et al., 2016). Also, it has recently been shown that the substitutions in the amino acid sequence of the voltage gate sodium channel gene that induce resistance are more complex than actually described (Clarkson et al., 2021). The involvement of some of these not yet well-described mutations in target-site resistance

(Williams et al., 2021) could explain the non-fixation of L1014F mutations in our populations since time.

Bed-nets efficacy tests

The World Malaria Report (WHO, 2020) noted that global progress in the fight against malaria has stalled since 2015 showing an increase in malaria cases between 2015 and 2019, with a possible explanation being the widespread pyrethroid resistance in vectors. A test was done with two formulations of one of the most distributed nets in the country the Olyset® and his newer version OlysetPlus® containing a synergist (piperonyl butoxide) in addition to permethrin. Despite the high resistance profile detected in-field populations, the cone tests gave us satisfying results in the end. If the first version has already lost its efficacy on-field mosquitoes for many years (Pennetier et al., 2013), the combined version, thanks to the presence of synergist, remains well efficient with a mortality level above 90% today. This result is surprising given the presence of many resistance mechanisms in our field populations and the results of WHO tests but remains good as there is still a solution against these resistant field strains. Such information in addition to field condition bed nets efficacy tests in experimental hosts that shows loss of efficacy of some new nets formulations (PBO base nets) (Menze et al., 2020) will help the National Malaria Control Program in the choice of LLINs to be used in the areas of the country where resistance have been described while waiting for the new insecticides formulations to be available for mass usage.

Factors underlying seasonal dynamic of resistance

The seasonal survey was done on *An. coluzzii* in the urban area and reveals an interesting profile in the variation of susceptibility along the year. The mortality rates show various levels of resistance per season. Our sample collections were made in two consecutive years. A comparison of the SDS data from the 2 years showed a strong similarity in the resistance profile over the 2 years. This observation shows that the variation from 1 year to the next is quite low. However, caution should be taken when interpreting these results as they only include data from two consecutive years.

The *kdr* mutations, showed high frequencies with almost no seasonal variation, in contrast to the expression levels of the metabolic genes. Previous studies in similar areas have incriminated urban pollution as the factor stimulating overexpression of metabolic genes (Poupardin et al., 2012; Tene et al., 2012, 2013) and, knowing that there is multiplicative resistance in such situations (Taskin et al., 2016), we expected to have during low rains periods in an urban area the highest pollution in breeding sites leading to high levels of detoxication enzymes production and thus the lowest permethrin mortality. Our results follow this viewpoint for three seasons: LRS, SRS, and SDS with statistically similar profiles. Among them, the LRS is the one having the lowest resistance to permethrin for the three concentrations, and the lowest ratio of PBO susceptibility restoration. Knowing that in this

season the rainfalls are renewing frequently water in breeding sites, the level of pollution is low and thus the linked metabolic enzymes expression also. The resistance profiles of SRS and SDS follow the same pattern, with the SDS having less mortality than the rainy seasons and a higher restoration ratio. The only season not following the pattern is LDS. Here, the level of restoration rises to more than the double of the other seasons. This high implication of metabolic enzymes could be a result of the high level of pollution caused by water stagnation and organic matter decomposition in breeding sites followed by a selection of individuals producing a high level of detoxification enzymes among which some can metabolize insecticides molecules (Muller et al., 2008; Poupardin et al., 2012). However, such high overexpression of detoxification enzymes to metabolize xenobiotics may have weakened those mosquitoes and reduced their ability to overcome insecticides. This fitness cost should be an explanation for the mortality observed during this season. The resistance to 5 \times and 10 \times also follow the seasonal pattern, increasing from SDS to LDS.

In addition to the detected target-site mutation, the implication of metabolic enzymes has been proven firstly by the partial restoration of susceptibility with the synergist piperonyl butoxide (PBO) and over-expression of some metabolic enzymes. The implication of P450s in DDT, permethrin, and deltamethrin have been proven many times, and some specific P450s enzymes have previously been found over-expressed in these vectors species, mainly *cyp6M2*, *cyp6P4*, *cyp9K1*, and *cyp6P3* (Adolfi et al., 2019; Fagbohun et al., 2019). This is the first study comparing gene expression profiles between dry and rainy seasons. The observed profiles of gene expressions showed a similarity between the dry season in both studied areas and a huge difference between the rainy seasons. In the urban area, over-expression is higher during the dry season, this may probably be in link with the accumulation of organic matter decomposition into breeding sites and the concentration of other xenobiotics after water volume reduction due to evaporation (Jones, Toé, et al., 2012; Poupardin et al., 2012; Tene et al., 2013). During the rainy season, constant rains will increase breeding site size and frequently renew their water, resulting in a lower level of xenobiotics concentration. There will then be lower pressure on *Anopheles* larvae in breeding sites, resulting in a less stringent selection of individuals capable of producing high concentrations of detoxification enzymes.

In the peri-urban area, the rainy season is the period of the rapid growth of crops. There is then an intensive usage of insecticides to protect them from pests. This element will then place the maximum selection pressure rather in the rainy season, contrasting what is observed in the other site and resulting in the highest enzyme expressions. Within the dry season, after harvesting, the plantations are abandoned for a period. We then observed a profile similar to that of the urban area, but with a higher overexpression of detoxification enzymes probably due to the presence of pesticide residues in the soil. The presence of these pesticides will lead to a selection at the larval level of individuals with the appropriate genetic background to resist the insecticides, resulting in the emergence of insecticide-resistant adults.

CONCLUSION

Resistance to pyrethroids is spreading in Cameroon, due to selection pressure exerted in others by agricultural pesticides, urban pollution, and insecticides on urban malaria vectors. The mechanisms involved are very complex, with resistance mechanisms combining to define the high level of resistance observed. This resistance shows a temporal dynamic that seems to be linked to the seasonal variation in the specific selection pressure exerted on vectors in breeding sites. This information is crucial for the implementation of vector control programs, precisely in the choice of techniques to be implemented, the adequate LLINs to be deployed, the insecticide molecules to be used at given seasons for the IRS, or other vector control activity to have the best results possible. A period of lower resistance linked to lower vector densities will be the best to implement vector control activities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Billy Tene-Fossog, Charles S. Wondji and Hilary Ranson conceptualized and designed the study. Billy Tene-Fossog, Yvan Gaetan Fotso-Toguem and Nathalie Amvongo-Adjia performed the field collection, bioassays and molecular analysis. Billy Tene-Fossog analysed the data and drafted the manuscript, which was revised by all co-authors. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the farmers in Nkolondom who gave us access to their fields, and all the members of the PIIVeC team who provided us with many good trainings. This work was supported by the Medical Research Council, UK, and Global Challenge Research Fund, through the PIIVeC project based at LSTM (grant number MR/P027873/1).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Billy Tene-Fossog  <https://orcid.org/0000-0003-0010-0450>

Yvan Gaetan Fotso-Toguem  <https://orcid.org/0000-0001-6185-5692>

Hilary Ranson  <https://orcid.org/0000-0003-2332-8247>

REFERENCES

- Abbott, W.S. (1987) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3, 302–303.
- 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 of the United States of America*, 116(51), 201914633.

- Aguilar, R., Simard, F., Kamdem, C., Shields, T., Glass, G.E., Garver, L.S. et al. (2010) Genome-wide analysis of transcriptomic divergence between laboratory colony and field *Anopheles gambiae* mosquitoes of the M and S molecular forms. *Insect Molecular Biology*, 19, 695–705.
- Akogbeto, M.C., Djouaka, R. & Kinde-Gazard, D. (2006) Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malaria Journal*, 5, 22.
- Antonio-Nkondjio, C., Fossog, B.T., Ndo, C., Djantio, B., Togouet, S., Awono-Ambene, P. et al. (2011) *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, 10, 154.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J.D., Awono-Ambene, P., Etang, J. et al. (2019) Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors*, 12, 501.
- Antonio-Nkondjio, C., Poupardin, R., Tene, B.F., Kopya, E., Costantini, C., Awono-Ambene, P. et al. (2016) Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaounde, Cameroon. *Malaria Journal*, 15, 1–11.
- Antonio-Nkondjio, C., Sonhafouo-Chiana, N., Ngadjou, C.S., Doumbe-Belisse, P., Talipouo, A., Djamouko-Djonkam, L. et al. (2017) Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors*, 10, 472.
- Antonio-Nkondjio, C., Tene Fossog, B., Kopya, E., Poumachu, Y., Menze Djantio, B., Ndo, C. et al. (2015) Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaounde (Cameroon). *Malaria Journal*, 14, 155.
- Awolola, T.S., Oduola, A.O., Obansa, J.B., Chukwura, N.J. & Unyimadu, J. P. (2007) *Anopheles gambiae* s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44, 241–244.
- Bass, C., Nikou, D., Donnelly, M.J., Williamson, M., Ranson, H., Ball, A. et al. (2007) Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*, 6, 111.
- B-Bernard, C. & Philogène, B.J.R. (1993) Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 38, 199–223.
- Chandre, F., Darriet, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. et al. (1999) Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15, 53–59.
- Clarkson, C.S., Miles, A., Harding, N.J., O'Reilly, A.O., Weetman, D., Kwiatkowski, D. et al. (2021) The genetic architecture of target-site resistance to pyrethroid insecticides in the African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Molecular Ecology*, 30, 5303–5317.
- Czeher, C., Labbo, R., Arzika, I. & Duchemin, J.-B. (2008) Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malaria Journal*, 7, 189.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T.R., Darriet, F. et al. (2002) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67, 617–622.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Bankole, H.S., Doannio, J.M., Coulibaly, O.N., Kossou, H. et al. (2007) Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malaria Journal*, 6, 159.
- Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P. et al. (2006) First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 795–797.
- Etang, J., Manga, L., Toto, J.C., Guillet, P., Fondjo, E. & Chandre, F. (2007) Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *Journal of Vector Ecology*, 32, 123–133.
- Etang, J., Pennetier, C., Piameu, M., Bouraima, A., Chandre, F., Awono-Ambene, P. et al. (2016) When intensity of deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.l. leads to loss of Long Lasting Insecticidal Nets bio-efficacy: a case study in north Cameroon. *Parasites & Vectors*, 9, 132.
- Fagbohun, I.K., Oyeniyi, T.A., Idowu, T.E., Otubanjo, O.A. & Awolola, S.T. (2019) Cytochrome P450 mono-oxygenase and resistance phenotype in DDT and deltamethrin-resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and *Culex quinquefasciatus* in Kosofe, Lagos, Nigeria. *Journal of Medical Entomology*, 56, 817–821.
- Gillies, M.T. & de Meillon, B. (1968) *The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*, 2nd edition. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research.
- Jones, C.M., Liyanapathirana, M., Agossa, F.R., Weetman, D., Ranson, H., Donnelly, M. et al. (2012) Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6614–6619.
- Jones, C.M., Toé, H.K., Sanou, A., Namountougou, M., Hughes, A., Diabaté, A. et al. (2012) Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS One*, 7, e45995.
- Kamdem, C., Tene Fossog, B., Simard, F., Etouana, J., Ndo, C., Kengne, P. et al. (2012) Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 7, e39453.
- Livak, K. (1984) Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X-chromosome and Y-chromosome that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics*, 107, 611–634.
- Lui, N. (2015) Insecticides resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology*, 60, 537–559.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L. et al. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 7, 179–184.
- Mavridis, K., Wipf, N., Medves, S., Erquiaga, I., Müller, P. & Vontas, J. (2019) Rapid multiplex gene expression assays for monitoring metabolic resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors*, 12, 9.
- Menze, B.D., Kouamo, M.F., Wondji, M.J., Tchagga, W., Tchoupo, M., Kusimo, M.O. et al. (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. et al. (2016) Multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon is mediated by metabolic resistance alongside potential target site insensitivity mutations. *PLoS One*, 11, e0163261.
- Menze, B.D., Wondji, M.J., Tchagga, 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, 317.
- Muller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A. et al. (2008) Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genetics*, 4, e1000286.
- Nwane, P., Etang, J., Chouaibou, M., Toto, J., Koffi, A., Mimpfoundi, R. et al. (2013) Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasites & Vectors*, 6, 41.

- Penner, C., Bouraima, A., Chandre, F., Piameu, M., Etang, J., Rossignol, M. et al. (2013) Efficacy of Olyset® Plus, a new long-lasting insecticidal net incorporating permethrin and piperonyl-butoxide against multi-resistant malaria vectors. *PLoS One*, 8, e75134.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Jones, C.M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S. & David, J.P. (2012) Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicology*, 114–115, 49–57.
- R_Core_Team. (2012) *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. & Collins, F.H. (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9, 491–497.
- Riveron, J.M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K.G., Ibrahim, S.S., Paine, M.J.I. et al. (2013) Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 252–257.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z. & della Torre, A. (2008) Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*, 7, 163.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108.
- Service, M.W. (1993) *Mosquito ecology: field sampling methods*, 2nd edition. London: Springer, Elsevier Applied Sciences.
- Suchel, B. (1972) *Les climats du Cameroun*. Thèse Doctorat d'état Université de Bordeaux III: p. 186.
- Taskin, B.G., Dogaroglu, T., Kilic, S., Dogac, E. & Taskin, V. (2016) Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129, 14–27.
- Tchouakui, M., Tene Fossog, B., Ngannang, B., Djonabaye, D., Tchapgga, W., Njiokou, F. et al. (2019) Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Wellcome Open Research*, 4, 13.
- Tene, B.F., Antonio, C.N., Kamdem, C., Bousses, P., Fontenille, D., Besansky, N.J. et al. (2010) Spatial distribution, habitat characterization and dynamics of *Anopheles gambiae* molecular forms larval biotopes along an urbanization gradient in the city of Yaounde, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 384–385.
- Tene, F.B., Kopya, E., Ndo, C., Menze-Djantio, B., Costantini, C., Njiokou, F. et al. (2012) Water quality and *Anopheles gambiae* larval tolerance to pyrethroids in the Cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Journal of Tropical Medicine*, 10, 1–10.
- Tene, F.B., Poupardin, R., Costantini, C., Awono-Ambene, P., Wondji, C.S., Ranson, H. et al. (2013) Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the City of Yaoundé Cameroon. *PLoS One*, 8, e61408.
- U.S. President's Malaria Initiative. (2020) *Malaria operational plan FY 2020*. Cameroon: USAID/PMI.
- WHO. (2016) *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2019) *World malaria report 2019*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2020) *World malaria report 2020: 20 years of global progress & challenges*. Geneva: WHO Press.
- Williams, J., Cowlshaw, R., Sanou, A., Ranson, H. & Grigoraki, L. (2021) In vivo functional validation of the V402L voltage gated sodium channel mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Pest Management Science*, 78(3), 1155–1163.
- Wondji, C.S., Dabire, R.K., Tukur, Z., Irving, H., Djouaka, R. & Morgan, J.C. (2011) Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 484–491.
- Yadouleton, A.W., Asidi, A., Djouaka, R.F., Braima, J., Agossou, C.D. & Akogbeto, M.C. (2009) Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal*, 8, 103.
- Yahouédo, G.A., Cornelie, S., Djègbè, I., Ahlonsou, J., Aboubakar, S., Soares, C. et al. (2016) Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasites & Vectors*, 9, 385.
- Yewhalaw, D., Wassie, F., Steurbaut, W., Spanoghe, P., Van Bortel, W., Denis, L. et al. (2011) Multiple insecticide resistance: an impediment to insecticide-based malaria vector control program. *PLoS One*, 6, e16066.

SUPPORTING INFORMATION




Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

Table S1. Mortalities recorded for various insecticides during the four seasons in Etoa-Meki (*Anopheles coluzzii*) and Nkolondom (*Anopheles gambiae*) in 2019 and 2020.

How to cite this article: Tene-Fossog, B., Fotso-Toguem, Y.G., Amvongo-Adjia, N., Ranson, H. & Wondji, C.S. (2022) Temporal variation of high-level pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. in Yaoundé, Cameroon, is mediated by target-site and metabolic resistance. *Medical and Veterinary Entomology*, 36(3), 247–259. Available from: <https://doi.org/10.1111/mve.12577>

Article

Genetic Diversity of Cytochrome P450s *CYP6M2* and *CYP6P4* Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* from Yaoundé, Cameroon

Yvan Fotso-Toguem ^{1,2} , Billy Tene-Fossog ^{1,*}, Leon M. J. Mugenzi ¹, Murielle J. Wondji ^{1,3}, Flobert Njiokou ^{1,2}, Hilary Ranson ³  and Charles S. Wondji ^{1,3} 

¹ Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé P.O. Box 13591, Cameroon

² Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé P.O. Box 812, Cameroon

³ Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L35QA, UK

* Correspondence: billy.tene@lstmed.ac.uk

Abstract: Assessing the genetic diversity of metabolic resistance genes, such as cytochrome P450s, helps to understand the dynamics and evolution of resistance in the field. Here, we analyzed the polymorphisms of *CYP6M2* and *CYP6P4*, associated with pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*, to detect potential resistance markers. Field-caught resistant mosquitos and susceptible lab strains were crossed, and F4 was exposed to permethrin for 15 min and 90 min to discriminate highly susceptible (HS) and highly resistant (HR) mosquitos, respectively. Significant permethrin mortality reduction was observed after pre-exposure to PBO, suggesting the gene involvement of P450s. qPCR analysis revealed significant overexpression of *CYP6M2* ($FC = 19.57$ [95% CI 13.96–25.18] for *An. coluzzii*; 10.16 [7.86–12.46] for *An. gambiae*) and *CYP6P4* ($FC = 6.73$ [6.15–7.30] *An. coluzzii*; 23.62 [26.48–20.76] *An. gambiae*). Full-gene and ≈ 1 kb upstream were sequenced. For *CYP6M2*, the upstream region shows low diversity in HR and HS (overall $Hd = 0.49$, $\pi = 0.018$), whereas the full-gene shows allelic-variation but without evidence of ongoing selection. *CYP6P4* upstream region showed a lower diversity in HR ($Hd = 0.48$) than HS ($Hd = 0.86$) of *An. gambiae*. These results highlighted that *CYP6P4*-associated resistance is potentially driven by modification in upstream region. However, further work is needed to determine the real causative variants that will help design rapid detection tools.

Keywords: *CYP6M2*; *CYP6P4*; polymorphism; metabolic resistance; pyrethroid; *Anopheles coluzzii*; *Anopheles gambiae*



Citation: Fotso-Toguem, Y.; Tene-Fossog, B.; Mugenzi, L.M.J.; Wondji, M.J.; Njiokou, F.; Ranson, H.; Wondji, C.S. Genetic Diversity of Cytochrome P450s *CYP6M2* and *CYP6P4* Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* from Yaoundé, Cameroon. *Genes* **2023**, *14*, 52. <https://doi.org/10.3390/genes14010052>

Academic Editor: Fabrizio Lombardo

Received: 21 November 2022

Revised: 14 December 2022

Accepted: 19 December 2022

Published: 23 December 2022



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

Malaria cases significantly decreased from 2000 to 2015, mainly due to the scaling up of vector control interventions. This decrease was attributed largely to the enormous distribution of Insecticidal Treated Nets (ITNs) with the number of households in sub-Saharan Africa having at least one net increasing from 5% in 2000 to 65% in 2020 [1,2]. Unfortunately, the indiscriminate use of pesticides in the agricultural sector combined with indoor residual spraying (IRS) and the massive distribution of pyrethroid-impregnated nets selected resistance in vector populations in endemic areas [3–6]. Moreover, the COVID-19 pandemic disrupted vector control activities in most countries, leading to a rebound in mortality from 409,000 malaria associated deaths in 2019 to 627,000 in 2020 [2]. Insecticide resistance, which now extends to almost all classes of insecticides used in public health, remains a major concern for the effectiveness of vector control tools [7]. It is therefore imperative to implement appropriate insecticide resistance management strategies as a

proactive approach to maintain the effectiveness of these interventions and to reduce the negative impact of resistance.

The development of insecticide resistance is a complex process depending directly on genetic, physiological, behavioral and ecological factors [8]. In *Anopheles* mosquitos, resistance is mainly conferred by target site and metabolic mechanisms [6,9]. Metabolic resistance involves an increase in production, or more efficient forms, of detoxication enzymes capable of breaking down the insecticide before it reaches its target; the cytochrome P450 family is commonly considered the most important in insecticide detoxification, especially for the metabolism of pyrethroid [9,10]. Cytochrome P450-mediated resistance can often be reversed by the use of synergists, such as piperonyl butoxide (PBO), which inhibit the activity of this enzyme family. Large-scale field trials by Protopopoff et al. [11] and Staedke et al. [12] have shown that nets incorporating this synergist are effective against P450-mediated resistance. Given the continued importance of pyrethroids in ITNs, it is imperative to understand the genetic mechanisms that impact their efficacy to optimize the deployment of PBO-nets and to establish good insecticide resistance management protocols.

Members of the CYP family, including *CYP6M2* and *CYP6P4*, have been functionally associated with metabolic resistance to at least one class of insecticides widely used in vector control, and both are pyrethroid metabolizers [13,14]. *CYP6M2* is overexpressed in multiple populations resistant to type I and II pyrethroids [13,15], organochlorines [16] and carbamates [17]. Interrogation of the *Anopheles gambiae* 100 Genomes project (Ag1000G) identified several amino acid substitutions within *CYP6M2*, grouping into 5 haplotype groups, but none of these was directly linked with resistance [18]. The *CYP6P4* gene has been established as a resistance-associated gene that explains the resistance to permethrin observed in the field in *An. arabiensis* populations in the Sudano–Sahelian region [14,19]. Recently, Njoroge et al. [20] identified in *An. gambiae* a selective sweep localized within a cluster of P450 genes including *CYP6P4* in mosquitos from Uganda. A haplotype, containing three mutations, I236M in *CYP6P4*, an upstream transposable element (TE) insertion and a *CYP6AA1* duplication is strongly associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae* from Uganda. In particular, the I236M mutation is strongly associated with increased overexpression of the *CYP6P4* gene capable of metabolizing pyrethroids, notably deltamethrin. Moreover, the overexpression of a group of genes, including *CYP6P4* in *Anopheles* populations, was associated with the loss of efficacy of some ITNs in Tanzania [21].

In Cameroon, P450s have been found widely implicated in metabolic resistance to pyrethroids, DDT and Bendiocarb in *An. gambiae* s.l. populations [22–24] and are at least partially responsible for the reduced efficacy of bed nets for *An. gambiae* s.s. [25]. The challenge in detecting simple point-mutation markers for metabolic resistance in contrast to target-site resistance, such as knockdown resistance (*kdr*), includes the size of the gene families involved in the detoxication process, the redundancy between their members and the multiple mechanisms by which metabolic resistance can arise [26]. A major milestone was recently reached with the development of field-applicable diagnostic tools for P450-mediated resistance in *An. funestus*, taking advantage of a mutation linked to the overexpression of *CYP6P9a* and the variants in *cis*-regulatory elements of *CYP6P9b* [27–29]. Such tools are less readily available for *An. gambiae* although, as described above, a triple mutant haplotype in *CYP6P4* was recently linked to resistance in East Africa [20].

Transcriptomic analysis in field populations of *An. gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* have revealed several overexpressed detoxication genes, irrespective of the presence of *kdr*-mutations [4,17,22,30]. Similarly, studies conducted by the Ag1000G have identified strong selective sweeps in clusters of CYPs known to be implicated in resistance [31]. The elucidation of the roles played by major resistance genes and the changes in the genetic diversity underlying their expression are essential to design DNA-based diagnostic tools to detect and track metabolic resistance in the field.

In this study, we analyzed the polymorphism of *CYP6M2* and *CYP6P4* in *An. gambiae* and *An. coluzzii* to detect potential resistance markers following the same approach as Weedall et al. [29] based on target DNA-sequencing of highly permethrin-resistant and

highly susceptible samples selected from reciprocal crosses. We report a comprehensive analysis of the putative promoter and full-gene region of these genes in *An. coluzzii* and *An. gambiae* from Yaoundé-Cameroon.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Clearance

The National Ethics Committee for Health Research of Cameroon approved the protocol of the study under the ethical clearance No. 2019/10/1195/CE/CNERSH/SP and reference No. 0977/MINSANTE/SESP/SG/DROS/.

2.2. Mosquito Samples Processing

2.2.1. Mosquito Collection

Mosquito collections were carried out from December 2018 to March 2019 (dry season) and from July to August 2019 (rainy season) in Ngouso ($3^{\circ}54'22.36''$ N, $11^{\circ}32'20.36''$ E) and Nkolondom ($3^{\circ}57'6.99''$ N, $11^{\circ}29'51.67''$ E), two neighborhoods of Yaoundé, the capital city of Cameroon. These collection areas have been chosen based on species distribution and the detection of pyrethroid resistance as described in previous studies [22,32,33] predicting the presence of *An. coluzzii* in Ngouso and *An. gambiae* in Nkolondom, with detected metabolic resistance. Larvae were sampled by dipping methods [34], in more than 20 breeding sites and pooled areas, then taken to the insectarium of the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID) in Yaoundé, where they were reared under standard laboratory conditions to the adult stage.

2.2.2. Insecticide Bioassays and PBO-Based Synergist Test

Bioassays were conducted with female mosquitos obtained from field-collected larvae. Two- to five-day-old, unfed F_0 females of *An. coluzzii* and *An. gambiae* were exposed for 1 h in WHO tube tests according to WHO procedures to 0.75% permethrin ($1\times$). After observing resistance (mortality less than 95% [35]), we followed up with higher concentrations (3.5% ($5\times$), then 7.5% ($10\times$)) for the evaluation of resistance intensity [35].

To determine the possible implication of cytochromes P450 in the observed phenotypic resistance to pyrethroids, a test with synergist (PBO) that inhibits the effect of those P450s was done. F_0 females were exposed to 4% PBO [36] for 1 h followed by an immediate second exposure to permethrin (0.75%) for another 1 h. The mortality was determined 24 h post-exposure and compared with mortality obtained for the mosquitos exposed to the 0.75% permethrin only using a Chi-square test of significance.

2.2.3. Mosquito Selection

In the high pyrethroid resistance context of our collection areas, it was difficult to have enough susceptible samples from the field to run a comparative analysis between resistant and susceptible. Therefore, crossings between selected field permethrin-resistant and lab-susceptible strains from the same species were done as follows: *An. coluzzii* with Ngouso lab strain; *An. gambiae* with Kisumu lab strain. This follows the process described by Wondji et al. [37] and Cattell et al. [38]. To have distinguished phenotypes, F_4 individual progenies obtained from those crosses were then segregated based on their resistance phenotype by exposing 3- to 5-day-old females to 0.75% permethrin at two different exposure times: 15 min and 90 min. After 24 h, dead individuals from the 15 min exposed batch were considered highly susceptible (HS) groups, while those who survived after the 90 min exposure time were considered highly resistant (HR) groups [37]. Samples were then stored on silica gel for the dead and in RNAlater[®] for the survivors for subsequent molecular analysis.

2.3. Molecular Analysis

Genomic DNA (gDNA) was extracted using the LIVAK method [39] from 30 female mosquitos (F_0) morphologically identified as belonging to the *An. gambiae* complex [40,41]

originating from both collection sites and two sets each of 60 HR and HS mosquitos (F_4) for both *An. coluzzii* and *An. gambiae*. Molecular identification was achieved through a polymerase chain reaction (PCR) described by Santolamazza et al. [42].

2.3.1. Genotyping of *Kdr*-Mutation Alleles

To establish the frequency of each of the *kdr*-mutations (*L1014F*, *L1014S*, *N1575Y*), genomic DNA of previously extracted samples were used to run the TaqMan assays described by Bass et al. [43] and Jones et al. [44]. The reaction mixture of 10 μ L final volume containing 1 \times Sensimix (Bioline), 1 \times primer/probe mix and 1 μ L template DNA was used for this assay. The probes were labeled with two distinct fluorophores [43]: FAM to detect the resistant alleles (*L1014F-kdr* and *L1014S-kdr*) and HEX to detect the susceptible allele (*L1014*). For *N1575Y*, the detection was performed by using the primer/probe described by Jones et al. [44]. The assay was performed following cycling conditions of 95 $^{\circ}$ C for 10 min, 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 60 $^{\circ}$ C for 1 min.

2.3.2. Investigation of the Expression Profile of Six Main Candidate-Resistance Genes

The expression profiles of six genes were investigated by quantitative Reverse Transcriptase PCR (qPCR): *CYP6M2*, *CYP6P3*, *CYP9K1*, *CYP6Z1*, *CYP6Z2* and *CYP6P4*. For three biological replicates of 10 F_0 females that recovered 24 h post-exposure to permethrin and 3 batches of 10 susceptible females of laboratory Ngoussou (*An. coluzzii*) or Kisumu (*An. gambiae*), total RNA was extracted using the Arcturus PicoPure RNA isolation kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), followed by cDNA synthesis using Superscript III (Invitrogen[®]) with oligo-dT₂₀ and RNase H, according to the manufacturer instructions. A qPCR reaction was performed following the protocol of Riveron et al. [45]. Fold changes and expression levels of each gene in field-caught permethrin-resistant (R) mosquitos and susceptible laboratory strain (S) samples were computed for both *An. coluzzii* and *An. gambiae* according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [46] following standardization with the housekeeping genes *ribosomal protein S7* (*RPS7*; VectorBase accession number: AGAP010592) and *Elongation factor* (VectorBase accession number: AGAP005128). The primers used here are those previously described by Mavridis et al. [47].

2.3.3. Amplification and Direct Sequencing of Upstream and Full Gene Regions of *CYP6M2* and *CYP6P4*

Exploiting the *An. gambiae* reference genome (VectorBase accession number: AGAP008212 and AGAP002867, respectively), both *An. coluzzii* and *An. gambiae* primers were designed for the amplification of a 1-kb upstream and full-gene length of *CYP6M2* and *CYP6P4* using Primer3 online software (v4.0.0; <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>, accessed on 23 August 2019). The upstream region and full-gene length of each species were amplified from the gDNA of 10 samples of susceptible strain and two sets each of 10 HR and 10 HS female F_4 mosquitos. The reaction mixture comprised 1.5 μ L of 10 \times Buffer A (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA); 0.75 μ L of 25 mM MgCl₂; 0.12 μ L of 25 mM dNTPs; 0.12 μ L of 5 U/ μ L Kapa Taq DNA polymerase; 0.51 μ L each of the forward and reverse primer; 10.49 μ L of double distilled water; and 1 μ L of genomic DNA template. The thermocycling conditions of upstream and gene were the same for both *An. coluzzii* and *An. gambiae*. However, the annealing temperature (T_a) was different (Supplementary Table S1). Briefly, the conditions are: initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 min followed by 35 cycles each of 30 s at 94 $^{\circ}$ C (denaturation), 2 min at primer annealing temperature, 1 min 30 s at 72 $^{\circ}$ C (elongation) and a final extension step at 72 $^{\circ}$ C for 10 min. All the PCR products *CYP6M2* and *CYP6P4* were purified using QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and ExoSAP-IT[™], respectively, according to the manufacturer's protocol, and sent for sequencing at GENEWIZ UK LTD[®] using the same PCR primers.

2.3.4. In Silico Prediction of Promoter Region of CYP6M2 and CYP6P4

The *CYP6M2* and *CYP6P4* 1-kb upstream region was analyzed to identify any regulatory features, such as TATA box, CCAAT box and GC box, found in the sequence using GPMiner [48] as done to detect key resistance variants for CYP6P9a/b in *An. funestus* [28,29]. Additionally, the potential transcription factor binding sites (TFBSs) involved in the regulatory mechanism of resistance were identified in each upstream sequence [49,50], using a prediction software ALGGEN Promo (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/, accessed on 20 June 2022) in which positional weight matrices (PWM) are constructed from eukaryotic binding sites extracted from TRANSFAC [51], with a focus on human and mouse.

2.3.5. Polymorphism-Based Analysis of Genomic DNA Sequence

Polymorphism analysis was carried out through the manual examination of the sequence traces using BioEdit version 7.2.3.0 [52] and/or nucleotides/amino acid differences from multiple sequence alignments. Genetic parameters, such as the number of haplotypes (h) and their diversity (Hd); number of polymorphic sites (S); and nucleotide diversity (π) were computed using DnaSP v6 [53]. Population Analysis with Reticulate Trees (PopART) version 1.7 software was used to construct haplotype networks showing the distribution of haplotypes per study site or species. MEGA 6.06 software was used to construct the Maximum Likelihood tree based on a specific parameter distance model according to the specific region with 1000 bootstrap replicates [54].

After polymorphism analysis, simple assays of Restriction fragment length polymorphism (RFLP) or Allele-specific PCR (AS-PCR) based on key mutations consistently found in higher frequencies in HR than in HS from F4 populations and the susceptible lab strain were designed to assess their frequency in field-caught populations.

2.3.6. Detection of Key Polymorphisms in *An. gambiae* CYP6M2 and CYP6P4

PrimerQuest tools (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/> accessed on 20 June 2022) were used to design a PCR-RFLP and AS-PCR that could detect the key mutations found in *CYP6M2* and *CYP6P4* genes. These mutations were selected based on their frequency of occurrence by comparing HR, HS and susceptible lab strain Kisumu. AS-PCR assays were then designed for the genotyping of non-synonymous mutations A392S in *CYP6M2* and C168S in *CYP6P4*, using different sets of primers (Supplementary Table S2). Primers were designed manually to match the mutation, and an additional mismatched nucleotide was added in the 3rd nucleotide from the 3' end of each inner primer to enhance the specificity as done previously by Tchouakui et al. [55]. RFLP PCRs, capable of discrimination between the mutant allele of the upstream region of *CYP6M2* and for both upstream and gene regions of *CYP6P4*, were designed based on specific restriction enzymes: BsrDI for the upstream region of *CYP6M2*, PvuII and EagI for *CYP6P4*, respectively. The restriction site was identified in the sequences of HR samples and absent in the sequences of Kisumu. Ten microliters of the digestion mix made of 1 μ L of 10 \times NEBuffer 2.1, 0.2 μ L of 2 U of respective restriction enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 5 μ L of PCR product and 3.8 μ L of dH₂O was incubated at specific temperatures for 2 h, as presented in Supplementary Table S2. According to the specific region, PCR products obtained in all the assays were separated on 2% agarose gel, stained with Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH) and visualized using a gel imaging system to confirm the product sizes (Supplementary Table S2).

To evaluate the assay described above, the F4 progeny from a cross between field-caught permethrin-resistant from Nkolondom and susceptible laboratory strain was genotyped for 30–50 mosquitoes and correlated with the established resistance phenotype using the odds ratio and Fisher's exact test [56].

2.4. Data Analysis

The results of bioassays were interpreted based on percentage mortalities with standard error on the means (SEM) calculated and corrected when needed following WHO

protocol [35]. Results of mortalities from synergist–permethrin exposure were compared with values obtained from exposure to pyrethroid alone using a two-tailed Chi-Square test of independence, with a level of significance set as $p < 0.05$, then implemented in GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). To investigate the association between specific mutations and the ability of the mosquitos to survive, Vassarstats was used to estimate the Odds Ratio (OR) based on a fisher exact probability test with a 2×2 contingency table.

3. Results

3.1. Species Identification and Susceptibility to Insecticides

The molecular identification of collected mosquitos confirmed the spatial distribution of the two species of *An. gambiae* complex: on 90 randomly tested samples per area, *An. coluzzii* was found exclusively in Ngouso, the urban area, whereas *An. gambiae* was found exclusively in Nkolondom, the peri-urban area.

F_0 populations of *An. coluzzii* showed resistance to permethrin with a mortality rate of $8.33\% \pm 1.43\%$ for all the samples tested. A pre-exposure to PBO revealed a 23.67% recovery of susceptibility (Figure 1a), with mortality rising to $32\% \pm 2.74\%$ ($\chi^2 = 64.37$, $p < 0.0001$). The susceptibility of F_0 *An. gambiae* to permethrin, showed a similar trend to what was observed in *An. coluzzii* with a mortality of $9.98\% \pm 3.43\%$. An increase in mortality with PBO was also observed, up to $25\% \pm 9.65\%$ ($\chi^2 = 56.39$, $p < 0.0001$), representing a recovery of 16% (Figure 1a). These results suggest an involvement of cytochromes P450 in the resistance pattern observed in this population.

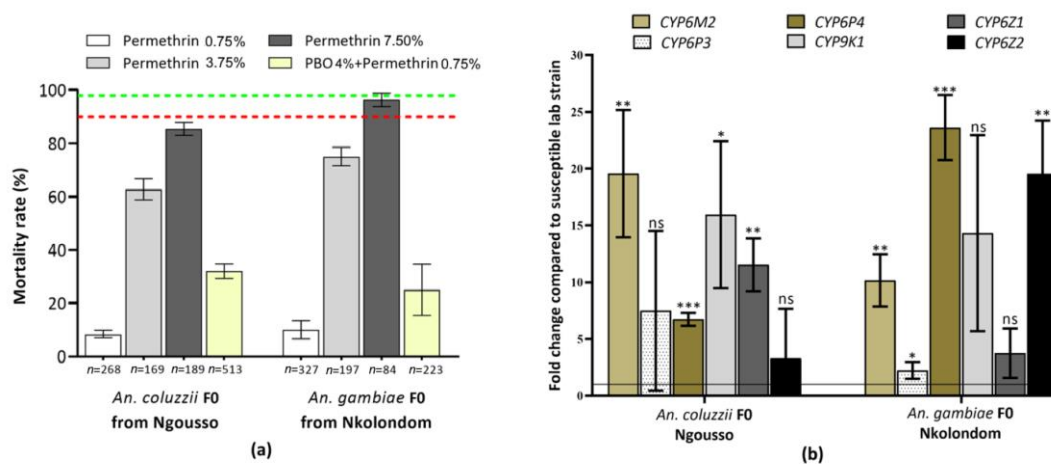


Figure 1. Resistance profile of *An. coluzzii* and *An. gambiae* to Permethrin. (a) Activities of PBO combined to permethrin on *An. coluzzii* from Ngouso and *An. gambiae* from Nkolondom, Cameroon. Data are shown as median \pm SEM. (b) Differential expression of some metabolic resistance genes among the Ngouso and Nkolondom resistant mosquito populations as compared with Ngouso or Kisumu laboratory strain, respectively, to the species. Degree of significance of differential expression in comparison with susceptible strains: “****” < 0.0005 p -values, “***” < 0.005 , “**” < 0.05 , “ns”: non-significant.

The resistance intensity test with $5\times$ and $10\times$ concentrations of permethrin revealed a high level of resistance in both species. In *An. coluzzii*, the mortality rate increased from $62.73\% (\pm 3.99)$ for $5\times$ permethrin to $85.41\% (\pm 2.49)$ for $10\times$ permethrin. In *An. gambiae*, the mortality rate increased from $75.02\% (\pm 3.49)$ to $96.33\% (\pm 9.79)$ for permethrin $5\times$ and $10\times$, respectively (Figure 1a).

3.2. Expression Profile of CYP6M2 and CYP6P4

Resistant *Anopheles* populations from Nkolondom and Ngouso showed significant variation in metabolic gene expression between the two species for some of the tested genes. Both *CYP6P4* and *CYP6M2* were overexpressed in *An. coluzzii* F_0 at a significant level ($p < 0.05$) with a fold change (FC) of 19.57 [95% CI 13.96–25.18] for *CYP6M2* and 6.73 [6.15–7.30] for *CYP6P4* compared to the susceptible laboratory colony (Figure 1b).

In *An. gambiae*, those genes were also found to be overexpressed (*CYP6M2*: FC = 10.16 [7.86–12.46] and *CYP6P4*: FC = 23.62 [26.48–20.76]) (Figure 1b).

Moreover, in *An. coluzzii*, a significant over-expression of *CYP9K1* and *CYP6Z1* was observed in resistant compared to the Ngousso laboratory strain mosquitos (FC = 15.95 [9.48–22.43], $p = 0.0168$; FC = 11.53 [9.20–1386], $p = 0.0015$, respectively); and for *An. Gambiae*, *CYP6Z2* and *CYP6P3* were significantly overexpressed in resistant compared to Kisumu lab strain mosquitos (FC = 19.54 [14.83–24.24], $p = 0.0024$; FC = 2.23 [1.49–2.96], $p = 0.0443$, respectively) (Figure 1b).

3.3. Detection of the Knockdown Resistance Mutations

Among the three *kdr* mutations tested, only the 1014F *kdr*-mutations were detected in any of the sites/species. This mutation was found fixed in the *An. gambiae* population from Nkolondom (1.00) and nearly fixed (0.93) in the *An. coluzzii* population from Ngousso (Supplementary Table S3). In F4 from crosses for both species, the HR samples showed the highest 1014F allelic frequency, 0.80 for *An. coluzzii* and 0.84 for *An. gambiae* (Figure 2), while in the HS sample, we obtained 0.07 for *An. coluzzii* to 0.10 for *An. gambiae* on 30 samples per batch.

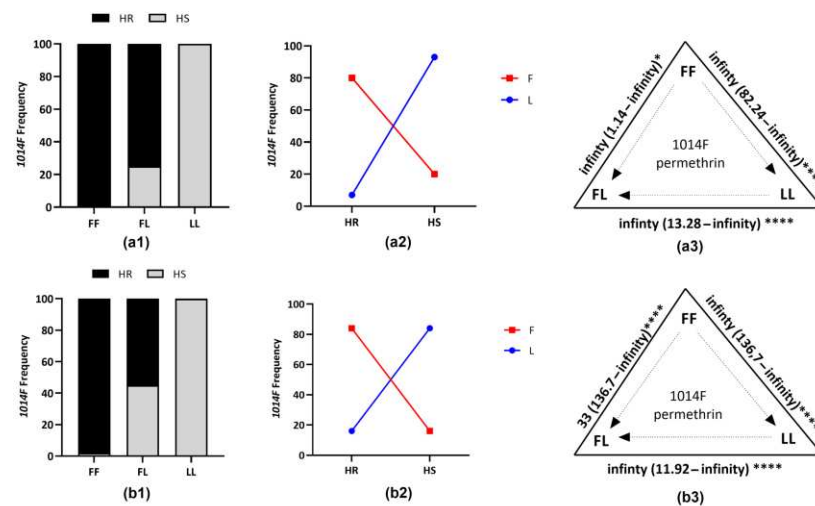


Figure 2. Correlation between L1014F *kdr* and permethrin-resistance phenotype in *An. coluzzii* and *An. gambiae* from F4. (a1,b1) Distribution of *kdr* L1014F genotypes in dead and alive F4 mosquitos from *An. coluzzii* and *An. gambiae* crossings, respectively, after WHO bioassays with 0.75% permethrin. (a2,a3,b2,b3) Association between frequency of 1014F and ability of F4 mosquitos, respectively, from *An. coluzzii* and *An. gambiae* crossings to survive to WHO bioassays with 0.75% permethrin, showing a very strong link between 1014F *kdr* mutation and permethrin-resistance phenotype. HR, Highly resistant; HS, Highly susceptible; FF, homozygous resistant; FL, heterozygous resistant; LL, homozygous susceptible; F, resistant allele (L1014F); L, susceptible allele (L1014). Significance is shown by * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, as estimated using Fisher's exact test.

3.4. Association of Polymorphisms in *CYP6M2* and Pyrethroid Resistance

3.4.1. Polymorphism Analyses of the Upstream Region of *CYP6M2*

To have a view of the potential regulatory elements driving the overexpression of *CYP6M2*, *An. gambiae* mosquito samples were used as a model. After cleaning and aligning the sequences, an indel of 8 bp (TAGTTACT) was found and is linked to the presence of the G/T mutation (Guanine replaced Thymine at position 316) in the HR (7/8 sequences) and HS samples (5/6). This Indel was absent for all the Kisumu tested as the G/T mutation is here absent. Supplementary Table S4 shows the frequency of this indel across the groups used. The core promoter elements detected by GPMiner include TATA boxes (9 in the insertion carriers and 6 in the others), CCAAT box (1 in the insertion carriers and 2 in deletion carriers) and 1 GC box (Supplementary Figure S1). Furthermore, the *CYP6M2*

upstream region also contains transcription factors binding sites in all the samples tested, including 2 AhR/ARNT, 4 nrf2/MAF as well as several minority sites for GATA and MYB transcription factors (Supplementary Figure S1).

The 932 bp upstream sequences of *CYP6M2* were aligned for 20 individuals of *An. coluzzii* (5 HR, 8 HS and 7 Ngousso strain) and 17 of *An. gambiae* (8 HR, 6 HS and 6 Kisumu lab strain) (Supplementary Figure S2). For *An. coluzzii*, we observed that HR mosquito samples exhibited a low genetic diversity marked by a reduced haplotype diversity with one haplotype and no polymorphic sites detected (Table 1, Supplementary Figure S3), compared to HS where 23 polymorphic sites were found in 4 haplotypes (h) with a high haplotype diversity ($Hd = 0.60$) and to the Ngousso strain ($h = 3$; $Hd = 0.44$). The haplotype network (Figure 3(a1)) and phylogenetic tree (Figure 3(a2)) showed a predominance of Hap_1 (75%) in the HR mosquitos compared to other groups with a marked difference in the haplotype diversity, suggesting that a possible selection could be acting on this gene or in nearby genes. Higher diversity is observed in the HS group with a high number of mutational steps between haplotypes, with the presence of two Indels of 3 bp and 8 bp. A positive Tajima's D was observed in *An. Coluzzii*, indicating a decrease in population size and/or balancing selection.

Table 1. Summary statistics for the polymorphism of *CYP6M2* upstream region in permethrin highly susceptible and highly resistant.

Species (Size)	Populations	2n	S	H (Hd)	Π	D	D *
<i>An. coluzzii</i> (932 bp)	HR F ₄	10	0	1 (0.000)	0.00000	n.a	n.a
	HS F ₄	16	23	4 (0.600)	0.01221	2.387 *	1.592 **
	Ngousso	14	1	2 (0.440)	0.00049	0.842	1.581
	All	40	24	5 (0.431)	0.00645	0.103	1.722 **
<i>An. gambiae</i> (932 bp)	HR F ₄	16	23	2 (0.233)	0.00583	−0.917	1.623 **
	HS F ₄	12	20	2 (0.303)	0.00659	−0.373	1.593 **
	Kisumu	6	1	2 (0.533)	0.00057	0.851	1.053
	All	34	49	5 (0.492)	0.01831	1.474	1.859 **

2n, number of unphased sequences; D, Tajima's statistics; D*, Fu and Li's statistics; H, number of haplotypes; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphic sites; n.a = non-attributed; Hd, haplotype diversity; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.02$.

In *An. gambiae*, no difference was observed when comparing the polymorphism parameters of the HR and HS groups, with a similar number of polymorphic sites (23 vs. 20) and a low haplotype diversity, 0.23 and 0.30 in HR and HS, respectively. However, a difference was observed between these groups and the susceptible lab Kisumu where the number of haplotypes is $h = 4$ with an equivalent high haplotype diversity $Hd = 0.60$ (Table 1). The haplotype network (Figure 3(b1)) and phylogenetic tree (Figure 3(b2)) showed that Hap_3 was the most represented (70%) and shared by HR and HS. Other haplotypes, such as Hap_1 (12%) and Hap_2 (6%), were found in the HS group, while Hap_5 was only found in the HR group (Figure 3(b1), Supplementary Figure S3). This Hap_3 has the same sequence as the main haplotype (Hap_1) found in *An. coluzzii*. The negative values of the neutral test Tajima are indicative of purifying selection in HR and HS groups but are not statistically significant.

3.4.2. Polymorphism Analyses of the Full-Gene Region of *CYP6M2*

The full-gene of *CYP6M2* was successfully sequenced in 21 and 28 individuals of both *An. coluzzii* (10 HR, 9 HS, 9 Ngousso strain) and *An. gambiae* (7 HR, 7 HS, 7 Kisumu lab strain), respectively (Supplementary Figure S2). The nucleotide sequence analysis of this fragment exhibited a lower number of haplotypes (8) and polymorphic sites (20) in *An. coluzzii* HR as compared to 14 haplotypes and 27 polymorphic sites in HS individuals (Table 2, Supplementary Figure S4). This is evident in the lower number of synonymous (11 and 13) and non-synonymous (7 and 10, respectively) mutations but not when compared with lab strain Ngousso (Table 2). The haplotype network (Figure 4(a1)) and phylogenetic tree (Figure 4(a2)) analysis showed a predominance of Hap_3 (21%), which was shared by all mosquito groups tested. Most haplotypes are separated from each other by 1 to 4 mutational steps and have probably derived from common ancestral susceptible strains.

In *An. gambiae*, HR mosquitos showed 36 polymorphic sites with 14 non-synonymous mutations compared to 44 polymorphic sites giving all 14 non-synonymous mutations in HS (Table 2). The haplotype network and phylogenetic profile showed two clear clusters among 20 *An. gambiae* haplotypes, a resistant cluster with 6 haplotypes and a susceptible cluster with 5 haplotypes (Figure 4(b1,b2)). But, in both species, a star-like shape of the haplotype network indicates a high frequency of intermediate variants, which can be an indication of population expansion.

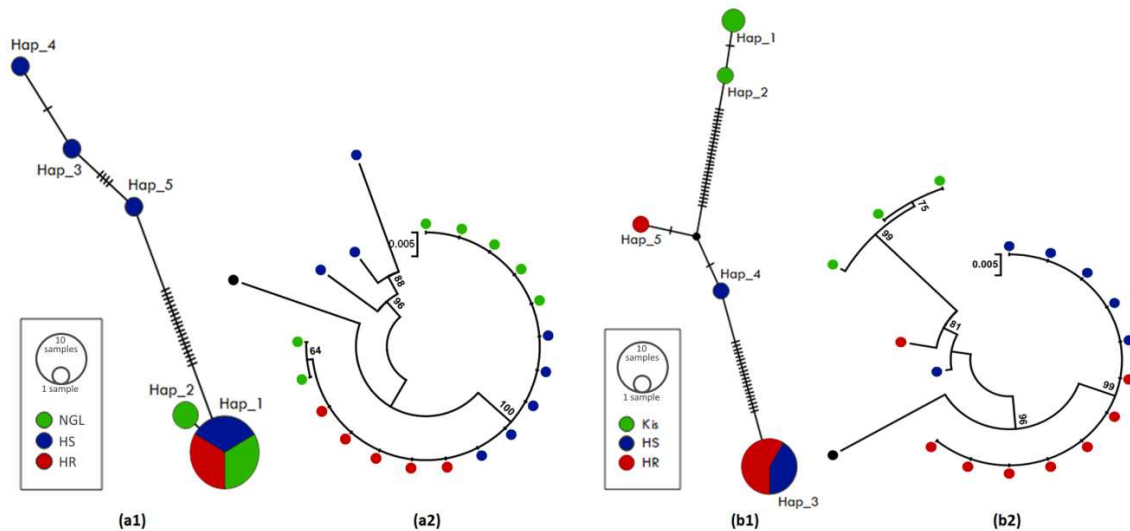


Figure 3. Patterns of the genetic variability and polymorphism of the upstream region of *CYP6M2*. (a1) TCS-network of the *An. coluzzii* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_1, inset); (a2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. coluzzii* sequences generated using Tamura 3-parameter model; (b1) TCS-network of the *An. gambiae* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_3, inset); (b2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. gambiae* sequences generated using Tamura 3-parameter model. Hap, Haplotype; NGL, Ngousso lab strain; HR, Highly resistant; HS, Highly susceptible; Kis, Kisumu lab strain.

Table 2. Summary statistics for full *CYP6M2*-gene polymorphism in permethrin highly susceptible and highly resistant.

Species (Size)	Populations	2n	S	H (Hd)	Syn	NSyn	π	D	D *	pKa/pKs
<i>An. coluzzii</i> (1104 bp)	HR F ₄	18	20	8 (0.915)	11	7	0.0064	0.799	1.497 **	0.46
	HS F ₄	20	27	14 (0.953)	13	10	0.0099	1.715	1.592 **	0.38
	Ngousso	18	17	7 (0.889)	9	7	0.0045	0.059	1.4973 **	0.37
	All	56	32	27 (0.944)	15	13	0.0097	1.238	1.8745 **	0.34
<i>An. gambiae</i> (1528 bp)	HR F ₄	14	36	11 (0.967)	17	14	0.0102	1.621	1.493 **	0.26
	HS F ₄	14	44	6 (0.879)	23	14	0.0122	1.515	1.493 **	0.19
	Kisumu	14	22	6 (0.879)	14	5	0.0064	1.728	1.493 **	0.11
	All	42	51	20 (0.948)	26	23	0.0124	2.124 *	1.929 **	0.24

2n, number of unphased sequences; D, Tajima's statistics; D *, Fu and Li's statistics; H, number of haplotypes; n.a = non-attributed; Hd, haplotype diversity; Syn, Synonymous mutations; NSyn, Non-synonymous mutations; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphic sites; pKa, Synonymous polymorphism per site; pKs, non-Synonymous polymorphism per site; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.02$.

Moreover, the GCC- \rightarrow TCC polymorphism in codon 392-*CYP6M2*, inducing an amino acid change of alanine to serine A392S (Supplementary Table S4 and Figure S5), was observed in *An. gambiae* samples, with a frequency of 71.43% (5/7) in the HR and 57.14% (4/7) in HS but not observed in Kisumu lab strain (0/7) as shown in Supplementary Table S4. Samples carrying the 392A allele were more polymorphic (S = 33, Hd = 0.89 and π = 0.0089; Figure 4(b3)) than 392S allele carriers (S = 25, Hd = 0.88 and π = 0.0059; Figure 4(b3)), suggesting a purifying or balancing selection in mosquitos carrying the A^{392S}

and confirmed by a positive value obtained for the Tajima's D and Fu and Li statistics (Supplementary Table S4).

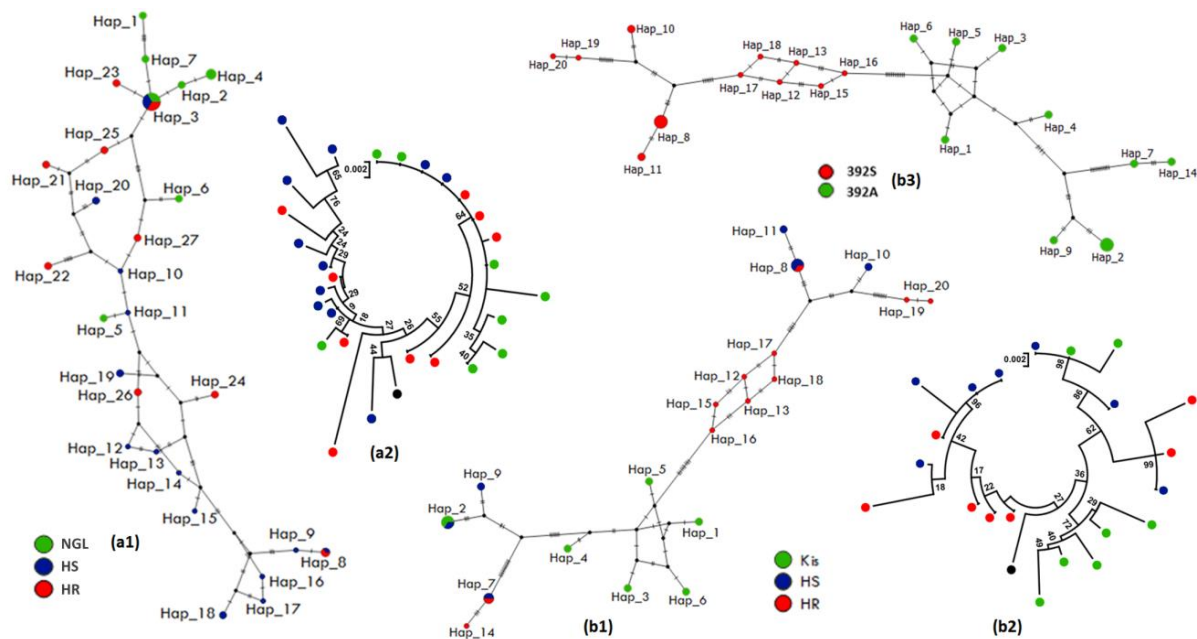


Figure 4. Pattern of the genetic variability and polymorphism of full-gene length of *CYP6M2*. (a1) TCS-network of the *An. coluzzii* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_3, inset); (a2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. coluzzii* sequences generated using Tamura 3-parameter model; (b1) TCS-network of the *An. gambiae* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_7 and Hap_8, inset); (b2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. gambiae* sequences generated using Kimura 2-parameter model; (b3) TCS-network of the A392S-*CYP6M2* mutation per allele in *An. gambiae*. Hap, Haplotype; NGL, Ngousso lab strain; HR, Highly resistant; HS, Highly susceptible; Kis, Kisumu lab strain.

3.5. Genetic Polymorphisms Analysis of *CYP6P4* Associated to Pyrethroid Resistance

3.5.1. Polymorphism Analyses of the Upstream Region of *CYP6P4*

The *CYP6P4* upstream region (the intergenic region between *CYP6P4* and *CYP6P5*) was amplified and sequenced for individual HR and HS mosquitos. As above, *An. gambiae* mosquito samples were used as a model to characterize this intergenic region. After aligning sequences, an indel of 7 bp (GGGGTGC) was consistently observed with a deletion associated with an A/T substitution in all the HR (6/6) and less than 50% in HS, and present in susceptible strain Kisumu. Supplementary Table S5 shows the frequency of this indel across the groups used. Overall, the core elements detected by GPMIner include TATA boxes (5), CCAAT box (3), and 3 GC box (Supplementary Figure S6). The *CYP6P4* upstream also exhibits several transcription factors binding sites in *An. gambiae* (Supplementary Figure S6), including several sites for GATA, MYB or AHR and nrf2/MAF (5 in HR samples and 4 in the other groups). This additional nrf2/MAF site detected in all the HR samples included an A/T substitution at position 273 (Supplementary Table S5).

Regarding the 870-bp of the intergenic region between *CYP6P4* and *CYP6P5*, a comparative analysis was done using 18 sequences (6 HR, 4 HS and 8 Ngousso) and 22 (6 HR, 9 HS and 7 Kisumu), respectively, for *An. coluzzii* and *An. gambiae* (Supplementary Figure S7). In *An. coluzzii*, HR and HS mosquitos revealed a high haplotype diversity of 0.88 and 0.71, respectively (Table 3). The haplotype 2 was predominant (39%) and shared by all groups, while Hap_3 (22%) and Hap_1 (5%) were specific to susceptible Ngousso lab strain; Hap_4 (5%) and Hap_5 (5%) to HS; and the rest to HR (Figure 5(a1,a2), Supplementary Figure S8). In addition, most HR haplotypes are separated from each other and from other haplotypes

by a large number of mutational steps confirming the high genetic diversity observed in their sequences.

Table 3. Summary statistics for polymorphism of *CYP6P4* upstream region in permethrin highly susceptible and highly resistant.

Species (Size)	Population	2n	S	H (Hd)	π	D	D *
<i>An. coluzzii</i> (870 bp)	HR F ₄	12	22	7 (0.879)	0.00935	0.3557	1.509
	HS F ₄	8	20	3 (0.714)	0.01071	1.1576	1.558 **
	Ngousso	16	15	3 (0.630)	0.00822	2.3509 *	1.509 **
	All	36	29	11 (0.803)	0.01015	0.8198	1.749 *
<i>An. gambiae</i> (880 bp)	HR F ₄	12	2	2 (0.489)	0.00112	1.356	1.195
	HS F ₄	18	17	7 (0.856)	0.00952	2.529 **	1.348 **
	Kisumu	14	15	5 (0.703)	0.00754	1.537	1.288 **
	All	44	19	11 (0.838)	0.00828	2.047 *	1.655 **

2n, number of unphased sequences; D, Tajima's statistics; D *, Fu and Li's statistics; H, number of haplotypes; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphic sites; n.a. = non-attributed; Hd, haplotype diversity; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.02$.

In *An. gambiae*, the number of haplotypes for this region was low in HR (2 haplotypes) with a low Hd of 0.485 for 2 polymorphic sites, compared to HS (7 haplotypes) with Hd = 0.85 (Table 3, Supplementary Figure S8) and 17 polymorphic sites, suggesting a possible ongoing directional selection in resistant mosquitos. The haplotype Hap_2 (34%) was shared by all groups with Hap_3 (13%), present only in the susceptible groups (HS and susceptible lab strain Kisumu), while Hap_11 (9%) was only found in the HR groups (Figure 5(b1,b2)). This Hap_2 corresponds to the main haplotype (Hap_2) found in *An. coluzzii*. This reduced diversity in *An. gambiae* HR groups supports the hypothesis of ongoing selection, but it is not confirmed by the positive values of both neutrality tests. In addition, based on the allelic profile at position 273 (Supplementary Table S5), the genetic variability parameters showed that a higher number of haplotypes occurs in 273-A allele carriers ($h = 7$), with an equivalent high haplotype diversity, Hd = 0.84, and nucleotide diversity, $\pi = 0.0096$, while the lowest haplotype diversity and nucleotide diversity ($h = 5$, Hd = 0.58, $\pi = 0.0013$) were found in 273-T allele carriers (Figure 5(b3), Supplementary Table S5).

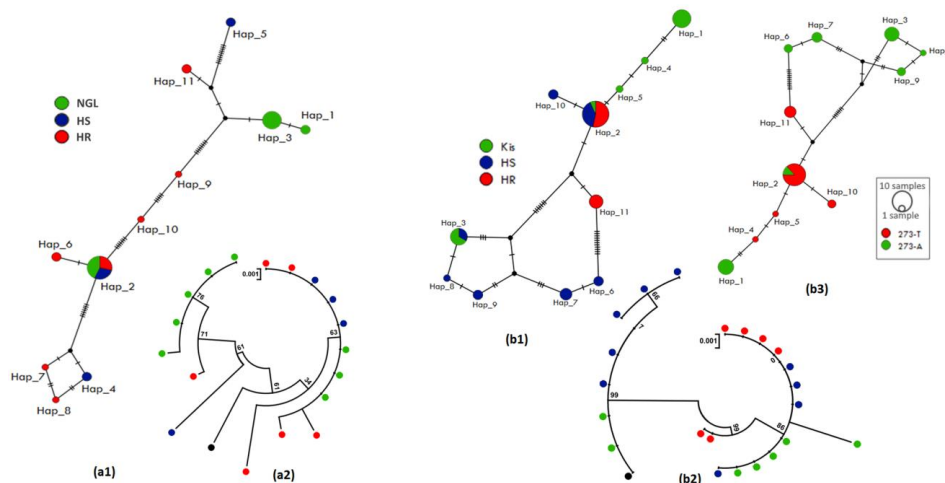


Figure 5. Pattern of the genetic variability and polymorphism of the upstream region of *CYP6P4*. (a1) TCS-network of the *An. coluzzii* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_2, inset); (a2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. coluzzii* sequences generated using Kimura 2-parameter model; (b1) TCS-network of the *An. coluzzii* sequences showing haplotypes and their respective frequencies for *An. gambiae* (Hap_2, inset); (b2) a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. gambiae* sequences generated using Juke-Cantor model. (b3) TCS-network of the upstream region of *CYP6P4* mutation per allele in *An. gambiae*. Hap, Haplotype; NGL, Ngousso lab strain; HR, Highly resistant; HS, Highly susceptible; Kis, Kisumu lab strain.

3.5.2. Polymorphism Analyses of the Full-Gene Region of *CYP6P4*

Analysis of variability of a 1051 bp-fragment of the *CYP6P4*-gene (1521 bp) was done on 58 individual sequences from *An. coluzzii* (9 HR, 10 HS, 10 Ngouso strain) and *An. gambiae* (10 HR, 9 HS, 10 Kisumu lab strain) (Supplementary Figure S7). In *An. coluzzii*, HR mosquitos showed a lower number of haplotypes (8) than the HS individuals (9) (Table 4, Supplementary Figure S9). The haplotype network analysis and phylogenetic tree for this fragment showed that the observed haplotypes are genetically diverse and do not cluster according to resistance phenotype (Figure 6(a1,a2)). However, Hap_2 was predominant (14%) and shared by all sample groups tested, the others being distributed as shown in Figure 6(a1,a2) below. The absence of predominant haplotypes indicates that this gene is not subject to selection pressure in *An. coluzzii* specimens from Yaoundé, Cameroon.

The HR sequences of *An. gambiae* exhibited 11 polymorphic sites with 12 haplotypes (Table 4, Supplementary Figure S9). For the HS and Kisumu lab strain, sequences were most polymorphic with 13 and 16 polymorphic sites, respectively (Supplementary Figure S9). The maximum likelihood phylogenetic tree generated shows a small cluster associated with HR mosquitos (4 out of 10 sequences) (Figure 6(b1,b2)). Hap_24 was predominant (14%) followed by Hap_14 (5.2%) and Hap_19 (3.4%), shared by the HR and HS samples. On the other hand, Hap_4 (5.2%) and Hap_10 (5.2%) were predominant in HS specimens or the Kisumu specimens.

In addition, two synonymous and one non-synonymous mutations were identified (Supplementary Figure S10) in the *An. gambiae* *CYP6P4* gene. The synonymous substitution GCG- > GCA in codon 115 was linked to the mutation of TGC- > AGC in codon 168, which led to an amino acid change of cysteine to serine (C168S) substitution; the two mutations were found with a frequency of 70% in the HR, 28% in HS and 15% in Kisumu (Supplementary Table S6). The carriers of 168C allele show the highest polymorphism with 23 haplotypes ($Hd = 0.97$, $\pi = 0.0005$) in 17 polymorphic sites (Supplementary Table S6) compared to samples carrying the 168S allele where 11 haplotypes ($Hd = 0.86$, $\pi = 0.0003$) (Figure 6(b3) and Supplementary Table S6). The non-synonymous GGC- > GGT at codon 144 was found with a frequency of 95% HR compared to HS and Kisumu of 50% and 20% frequency respectively (Supplementary Table S6).

Table 4. Summary statistics for polymorphism of *CYP6P4*-gene in permethrin highly susceptible and highly resistant.

Species (Size)	Population	2n	S	H (Hd)	Syn	NSyn	π	D	D *	pKa/pKs
<i>An. coluzzii</i> (1037 bp)	HR F ₄	18	21	8 (0.915)	19	2	0.0076	1.114	1.246 **	0.002
	HS F ₄	20	20	9 (0.921)	21	0	0.0078	1.365	1.268	0.000
	Ngouso	20	25	9 (0.922)	19	7	0.0076	0.095	1.246 *	0.078
	All	58	33	25 (0.963)	25	9	0.0084	0.610	1.614 **	0.003
<i>An. gambiae</i> (1051 bp)	HR F ₄	20	11	12 (0.905)	10	1	0.0041	1.324	1.007	0.030
	HS F ₄	18	13	13 (0.967)	11	2	0.0048	1.275	0.667 *	0.055
	Kisumu	20	16	13 (0.947)	13	3	0.0059	1.415	1.007 **	0.070
	All	58	17	33 (0.969)	14	3	0.0062	2.385 *	1.632 **	0.065

2n, number of unphased sequences; D, Tajima's statistics; D *, Fu and Li's statistics; H, number of haplotypes; n.a = non-attributed; Hd, haplotype diversity; Syn, Synonymous mutations; NSyn, Non-synonymous mutations; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphic sites; pKa: Synonymous polymorphism per site; pKs: non-synonymous polymorphism per site; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.02$.

3.6. Distribution of Key Mutations Found in *CYP6M2* and *CYP6P4* Genes among the Populations of *An. gambiae*

The presence of mutations in the upstream and the full-gene length regions of *CYP6M2* and *CYP6P4* were in the HS and HR strains, and direct field-collected samples from Nkolondom (Table 5, Supplementary Figures S11 and S12) were determined. No significant link between any of the mutations was identified, and pyrethroid resistance was detected (Table 5).

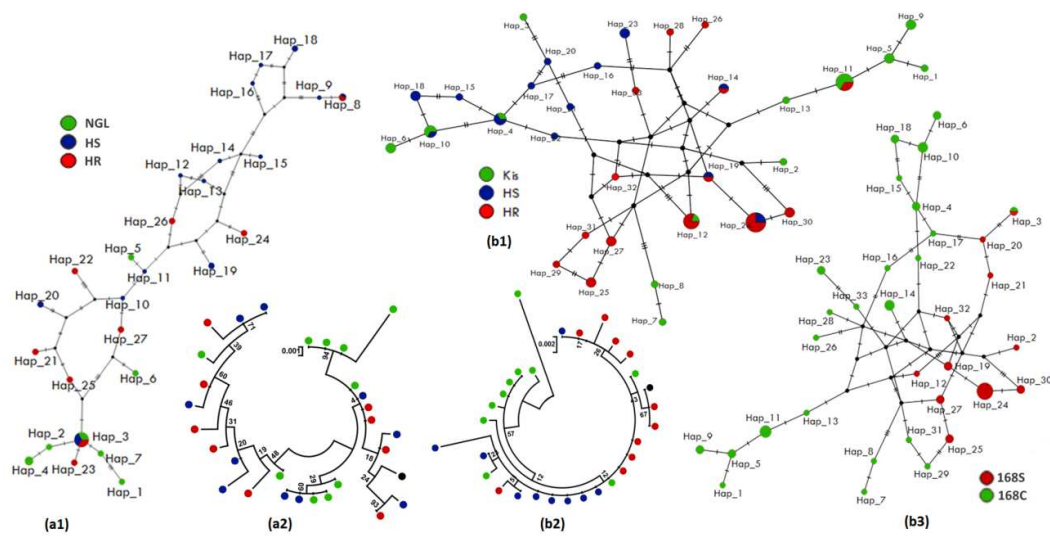


Figure 6. Pattern of the genetic variability and polymorphism of full-gene length of *CYP6P4*. **(a1)** TCS-network of the *An. coluzzii* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_2, inset); **(a2)** a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. coluzzii* generated using Tumura 3-parameter model; **(b1)** TCS-network of the *An. gambiae* sequences showing haplotypes and their respective frequencies (Hap_24, inset); **(b2)** a maximum likelihood phylogenetic tree of *An. gambiae* sequences generated using Tumura 3-parameter model; **(b3)** TCS-network of the C168S-CYP6P4 mutation per allele in *An. gambiae*. Hap, Haplotype; NGL, Ngousso lab strain; HR, Highly resistant; HS, Highly susceptible; Kis, Kisumu lab strain.

Table 5. Frequencies of key mutations found in *CYP6M2* and *CYP6P4* in *An. gambiae*.

Groups	Indel of 8 bp in Upstream of <i>CYP6M2</i>			N	2N	Allele		OR (CI)	p Value
	D/D	D/I	I/I			D	I		
Kisumu	0	3	14	17	34	0.09	0.91	11.40	<0.0001
F ₀	6	8	5	19	38	0.53	0.47	(5.18–25.11)	
HR F ₄	18	21	15	54	108	0.53	0.47	0.73	
HS F ₄	10	32	16	58	116	0.45	0.55	(0.42–1.27)	
Groups	Amino Acid Residue at 392 <i>CYP6M2</i> -Gene			N	2N	Allele		OR (CI)	p Value
	S/S	S/A	A/A			S	A		
Kisumu	0	8	22	30	60	0.13	0.87	0.50	0.23
F ₀	1	6	49	56	112	0.07	0.93	(0.19–1.32)	
HR F ₄	13	23	14	50	100	0.49	0.51	0.59	
HS F ₄	8	21	22	51	102	0.36	0.64	(0.33–1.03)	
Groups	Indel of 7 bp in Upstream of <i>CYP6P4</i>			N	2N	Allele		OR (CI)	p Value
	t/t	t/a	a/a			t	a		
Kisumu	0	6	6	12	24	0.25	0.75	1.46	0.32
F ₀	3	5	11	20	40	0.29	0.71	(0.76–2.80)	
HR F ₄	5	25	16	46	92	0.38	0.62	1.39	
HS F ₄	8	21	11	40	80	0.46	0.54	(0.79–2.44)	
Groups	t/c Mutation at Codon 144 <i>CYP6P4</i> -Gene			N	2N	Allele		OR (CI)	p Value
	t/t	t/c	c/c			t	c		
Kisumu	0	8	16	24	48	0.21	0.79	1.46	0.32
F ₀	3	5	12	20	40	0.28	0.72	(0.76–2.80)	
HR F ₄	25	19	0	44	88	0.78	0.22	0.52	
HS F ₄	16	23	3	42	84	0.65	0.35	(0.28–0.98)	
Groups	Amino Acid Residue at 168 <i>CYP6P4</i> -Gene			N	2N	Allele		OR (CI)	p Value
	C/C	C/S	S/S			C	S		
Kisumu	0	8	12	20	40	0.20	0.80	1.00	1.00
F ₀	0	10	15	25	50	0.20	0.80	(0.50–1.99)	
HR F ₄	3	22	5	30	60	0.47	0.53	1.00	
HS F ₄	6	16	8	30	60	0.47	0.53	(0.57–1.74)	

D, Deletion; I, insertion; S, Serine; A, Alanine; C, Cysteine; S, Serine; t, thymine; a, adenine; c, cytosine; N = total number of samples tested; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

4. Discussion

Insecticide resistance is a major threat to the effectiveness of insecticide-based malaria control tools. Besides the already well-studied target site mutations, metabolic resistance is one of the most important mechanisms. Although the expression of cytochrome P450 genes, such as *CYP6M2* and *CYP6P4*, capable of breaking down the insecticide before it reaches its target is a well-known mechanism of insecticide resistance, the underlying factors modulating the expression of this enzyme family are poorly understood. The present study analyzed the polymorphisms of these two cytochrome-P450s to detect potential mutations that are linked to their overexpression and may be used as resistance markers in two main malaria vectors populations in Yaoundé, Cameroon.

The study shows resistance to permethrin in both species in line with previous reports in different studies in the country [23–25,57,58] and highlighted an escalation of resistance over years in the country with observed resistance to higher insecticide concentrations [32]. Additionally, pre-exposure to PBO reveals a partial recovery of susceptibility to permethrin in both collection sites, indicating an involvement of oxidases, such as cytochromes P450 in the observed resistance. However, the recovery of susceptibility after PBO is moderate (<20%) showing that other mechanisms than P450s are involved, including *kdr*, which were found fixed in *An. gambiae*. The escalation in resistance could be explained by the insecticide selection pressure due to the scale up of control interventions with the distribution of ITNs taking place in Cameroon since 2011 and also by the presence of pesticide residues or components associated with anthropogenic activities (soapy water, organic waste) in the urban breeding sites. Those residues may activate certain detoxication enzymes in mosquitos by oxidative stress, enzymes being also active against insecticides molecules [59,60].

The consistent over-expression of *CYP6M2* and *CYP6P4* genes in field permethrin-resistant *An. gambiae* and *An. coluzzii*, among all the up-regulated genes found in this study, shows their link with resistance patterns in Cameroon. These two genes have been firstly recorded upregulated in Cameroon DDT and pyrethroid resistant *An. gambiae* and *An. coluzzii* mosquitos [22], and more recently, in *An. gambiae* populations from the same peri-urban area [23,24]. Meanwhile, Ibrahim et al. [14] have already established that *CYP6P4* is responsible for resistance to permethrin in *An. arabiensis* populations from Central Africa. Many studies have shown that the up-regulation of certain P450s can be modulated by mutations of cis-regulatory elements in the promoter regions of P450 genes and/or changes in the expression level of transcription factors binding to these cis-regulatory elements [28,61,62]. Knowing that other mechanisms, such as allelic variations of resistance genes, may also be involved, we decided in this study to amplify around 1 kb of the putative promoter and full-gene region of *CYP6M2* and *CYP6P4* in both *An. coluzzii* and *An. gambiae* to detect any variations that might influence their expression in resistant individuals.

Polymorphism analysis of *CYP6M2* sequences in *An. coluzzii* from Ngouso, Yaoundé, revealed that for both the upstream and the full-gene length regions, the HS strain was more polymorphic than the HR, but the predominant haplotype was shared by both HR and HS. In *An. gambiae* the upstream region of *CYP6M2* in HS mosquitos showed a similar polymorphism to that in HR, and this, coupled with the high diversity in HR samples compared to HS, suggests that there is not a strong selective sweep acting upon *CYP6M2* in either species in Yaoundé. The absence of polymorphisms associated with resistance in the coding region or in the 1 kb upstream may indicate that the emergence of *CYP6M2*-associated resistance is due to selection pressures acting on genes encoding distantly related regulatory proteins in *trans* position, as concluded in a similar study comparing *CYP6M2* sequences of *An. gambiae* s.l. sampled from 13 countries [18]. This larger study identified 6 amino acid polymorphisms within *CYP6M2*, none of which were detected in the current study. The mutation A392S was found to be the most frequent in F₄ HR (50%) of *An. gambiae* from Nkolondom crossing and was also detected in field F₀ populations (7%).

A detailed analysis of the polymorphisms in both the upstream and full-gene regions of *CYP6P4* revealed that the HS was more polymorphic than HR samples of *An. gambiae*

populations. The key amino acid change (C168S) observed in *CYP6P4* and substitution mutations in the *nrf2*/MAF TFBs of their upstream region appear to be subject to positive selection in *An. gambiae* populations and could signal a directional selection as seen for *CYP6P9a/b* [45].

In the full-gene region, one major amino-acid change at codon 168 where cysteine (C) is replaced by serine (S) were found in almost all the HR sequences. This amino-acid change was different from what has been seen in Uganda with the I²³⁶M mutation [20], with only the susceptible allele 236I found in all the *An. coluzzii* and *An. gambiae* sequence from Yaoundé, Cameroon. The impact of such allelic variation on the metabolic efficiency of detoxication genes has previously been demonstrated in *An. funestus* for P450s, such as *CYP6P9a/b* [27], and is similar to the case of *CYP6A2* in *Drosophila melanogaster* for which 3 amino acid substitutions located close to the active site in the allele predominant in DDT-resistant flies have been shown to confer the increased metabolism of DDT [62]. Further studies on the variants are needed to determine whether they vary in their ability to detoxify pyrethroids.

5. Conclusions

This study explored the genetic diversity of two cytochrome P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.l. revealing some potentially interesting molecular markers in *CYP6P4* that merit further investigation in the resistance context in Cameroon. No molecular markers associated with resistance were found in *CYP6M2* in either species agreeing with previous studies. Further studies need to be performed to detect the specific genetic variants driving the overexpression of both *CYP6M2* and *CYP6P4* in the central African population of *An. gambiae* s.l., exploring structural variants and both cis- and trans- regulatory loci. Such work will help design robust DNA-based assays to detect and track resistance.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes14010052/s1>, Figure S1: Nucleotide sequence of the 881 bp of the upstream region of *CYP6M2* showing (a) the regulatory sequences identified by GPMiner and (b) the transcription factors binding sites using Aliggen; Figure S2: PCR amplification of the upstream and full-gene region of *CYP6M2*; Figure S3: Polymorphic sites and haplotypes of the *CYP6M2* upstream region in (a) *An. coluzzii* and (b) *An. gambiae* from F4; Figure S4: Polymorphic sites and haplotypes of the full-gene length of *CYP6M2* in (a) *An. coluzzii* and (b) *An. gambiae* from F4; Figure S5: Sequencing of the portion of the full *CYP6M2*-gene length spanning the A392S mutation. (a) Sequence alignment of the full *CYP6M2*-gene length at the A392S point mutation in HR, HS and Kisumu susceptible laboratory strain; (b) amino-acid change of the full *CYP6M2*-gene length at the A392S point mutation according to their phenotype and (c) Chromatogram traces showing the two genotypes at the 392-codon position; Figure S6: Nucleotide sequence of the 868 bp of the upstream region of *CYP6P4* showing (a) the regulatory sequences identified by GPMiner and (b) the transcription factors binding sites using Aliggen; Figure S7: PCR amplification of the putative promoter and full-gene region of *CYP6P4*; Figure S8: Polymorphic sites and haplotypes of the *CYP6P4* upstream region in (a) *An. coluzzii* and (b) *An. gambiae* from F4; Figure S9: Polymorphic sites and haplotypes of the 1051 bp fragment of *CYP6P4* gene in (a) *An. coluzzii* and (b) *An. gambiae* from F4; Figure S10: Sequencing of the portion of the *CYP6P4*-gene length spanning all the mutations found. (a) Sequence alignment of the *CYP6P4*-gene length at point mutation in HR, HS and Kisumu strain; (b) amino-acid change at the C168S point mutation according to their phenotype; Figure S11: Representative diagram of DNA-based assay to genotype a key mutation in *An. gambiae* *CYP6M2*. (a) *CYP6M2* upstream region: alignment of sequences showing differences by resistance phenotype including the deletion of 7 bp found in HR and HS groups link to the G/A variant generating a restriction site for the BsrDI restriction enzyme; a schematic representation of the *CYP6M2* promoter PCR-RFLP illustration digestion of the PCR amplicon and genotyping results for F4 field-resistant from Nkolondom and Susceptible Kisumu crossing. (b) *CYP6M2*-gene region: alignment of sequences showing A392S-mutation differences by resistance phenotype; a schematic representation of the *CYP6M2*-gene AS-PCR illustration digestion of the PCR amplicon and genotyping results for F4 field-resistant from Nkolondom and Susceptible Kisumu crossing; Figure S12: Representative diagram of

DNA-based assay to genotype a key mutation in *An. gambiae* CYP6P4. (a) CYP6P4 upstream region: alignment of sequences showing differences by resistance phenotype linked to the A/T (A-273-T) variant generating a restriction site for the PvuII restriction enzyme; a schematic representation of the CYP6P4 promoter PCR-RFLP illustration digestion of the PCR amplicon and genotyping results for F4 field-resistant from Nkolondom and Susceptible Kisumu crossing. CYP6P4 gene region: (b) alignment of sequences showing the differences in codon 144 (C-432-T) by resistance phenotype; a schematic representation of the CYP6P4-gene RFLP-PCR illustration digestion of the PCR amplicon and genotyping results for F4 field-resistant from Nkolondom and Susceptible Kisumu crossing; (c) alignment of sequences showing C168S-mutation differences by resistance phenotype; a schematic representation of the CYP6P4-gene AS-PCR illustration digestion of the PCR amplicon and genotyping results for F4 field-resistant from Nkolondom and Susceptible Kisumu crossing; Table S1: Primers of the promoter region of CYP6M2 and CYP6P4; Table S2: Specific primers of CYP6M2 and CYP6P4 diagnostic assays; Table S3: Genotype and allele frequencies of 1014F kdr mutations in *An. gambiae* and *An. coluzzii* populations; Table S4: Frequency of key mutations found and genetic variability parameters of CYP6M2 per allele in *An. gambiae*; Table S5: Frequency of key mutations found and genetic variability parameters of the intergenic region between CYP6P4 and CYP6P5 per allele in *An. gambiae*; Table S6: Frequency of key mutations found and genetic variability parameters of the upstream region of mutation per allele in *An. gambiae*.

Author Contributions: Conceptualization, B.T.-F.; methodology, Y.F.-T., M.J.W. and B.T.-F.; software, Y.F.-T. and B.T.-F.; validation, B.T.-F. and C.S.W.; formal analysis, Y.F.-T., L.M.J.M. and B.T.-F.; investigation, Y.F.-T. and B.T.-F.; resources, M.J.W., B.T.-F. and C.S.W.; data curation, Y.F.-T.; writing—original draft preparation, Y.F.-T. and B.T.-F.; writing—review and editing, Y.F.-T., B.T.-F., L.M.J.M., F.N., H.R. and C.S.W.; visualization, B.T.-F.; supervision, B.T.-F., H.R. and C.S.W.; project administration, B.T.-F. and C.S.W.; funding acquisition, B.T.-F. and C.S.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical Research Council, UK, and Global Challenges Research Fund, through the PIIVeC (grant number MR/P027873/1) and the Wellcome Trust through a Senior Research Fellowship awarded to CSW (217188/Z/19/Z). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included within the article and its additional files. The sequences generated have been deposited in the GenBank database (study accession numbers: OP779727-OP779746; OP797835-OP797861; OP797862-OP797886; OP811275-OP811307; OP846110-OP846114; OP846115-OP846119; OP857148-OP857158; OP857159-OP857169).

Acknowledgments: We thank the inhabitants of Ngouosso and Nkolondom communities for their acceptance during the sample collection; Francis Nongley for his assistance in drafting the article, and all members of the PIIVeC consortium.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- 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](#)]
- WHO. *World Malaria Report 2021*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
- Antonio-Nkondjio, C.; Sonhafouo-Chiana, N.; Ngadjeu, C.S.; Doumbe-Belisse, P.; Talipouo, A.; Djamouko-Djonkam, L.; Kopya, E.; Bamou, R.; Awono-Ambene, P.; Wondji, C.S. Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 472. [[CrossRef](#)]
- Djouaka, R.F.; Bakare, A.A.; Coulibaly, O.N.; Akogbeto, M.C.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Strode, C. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 538. [[CrossRef](#)]
- Hemingway, J. The role of vector control in stopping the transmission of malaria: Threats and opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130431. [[CrossRef](#)]
- Ranson, H.; Lissenden, N. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 187–196. [[CrossRef](#)]
- WHO. *World Malaria Report 2019*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
- Zhu, F.; Lavine, L.; O'Neal, S.; Lavine, M.; Foss, C.; Walsh, D. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects* **2016**, *7*, 2. [[CrossRef](#)]

9. Hemingway, J.; Hawkes, N.J.; McCarroll, L.; Ranson, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 653–665. [[CrossRef](#)]
10. WHO. *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors: Executive Summary*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012.
11. Protopopoff, N.; Mosha, J.F.; Lukole, E.; Charlwood, J.D.; Wright, A.; Mwalimu, C.D.; Manjurano, A.; Mosha, F.W.; Kisinza, W.; Kleinschmidt, I. 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.
12. Staedke, S.G.; Gonahasa, S.; Dorsey, G.; Kanya, M.R.; Maiteki-Sebuguzi, C.; Lynd, A.; Katureebe, A.; Kyohere, M.; Mutungi, P.; Kigozi, S.P. Effect of long-lasting insecticidal nets with and without piperonyl butoxide on malaria indicators in Uganda (LLINEUP): A pragmatic, cluster-randomised trial embedded in a national LLIN distribution campaign. *Lancet* **2020**, *395*, 1292–1303. [[CrossRef](#)]
13. Adolfi, A.; Poulton, B.; Anthousi, A.; Macilwee, S.; Ranson, H.; Lycett, G.J. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 25764–25772. [[CrossRef](#)]
14. Ibrahim, S.S.; Riveron, J.M.; Stott, R.; Irving, H.; Wondji, C.S. The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *68*, 23–32. [[CrossRef](#)]
15. Stevenson, B.J.; Bibby, J.; Pignatelli, P.; Muangnoicharoen, S.; O'Neill, P.M.; Lian, L.Y.; Muller, P.; Nikou, D.; Steven, A.; Hemingway, J.; et al. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 492–502. [[CrossRef](#)]
16. Mitchell, S.N.; Stevenson, B.J.; Muller, P.; Wilding, C.S.; Egyir-Yawson, A.; Field, S.G.; Hemingway, J.; Paine, M.J.; 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](#)]
17. 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.; et al. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004236. [[CrossRef](#)]
18. Wagah, M.G.; Korlević, P.; Clarkson, C.; Miles, A.; Lawniczak, M.K.; Makunin, A. Genetic variation at the Cyp6m2 putative insecticide resistance locus in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Malar. J.* **2021**, *20*, 234. [[CrossRef](#)]
19. Witzig, C.; Parry, M.; Morgan, J.C.; Irving, H.; Steven, A.; Cuamba, N.; Keraf-Hinzoumbé, C.; Ranson, H.; Wondji, C.S. Genetic mapping identifies a major locus spanning P450 clusters associated with pyrethroid resistance in kdr-free *Anopheles arabiensis* from Chad. *Heredity* **2013**, *110*, 389–397. [[CrossRef](#)]
20. Njoroge, H.; Van't Hof, A.; Oruni, A.; Pipini, D.; Nagi, S.C.; Lynd, A.; Lucas, E.R.; Tomlinson, S.; Grau-Bove, X.; McDermott, D.; et al. Identification of a rapidly-spreading triple mutant for high-level metabolic insecticide resistance in *Anopheles gambiae* provides a real-time molecular diagnostic for antimalarial intervention deployment. *Mol. Ecol.* **2022**, *31*, 4307–4318. [[CrossRef](#)]
21. Matowo, J.; Weetman, D.; Pignatelli, P.; Wright, A.; Charlwood, J.D.; Kaaya, R.; Shirima, B.; Moshi, O.; Lukole, E.; Mosha, J. Expression of pyrethroid metabolizing P450 enzymes characterizes highly resistant *Anopheles* vector species targeted by successful deployment of PBO-treated bednets in Tanzania. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0249440. [[CrossRef](#)]
22. Tene-Fossog, B.; Poupardin, R.; Costantini, C.; Awono-Ambene, P.; Wondji, C.S.; Ranson, H. Resistance to DDT in an urban setting: Common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the City of Yaoundé, Cameroon. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61408. [[CrossRef](#)]
23. Bamou, R.; Sonhafouo-Chiana, N.; Mavridis, K.; Tchuinkam, T.; Wondji, C.S.; Vontas, J.; Antonio-Nkondjio, C. Status of insecticide resistance and its mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations from forest settings in South-Cameroon. *Genes* **2019**, *10*, 741. [[CrossRef](#)]
24. Piameu, M.; Nwane, P.; Toussile, W.; Mavridis, K.; Wipf, N.C.; Kouadio, P.F.; Mbakop, L.R.; Mandeng, S.; Ekoko, W.E.; Toto, J.C.; et al. Pyrethroid and Etofenprox Resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* from Vegetable Farms in Yaoundé, Cameroon: Dynamics, Intensity and Molecular Basis. *Molecules* **2021**, *26*, 5543. [[CrossRef](#)]
25. Menze, B.D.; Wondji, M.J.; Tchapg, 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](#)]
26. Liu, N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* **2015**, *60*, 537–559. [[CrossRef](#)]
27. Ibrahim, S.S.; Riveron, J.M.; Bibby, J.; Irving, H.; Yunta, C.; Paine, M.J.; Wondji, C.S. Allelic variation of cytochrome P450s drives resistance to bednet insecticides in a major malaria vector. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005618. [[CrossRef](#)]
28. 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*, 4652. [[CrossRef](#)]
29. 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](#)]

30. Yunta, C.; Hemmings, K.; Stevenson, B.; Koekemoer, L.L.; Matambo, T.; Pignatelli, P.; Voice, M.; Nász, S.; Paine, M.J.I. Cross-resistance profiles of malaria mosquito P450s associated with pyrethroid resistance against WHO insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *161*, 61–67. [[CrossRef](#)]
31. Ag1000G Anopheles gambiae Genomes Consortium: Genetic diversity of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nature* **2017**, *552*, 96. [[CrossRef](#)]
32. Tene-Fossog, B.; Fotso-Toguem, Y.G.; Amvongo-Adjia, N.; Ranson, H.; Wondji, C.S.J.M.; Entomology, V. Temporal variation of high-level pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* sl in Yaoundé, Cameroon, is mediated by target-site and metabolic resistance. *Med. Vet. Entomol.* **2022**, *36*, 247–259. [[CrossRef](#)]
33. Kamdem, C.; Tene Fossog, B.; Simard, F.; Etouna, J.; Ndo, C.; Kengne, P.; Bousses, P.; Etoa, F.X.; Awono-Ambene, P.; Fontenille, D.; et al. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39453. [[CrossRef](#)]
34. Service, M. Sampling the larval population. *Mosq. Ecol. Field Sampl. Methods* **1993**, 75–209. [[CrossRef](#)]
35. WHO. *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016; Volume 55.
36. WHO. *Standard Operating Procedure for Determining the Ability of PBO to Restore Susceptibility of Adult Mosquitoes to Pyrethroid Insecticides in WHO Tube Tests*; 9240043853; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
37. Wondji, C.S.; Morgan, J.; Coetzee, M.; Hunt, R.H.; Steen, K.; Black, W.C.t.; Hemingway, J.; Ranson, H. Mapping a quantitative trait locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *BMC Genom.* **2007**, *8*, 34. [[CrossRef](#)]
38. Cattel, J.; Faucon, F.; Le Péron, B.; Sherpa, S.; Monchal, M.; Grillet, L.; Gaude, T.; Laporte, F.; Dusfour, I.; Reynaud, S. Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evol. Appl.* **2020**, *13*, 303–317. [[CrossRef](#)]
39. 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](#)]
40. 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.
41. Gillies, M.T.; De Meillon, B. The anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). *Anophelinae Afr. South Sahara (Ethiop. Zoogeogr. Reg.)* **1968**, *54*, 1–343.
42. Santolamazza, F.; Mancini, E.; Simard, F.; Qi, Y.; Tu, Z.; della Torre, A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar. J.* **2008**, *7*, 163. [[CrossRef](#)]
43. Bass, C.; Nikou, D.; Donnelly, M.J.; Williamson, M.S.; Ranson, H.; Ball, A.; Vontas, J.; Field, L.M. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: A comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar. J.* **2007**, *6*, 111. [[CrossRef](#)]
44. Jones, C.M.; Liyanapathirana, M.; Agossa, F.R.; Weetman, D.; Ranson, H.; Donnelly, M.J.; Wilding, C.S. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6614–6619. [[CrossRef](#)]
45. 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* **2013**, *110*, 252–257. [[CrossRef](#)]
46. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
47. Mavridis, K.; Wipf, N.; Medves, S.; Erquiaga, I.; Muller, P.; Vontas, J. Rapid multiplex gene expression assays for monitoring metabolic resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 9. [[CrossRef](#)]
48. Lee, T.Y.; Chang, W.C.; Hsu, J.B.K.; Chang, T.H.; Shien, D.M. GPMiner: An integrated system for mining combinatorial cis-regulatory elements in mammalian gene group. *BMC Genom.* **2012**, *13* (Suppl. 1), S3. [[CrossRef](#)]
49. Farré, D.; Roset, R.; Huerta, M.; Adsuara, J.E.; Roselló, L.; Albà, M.M.; Messeguer, X. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3651–3653. [[CrossRef](#)]
50. Messeguer, X.; Escudero, R.; Farré, D.; Núñez, O.; Martínez, J.; Albà, M.M. PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 333–334. [[CrossRef](#)]
51. Kel-Margoulis, O.V.; Kel, A.E.; Reuter, I.; Deineko, I.V.; Wingender, E. TRANSCompe1[®]: A database on composite regulatory elements in eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 332–334. [[CrossRef](#)]
52. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
53. Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 3299–3302. [[CrossRef](#)]
54. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]

55. 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](#)]
56. Kwiatkowska, R.; Platt, N.; Poupardin, R.; Irving, H.; Dabire, R.; Mitchell, S.; Jones, C.; Diabate, A.; Ranson, H.; Wondji, C. Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallee du Kou, Burkina Faso. *Genes* **2013**, *519*, 98–106. [[CrossRef](#)]
57. Antonio-Nkondjio, C.; Fossog, B.T.; Ndo, C.; Djantio, B.M.; Togouet, S.Z.; Awono-Ambene, P.; Costantini, C.; Wondji, C.S.; Ranson, H. *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): Influence of urban agriculture and pollution. *Malar. J.* **2011**, *10*, 154. [[CrossRef](#)]
58. Ndo, C.; Kopya, E.; Donbou, M.A.; Njiokou, F.; Awono-Ambene, P.; Wondji, C. Elevated Plasmodium infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 157. [[CrossRef](#)]
59. Subra, R.; Mosha, F. The effect of domestic detergents on the population dynamics of the immature stages of two competitor mosquitoes, *Culex cinereus* Theobald and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) in Kenya. *Acta Trop.* **1984**, *41*, 69–75.
60. Antonio-Nkondjio, C.; Youmsi-Goupeyou, M.; Kopya, E.; Tene-Fossog, B.; Njiokou, F.; Costantini, C.; Awono-Ambene, P. Exposure to disinfectants (soap or hydrogen peroxide) increases tolerance to permethrin in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malar. J.* **2014**, *13*, 296. [[CrossRef](#)]
61. Maitra, S.; Dombrowski, S.M.; Basu, M.; Raustol, O.; Waters, L.C.; Ganguly, R. Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* **2000**, *248*, 147–156. [[CrossRef](#)]
62. Li, X.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, *52*, 231–253. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.