

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTES DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

B.P : 812, Yaoundé, Cameroun

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

P.O. Box: 812 Yaoundé, Cameroon

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496

CENTRE FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES – CRID, Yaoundé

ET

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

Caractérisation des gènes UDP-Glycosyl transférase chez le principal vecteur du paludisme, *Anopheles funestus* et leur potentiel contribution à la résistance aux Pyréthrinoides au Cameroun

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

Option : Biotechnologie de la Santé Publique

Présenté par :

MBAKAM LEUZE Patrick Bertrand

Licencié ès-sciences

Matricule : 04U081



Superviseur :

MBACHAM Wilfred

Professeur

Université de Yaoundé 1,

Cameroun

Superviseur :

WONDJI Charles

Professeur

Liverpool School of Tropical Medicine,

Angleterre

Academic year 2021/2022

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

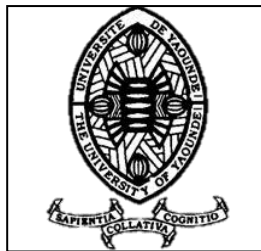
FACULTES DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

B.P : 812, Yaoundé, Cameroun

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

P.O. Box: 812 Yaoundé, Cameroon

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496

CENTRE FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES – CRID, Yaoundé

ET

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

Caractérisation des gènes UDP-Glycosyl transférase chez le principal vecteur du paludisme, Anopheles funestus et leur potentiel contribution à la résistance aux Pyréthrinoïdes au Cameroun

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

Option : Biotechnologie de la Santé Publique

Présenté par :

MBAKAM LEUZE Patrick Bertrand

Licencié ès-sciences

Matricule : 04U081

Superviseur :

MBACHAM Wilfred

Professeur

Université de Yaoundé 1,

Cameroun

Superviseur :

WONDJI Charles

Professeur

Liverpool School of Tropical Medicine,

Angleterre

Academic year 2021/2022

DEDICACE

A ma Maman, mes Frères et Sœurs.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué conjointement entre le "*Center for Research in Infectious Diseases*" (CRID) de Yaoundé et l'université de Yaoundé I. Il a bénéficié de l'appui financier de la *Wellcome Trust Senoir Fellowship* attribué au Professeur Charles Wondji.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ces travaux et qui se sont dévoués à sa réussite. Je pense particulièrement à/au :

- **Pr Charles S. WONDJI**, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire de recherche avec la plus grande bienveillance, et pour m'avoir permis d'effectuer mon initiation à la recherche dans le domaine de la biologie moléculaire. Je suis heureux d'avoir pu effectuer ce travail à ses côtés, et d'avoir bénéficié de ses potentialités scientifiques ainsi que de son encadrement ;
- **Pr Wilfred MBACHAM**, qui, malgré ses différentes occupations a accepté de co-diriger ce travail. Pour les conseils, l'encadrement, les orientations sa disponibilité apportés tout au long de ce travail, mais aussi pour sa patience et ses encouragements ;
- Au **Chef du Département** de Biochimie et à tous **les enseignants** de l'Université de Yaoundé I pour tous les enseignements reçus.
- Aux Docteurs Léon, Benjamin et Magellan du laboratoire (CRID), pour le suivi et les conseils apportés tout au long de ce travail ;
- L'équipe technique du laboratoire (CRID), et particulièrement au chef de laboratoire, pour sa formation, sa patience et sa confiance apportées ;
- Mes aînés de laboratoire Mi-carême, Williams (CRID), pour l'accompagnement et le soutien ;
- Mes amis et camarades de promotion.
- Ma Maman, Charlotte MBAKAM née TCHUENGNO Charlotte pour tout le soutien, l'assistance, l'amour et l'accompagnement qu'elle m'a procuré pendant les travaux et la rédaction de ce mémoire et mes études ;
- Ma sœur et mes frères pour tout le soutien, l'amour, les conseils, que vous m'avez donné et même le soutien financier tout au long de ce travail et mes études ;
- Ma famille, mes ami(e)s et à tous ceux de près ou de loin qui ont apporté leur soutien pendant mes études et la réalisation de ce projet.

TABLE DE MATIERE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DE MATIERE	iii
LISTE DES TABLEAUX	viii
RÉSUMÉ	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	1
I.1. Le Paludisme	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Le parasite : <i>Plasmodium</i>	3
I.1.3. Les vecteurs de paludisme : <i>Anopheles</i>	4
I.1.4. Biologie du parasite chez le vecteur et chez l’homme	7
I.1.5. Méthodes de lutte antivectorielle.....	8
I.1.5.1. Lutte contre les larves d’ <i>Anopheles</i>	9
I.1.5.2. Lutte contre les Adultes d’ <i>Anopheles</i>	9
I.1.5.3. Réduction du contact homme/vecteur	10
I.2. Différents types d’insecticides utilisés contre les insectes et leur mode d’action.....	10
I.2.1. Pyréthriinoïdes.....	11
I.2.2. Organochlorés (DDT).....	11
I.2.3. Organophosphorés	11
I.2.4. Carbamates	12
I.2.5. Pyrroles	12
I.2.6. Néonicotinoïdes	12
I.3. Mécanismes de résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides	13
I.3.1. Résistance comportementale	13
I.3.2. Résistance cuticulaire	14
I.3.3. Résistance par modification de la cible de l’insecticide.....	14
I.4.4. La résistance métabolique	16
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	3
II.1. Description du site d’étude et collecte des échantillons.....	20

II.1.1. Description du site d'étude.....	20
II.1.2. Collecte des échantillons et Identification morphologique	21
II.2. Evaluation du profil de sensibilité des moustiques du genre <i>An. funestus</i> aux Pyréthroïdes	23
II.3. Extraction des biomolécules.....	24
II.3.1. Extraction de l'ADN	24
II.3.2. Extraction de l'ARN.....	24
II.3.3. Synthèse de l'ADNc.....	26
II.4. Identification moléculaire des moustiques du genre <i>An. funestus</i>	26
II.5. Evaluation du niveau d'expression des gènes candidats de résistance métabolique par (RT-qPCR).....	27
II.6. Analyse de la diversité génétique et recherche des potentiels marqueurs de résistance <i>UGT Afun004354</i> aux Pyrétroïdes chez <i>An. funestus</i> s.s.....	29
II.6.1. Amplification et purification du gène <i>UGT Afun004354</i>	29
II.6.1.1. Amplification du gène <i>UGT Afun004354</i>	29
II.6.1.2. Purification du gène <i>UGT Afun004354</i> par gel extraction (QIAGEN).....	30
II.6.2. Clonage du gène <i>UGT Afun004354</i>	31
II.6.2.1. Préparation des cellules chimio-compétentes	31
II.6.2.2. Ligation de l'insert dans le vecteur <i>PJET 1.2</i>	31
II.6.2.3. Transformation dans la cellule bactérienne (<i>E. Coli</i>).....	32
II.6.3. Selection des colonies positives	32
II.6.4. Purification des clones par Miniprep et Sequencage	33
II.6.4.1. Purification des clones par Miniprep (QIAGEN KIT).....	33
II.6.3.2. Sequencage.....	34
II.6.5. Analyse de la diversité génétique.....	34
II.6.6. Recherche des potentiels marqueurs de résistance de <i>UGT AFUN004354</i>	35
II.7. Exploitation et analyses des données	35
II.7.1. Test de sensibilité aux Pyrétroïdes	35
II.7.2. Analyse comparative du niveau d'expression des gènes <i>UGT Afun004354</i> et <i>Afun011266</i> chez <i>An.funestus</i>	35

II.7.3. Etude de la diversité génétique du gène <i>UGT Afun004354</i> chez les moustiques du genre <i>An. funestus</i>	36
II.7.3.1. Analyse des paramètres de la variabilité génétique.	36
II.7.3.2. Analyse de la distribution phylogénétique et haplotypique	36
II.7.4. Analyse du polymorphisme de <i>UGT Afun004354</i> chez <i>An. funestus s.s</i>	36
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	20
III.1. RESULTATS	37
III.1.1. Profil de sensibilité aux pyréthrinoïdes chez <i>An. funestus s.s</i> à Mibellon	37
III.1.2. Identification moléculaire des espèces chez <i>An. funestus</i> à Mibellon	37
III.1.3. Niveau d'expression des <i>UGTs AFUN011266</i> et <i>AFUN004354</i>	38
III.1.4. Diversité génétique d' <i>UGT AFUN004354</i> et potentiels marqueurs de résistance aux Pyréthrinoïdes chez <i>An. funestus s.s</i>	39
III.1.4.1. Amplification de <i>UGT Afun004354</i> chez <i>An. funestus s.s</i>	39
III.1.4.2. Sélection des plasmides possédant les <i>UGT AFUN004354</i>	40
III.1.4.3. Diversité génétique du gène <i>UGT Afun004354</i>	41
III.1.4.4. Potentiels marqueurs de la résistance aux pyréthrinoïdes.....	44
III.2. DISCUSSION	46
CONCLUSION PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....	49
REFERENCES.....	50
ANNEXES	59

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE 1 :	Acétyl cholinestérase 1
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique Complémentaire
AMP :	Ampiciline
An.:	<i>Anopheles</i>
ARN :	Acide ribonucléique
BAC :	"Bacterial Artificial Chromosome"
COEs :	Co-enzymes
CRID :	"Centre for Research in Infectious Diseases"
DEM :	Diéthyl maléate
dNTP :	di-nucléotides tri-phosphate
<i>E. coli</i> :	"Escherichia coli"
GABA :	Acide Gamma-aminobutyrique
GSTs :	Glutathions S-Transférases
ITS :	Internal Transcribed Spacer (Espace transcrit interne)
IGS :	Intergenic Spacer (Espace inter génique)
LB :	Luria-Bertani
MII :	Moustiquaire imprégnée d'insecticide
MILDA :	Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P</i> :	<i>Plasmodium</i>
PBO :	Pypéronyl butoxide
PCR :	"Polymerase chain reaction" (Réaction en chaine par polymérase)
PID :	Pulvérisation intra-domiciliaire
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
RCF :	force de centrifuge relative
RNase :	Ribonucléase
s.l. :	" <i>sensu lato</i> " (sens large)
s.s. :	" <i>sensu stricto</i> " (sens stricte)
TAE :	Tris Acetate d'éthylènediaminetétraacétique
TBE :	Tris Borate d'éthylènediaminetétraacétique
UDP :	Uridine 5'-diphosphate
UGT :	UDP Glycosyl Transférase
WHO :	World Health Organization.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pays avec des cas indigènes de Paludisme en 2000 et leur statut en 2019.....	3
Figure 2 : Carte de la distribution des espèces majeures d’anophèles dans le monde.....	5
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> (Ookyste = Oocyste, Oocinète = Ookinète) (Source : Pascal Combemorel, « Planete Vie » publié le 02.2019.)	8
Figure 4 : Schémas illustrant les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides.	13
Figure 5 : Le site de collecte d’ <i>An. funestus</i> à Mibellon (Bankim)	21
Figure 6 : Dispositif de collecte des moustiques adultes et collecte intradomiciliaire.	22
Figure 7 : Les différentes étapes dans la réalisation du test de sensibilité de l’OMS pour la concentration discriminante et celles correspondant à 5 et 10 fois cette concentration (WHO, 2016)	23
Figure 8 : Photographie d’une machine Agilent Technologies, Mx3005P.....	29
Figure 9 : Profil de sensibilité des pyréthriinoïdes chez <i>Anophèles funestus</i> s.s. de Mibellon.	37
Figure 10 : Electrophorégramme montrant l’identification moléculaire chez <i>An. funestus</i>	38
Figure 11 : Résultats de la PCR quantitative montrant les gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux pyréthriinoïdes.....	39
Figure 12 : Electrophorégramme d’amplification représentant la présence du gène Afun004354	40
Figure 13 : Electrophorégramme montrant les produits d’amplification du gène d’intérêt après clonage.....	40
Figure 14 : Arbre phylogénétique des haplotypes d’ <i>An. funestus</i> s.s. construit à l’aide de la méthode du maximum de vraisemblance.....	43
Figure 15 : Réseau d’haplotypes du gène Afun004354 chez <i>An. funestus</i> s.s. à Mibellon.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres génétiques de l'UDP Glycosyl transférase dans les populations étudiées	42
Tableau 2 : Changement des Acides aminés observé dans le gène <i>Afun004354</i>	45

RÉSUMÉ

La prévention du paludisme repose en grande partie sur la lutte contre les vecteurs. Cependant, la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme menace le contrôle et l'élimination de cette maladie dans de nombreux pays endémiques, dont le Cameroun. Cette résistance est médiée par plusieurs familles d'enzymes chez certaines espèces, toutefois la classe des UDP-Glycosyl transférases reste peu étudiée. Le but de cette étude était de déterminer le profil de résistance aux pyréthrinoïdes et d'évaluer l'implication possible des UDP-Glycosyl transférases dans cette résistance chez *Anopheles funestus* s.l. Après identification morphologique et moléculaire des adultes (F0) collectés à Mibellon et élevés à l'insectarium, des tests de sensibilité aux insecticides ont été réalisés sur les moustiques adultes F1 selon le protocole de l'OMS. A la fin des tests, les survivants de l'exposition à la Deltaméthrine et à la Perméthrine ont été analysés pour détecter les mécanismes de résistance à ces insecticides. Le niveau d'expression des gènes candidats de l'UDP-Glycosyl transférases identifiées par RNASeq 2018 pouvant être impliqués dans la résistance aux insecticides a été évalué par PCR quantitative (RT-qPCR). Enfin, la recherche des mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes a été réalisée par amplification, clonage, séquençage et étude du polymorphisme du gène *AFUN004354*. Les résultats des tests de sensibilité ont révélé que cette population était résistante, avec les taux de mortalité sur 24 heures suivants : Deltaméthrine 0,05% : $19,44 \pm 2,78$ %, Deltaméthrine 0,25 % : $53,68 \pm 8,22$ %, Deltaméthrine 0,5 % : $89,75 \pm 2,25$ %, et Perméthrine 0,75 % : $20,47 \pm 6,86$ %, Perméthrine 3,75 % : $68,34 \pm 2,62$ %, Perméthrine 7,5 % : $83,41 \pm 4,25$ %. Le gène *Afun004354* a été plus surexprimé chez Fumoz avec $23,21 \pm 0,65$ de taux d'expression que chez les souches de terrain : Control avec $4,83 \pm 0,93$, Deltaméthrine 1X vivant avec $5,79 \pm 4,87$ et Perméthrine 1X vivant avec $10,39 \pm 0,26$ de taux d'expression et l'étude du polymorphisme de ce dernier a montré une grande diversité génétique entre les souches de laboratoire et les souches de terrain. Cependant, les valeurs non significatives de Tajima et Fu et Li (D et D*) obtenues suggèrent que les changements observés dans ce gène peuvent être dus au hasard et que le rapport Ka/Ks avec des valeurs inférieures à 1 reflète une sélection purificatrice ou stabilisatrice (agissant contre les changements). Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider cette surexpression induite du gène *Afun004354* chez cette espèce.

Mots-clés : résistance métabolique, UDP-Glycosyl Transférase (*Afun004354*), Deltaméthrine, Perméthrine, *Anopheles funestus*, Paludisme.

ABSTRACT

Malaria prevention relies heavily on vector control. However, insecticide resistance in malaria vectors threatens the control and elimination of this disease in many endemic countries including Cameroon. This resistance is mediated by several families of enzymes in some species, while the UDP-Glycosyltransferase class remains poorly studied. The aim of this study was to evaluate the resistance profile to pyrethroids and determine the possible involvement of UDP-Glycosyltransferases in the resistance of the latter in *Anopheles funestus s.l.* After morphological and molecular identification of adults (F0) collected at Mibellon and raised at the insectarium, insecticide susceptibility tests were performed on F1 adult mosquitoes following the WHO protocol. At the end of these tests, the survivors of exposure to Deltamethrin and Permethrin were analysed for resistance mechanisms to these insecticides. The expression level of candidate UDP-Glycosyl transferase genes identified by RNASeq 2018 that may be involved in insecticide resistance was assessed using quantitative PCR (RT-qPCR). Finally, the search for pyrethroid resistance mechanisms was carried out by amplification, cloning, sequencing and study of the polymorphism of the gene *AFUN004354*. The results of the susceptibility tests revealed that this population was resistant, with the following 24-hour mortality rates; Deltamethrin 0.05%: 19.44 ± 2.78 %, Deltamethrin 0.25%: 53.68 ± 8.22 %, Deltamethrin 0.5%: 89.75 ± 2.25 %, and Permethrin 0.75%: 20.47 ± 6.86 %, Permethrin 3.75%: 68.34 ± 2.62 %, Permethrin 7.5%: 83.41 ± 4.25 %. The *Afun004354* gene was more overexpressed in Fumoz with 23.21 ± 0.65 expression levels than in the field strains: Control with 4.83 ± 0.93 , Deltamethrin 1X alive with 5.79 ± 4.87 and Permethrin 1X alive with 10.39 ± 0.26 expression levels and the study of the polymorphism of the latter showed great genetic diversity between the laboratory strains and the field strains. However, the non-significant Tajima and Fu and Li (D and D*) values obtained suggest that the changes observed in this gene may be due to chance and that the Ka/Ks ratio with values below 1 reflects purifying or stabilising selection (acting against changes). Further studies are needed to elucidate this induced overexpression of the *Afun004354* gene in this species.

Keywords: metabolic resistance, UDP-Glycosyl Transferase (*Afun 004354*), Deltamethrin, Permethrin, *Anopheles funestus*, Malaria.

	INTRODUCTION	
--	---------------------	--

Le paludisme demeure la plus importante maladie à transmission vectorielle malgré tous les efforts de lutte mis en place (WHO 2017). Au niveau mondial le nombre de cas du paludisme est estimé à 241 millions en 2020, soit une hausse par rapport aux 227 millions de 2019 et aux 224 millions de 2015, cette augmentation de 2020 est dû à la perturbation des services sanitaires durant la pandémie COVID-19.(WHO, 2021). La région Afrique de l’OMS enregistre le plus de cas à l’échelle mondiale et représente à elle seule environ 95 % (228 millions) des cas estimés en 2020. Au Cameroun, plus de 2 millions 600 mille cas de paludisme et 4510 décès y ont été enregistrés en 2019. L’Adamaoua étant la 2^{ème} région présentant le plus grand nombre de cas (14.09%) et la 3^{ème} région présentant le plus grand nombre de décès (35,7/100.000 habitants) (PNLP 2020).

La lutte contre cette affection repose principalement sur la lutte anti-vectorielle, qui est le moyen de prévention de masse contre cette parasitose (Townson et al. 2005; WHO 2009). Celle-ci repose principalement sur l’utilisation d’insecticides à travers des Pulvérisations intradomiciliaires (PID), et l’utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d’action (MILDA). Cependant, l’efficacité de ces outils de lutte est menacée par l’émergence et la croissance du phénomène de résistance chez les vecteurs de paludisme à la plupart des insecticides utilisés en santé publics tels que les pyréthrinoïdes (principale classe d’insecticide utilisée pour l’imprégnation des moustiquaires), contribuant ainsi à l’augmentation croissante du taux d’incidence du paludisme WHO, 2020). Cette résistance aux insecticides a été reportée chez les vecteurs majeurs *An. gambiae s.l* et *An. funestus s.l* dans plusieurs pays d’Afrique, parmi lesquels : l’Afrique du Sud (Brooke et al. 2001; Hargreaves et al. 2000), le Mozambique (Cuamba et al. 2010; S. Casimiro et al. 2006), le Kenya (Mulamba et al. 2014), le Cameroun (Antonio-Nkondjio et al. 2015; Menze et al. 2018a; 2016) et le Malawi (Wondji et al. 2012). De nombreux études ont eu à reporter plusieurs mécanismes de résistances aux insecticides chez les vecteurs du paludisme parmi lesquels la résistance métabolique. Celle-ci se traduit par la détoxification naturelle des insecticides par des enzymes (Low et al. 2013; Riveron et al. 2013)

Chez les moustiques du genre *An. funestus s.s*, le principal mécanisme de résistance aux insecticides qui a été identifié est la résistance métabolique. Les différentes enzymes dont l’implication est connue dans cette forme de résistance sont : Cytochrome P450 (Djouaka et al. 2008; Mugenzi et al. 2019; Riveron et al. 2013), Carboxylestérases (Xianchun Li, Schuler, and Berenbaum 2007; Montella, Schama, and Valle 2012), Glutathions S-transférases (Hemingway et

al. 2004; Riveron, Yunta, et al. 2014). Malgré la multitude d'enzymes qui intervient dans le processus de détoxification aux insecticides, très peu d'études sont menées sur les autres enzymes de détoxification à l'instar des UDP-Glycosyl transférases. Or certaines études ont décrit l'implication de la famille des UDP-Glycosyl transférases dans la résistance métabolique chez la mouche domestique du genre *Musca domestica* (J.-Y. Lee et al. 2006) et chez les moustiques du genre *An. sinensis* (Zhou et al. 2019). Par ailleurs, les travaux menés par Kouamo et collaborateurs (Kouamo et al. 2021) et Wondji et collaborateurs (Wondji et al. 2022) ont aussi mis en évidence la surexpression de cette enzyme chez les moustiques du genre *An. gambiae* et *An. funestus* après exposition aux insecticides.

Les évidences rapportées par les études ci citées laissent penser que :

Les UDP-Glycosyl transférases sont impliqués dans la résistance métabolique aux Pyréthrinoïdes.

L'objectif de la présente étude était de déterminer l'implication des UDP-Glycosyl transférase dans la résistance aux Pyréthrinoïdes chez les moustiques du genre *An. funestus*, vecteurs du paludisme en Afrique. Plus spécifiquement il s'est agi de :

1. Déterminer le profil de sensibilité des moustiques aux pyréthrinoïdes à Mibellon, Cameroun ;
2. Evaluer le niveau d'expression des UDP-Glycosyl transférase chez les moustiques du genre *An. funestus* ;
3. Analyser la diversité génétique des UDP-Glycosyl transférase et rechercher les potentiels marqueurs de résistance des UDP-Glycosyl transférase aux Pyréthrinoïdes chez les moustiques du genre *An. funestus*.

	CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	
--	---	--

I.1. Le Paludisme

I.1.1. Définition

Le Paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire parasite du genre *Plasmodium* et transmis à l'homme par la piqure d'un anophèle femelle infecté.

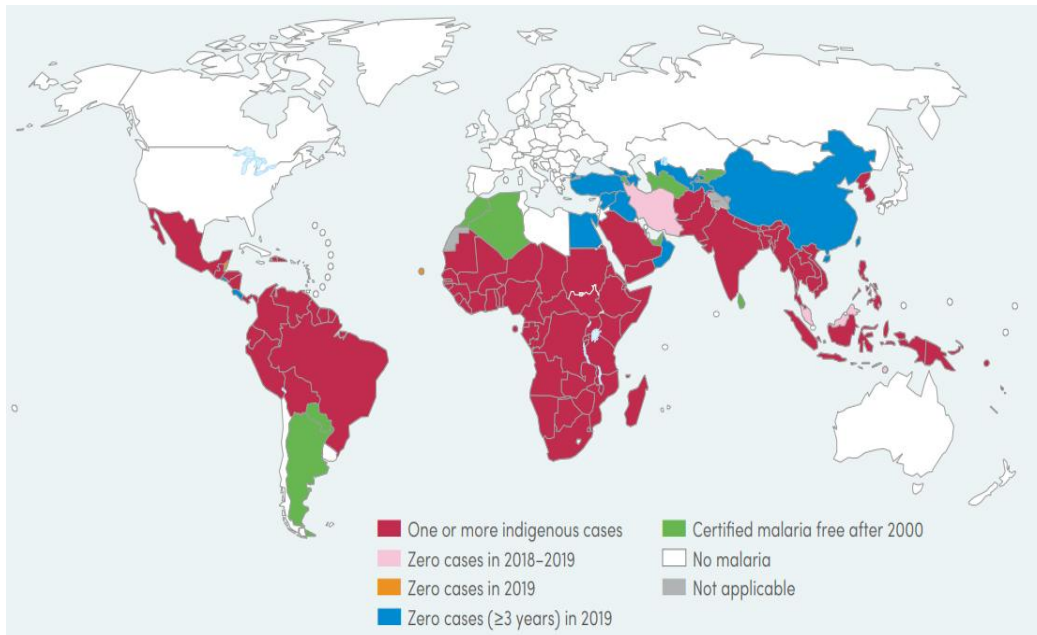


Figure 1 : Pays avec des cas indigènes de Paludisme en 2000 et leur statut en 2019.

(Source : Base de données de l'OMS 2021.)

I.1.2. Le parasite : *Plasmodium*

Les agents pathogènes responsables du paludisme sont des protozoaires intracellulaires du genre *Plasmodium* découverts en 1880 par Laveran (Mouchet et al. 2004); Ces parasites peuvent être transmissibles lors des transfusions sanguines ou par voie congénitale (Pierre Aubry and Bernard-Alex Gaüzère 2019). De nos jours, cinq espèces distinctes appartenant au genre *Plasmodium* sont à l'origine du paludisme chez l'homme (Bronner et al. 2009) :

- *Plasmodium. falciparum* (découvert par Welch en 1897) classé à part avec *P. reichenowi* dans le sous-genre *Laverania*, est responsable de près de 60% des accès palustres (Hay et al. 2009). Présent dans les régions équatoriales et subtropicales, c'est le parasite du paludisme le plus prévalent en Afrique subsaharienne, et à l'origine de 99 % des cas de paludisme estimés en 2016 (WHO 2017). En cas de complications, le parasite peut passer dans le système nerveux central ;

on parle alors de neuro-paludisme (Mouchet et al. 2004). *P. falciparum* à une durée d'incubation de 7 à 15 jours et une longévité inférieure à un an.

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

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

- *Plasmodium ovale* (découvert par Stephens en 1922) a une localisation essentiellement africaine. Longtemps confondue à la précédente, il a été décrit comme remplaçant *P. vivax* chez les sujets Duffy négatifs (Molineaux et al. 1980). Avec une longévité de 15 jours, on note les rechutes pouvant durer 5 ans, dues à la présence d'hypnozoïtes hépatites (Mouchet et al. 2004; Mouchet and Carnevale 1991).

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

Le cycle de développement du *Plasmodium* comprend deux phases : une phase de développement asexuée chez l'homme et une phase sexuée chez le moustique (*Anopheles*).

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

Les *Anopheles* sont les seuls vecteurs du paludisme humain dans le monde (Rhodain and Perez 1985). La Figure 2 montre la répartition mondiale des espèces majeures de ces dernières.

En 1818, elles ont été établies comme un genre de moustique par l'entomologiste Allemand Johann Wilhelm Meigen.

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

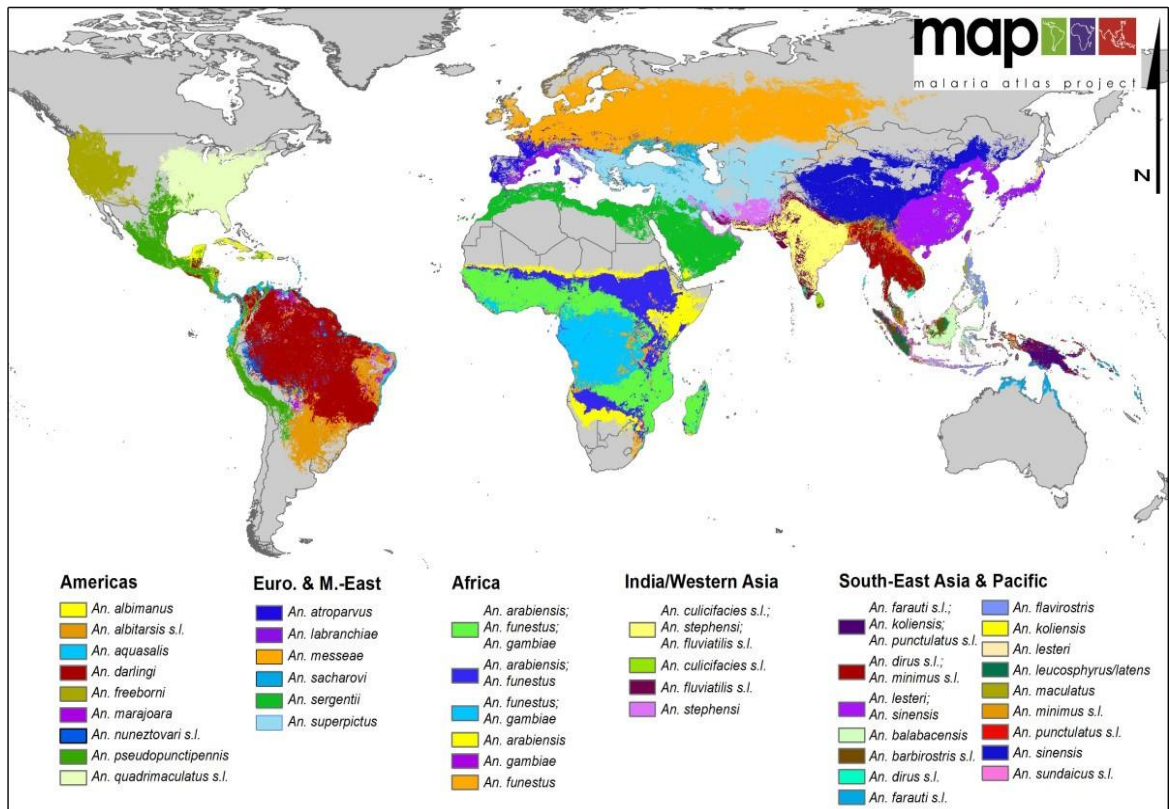


Figure 2 : Carte de la distribution des espèces majeures d'anophèles dans le monde.

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

- **Le complexe *Anophèles gambiae***

Le complexe *Anopheles gambiae* est généralement considéré comme étant le complexe le plus étudié dans le monde entier. En tout, ce complexe comprend les 9 espèces suivantes : *Anopheles Coluzzii*, *Anopheles gambiae s.s* ; *Anopheles aranbiensis* ; *Anopheles Amharicus*

(Maureen Coetzee et al. 2013) ; *Anopheles merus* ; *Anopheles quadriannulatus* ; *Anopheles comorensis* ; *Anopheles melas* et *Anopheles bwambiae*.(Barrón et al. 2019; Loughlin 2020), donc trois sont majeurs : *An. gambiae s.s.*; *An. coluzzii* et *An. arabiensis* (Antonio-nkondjio et al. 2006; Barrón et al. 2019). Ces espèces sont différenciables les unes des autres uniquement sur le plan génétique. *An. gambiae* s.l. était précédemment subdivisé en deux formes moléculaires distinctes à savoir M et S, basé sur une variation nucléotidique au niveau de la séquence IGS (Intergenic Spacer) de l'ADN ribosomal (Torre et al. 2001). Toutefois, cette espèce a récemment été subdivisée en deux espèces à part entière nommée *An. gambiae s.s* (anciennement forme S) et *An. coluzzii* (précédemment forme M) (Maureen Coetzee et al. 2013). *An. gambiae*.et *An. coluzzii* sont considérées comme étant majoritaires dans la propagation du paludisme car elles possèdent une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain (figure 2).

- **Le groupe *Anopheles funestus***

Le groupe *Anopheles funestus* est le second vecteur majeur du paludisme au Cameroun. Ce groupe est composé d'au moins 11 espèces africaines très proches, raison pour laquelle il serait difficile de les différencier uniquement sur le point de vue de critères morphologiques présents sur les larves ou sur les adultes. Il est composé des espèces suivantes : *Anopheles funestus s.s.*, *Anopheles parensis*, *Anopheles aruni*, *Anopheles rivulorum*, *Anopheles rivulorum-like*, *Anopheles vaneedeni*, *Anopheles brucei*, *Anopheles confusus*, *Anopheles funestuslike*, *Anopheles fucivenosus*, *Anopheles lesoni*, *Anopheles longipalpis* et *Anopheles fluviatilis*.(Cohuet et al. 2004; Koekemoer et al. 2002; Mouatcho et al. 2018; Spillings et al. 2009) Une étude approfondie du polymorphisme génétique interspécifique de la région ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) de l'ADN ribosomal a été menée dans le but de les différencier (Cohuet et al. 2004; Koekemoer et al. 2002; Spillings et al. 2009). *An. funestus* possède une très large distribution géographique couvrant toute la région afro-tropicale (Mouchet et al. 2004). Les larves d'*An. funestus* ont la capacité de se développer uniquement dans les étendus d'eau claire, très larges et permanentes ou semi-permanentes, dont la végétation est émergente en hauteur de quelques dizaines de centimètres ce qui est suffisante pour faire de l'ombre à la surface de l'eau (Evans, 1938). Des études antérieures ont suggéré une possible résistance croisée entre les carbamates et les pyréthrinoïdes dans les populations d'*An. funestus* (Brooke et al. 2001; Wondji et al. 2009). Une telle résistance croisée pourrait avoir un impact dévastateur sur les programmes de lutte contre le paludisme et limiter les options disponibles pour la gestion de la résistance.

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

Le cycle du paludisme est à deux hôtes : un hôte intermédiaire, homme où se déroule la phase asexuée et un hôte définitif, l'*Anophèle* où se déroule la phase sexuée. Chez l'homme, le *Plasmodium* vit à l'intérieur des hématies, se nourrissant d'hémoglobine (Figure 3). Une fois que la femelle de moustique pique un individu infecté, elle aspire avec le sang de nombreux *Plasmodium* sous forme de gamétocytes. Ces gamétocytes (mâles et femelles) entameront un processus de reproduction sexuée dans l'estomac du moustique, qui aboutira à la formation des sporozoïtes ; ceux-ci resteront logés dans les glandes salivaires pendant toute la durée de vie de l'anophèle et seront injectés à l'homme lors des prochains repas sanguin.

Une fois inoculé à l'homme, les sporozoïtes pénètrent activement dans un capillaire sanguin et atteignent le foie où ils subissent leur développement et leur multiplication, dans un processus connu sous le nom de schizogonie pré-érythrocytaire. Dans le foie, les sporozoïtes se répliquent et deviennent des schizontes tissulaires qui contenant des milliers de mérozoïtes. Cette schizogonie exo-érythrocytaire est caractéristique de chaque espèce et prend un temps de maturation minimum de 6 jours chez *P. falciparum* et maximum de 16 jours chez *P. malariae*. Le schizonte mature se rompt (en même temps que les hépatocytes infectés) libérant les mérozoïtes qui, une fois dans le sang, envahissent activement les érythrocytes. Dans les érythrocytes, les trophozoïtes mûrissent au cours des 24 à 72 heures, un phénomène qui dépend de l'espèce plasmodiale, avec la production de schizontes sanguins contenant chacun 6 à 36 mérozoïtes. La rupture des érythrocytes libère dans le sang une nouvelle vague de mérozoïtes capables d'infecter d'autres érythrocytes. Au cours du processus de schizogonie, certains des mérozoïtes se différencient en formes sexuelles femelles (macrogamétocytes) et mâles (microgamétocytes) qui sont responsables, si elles sont ingérées par un moustique anophèle femelle, du cycle sporogonique définitif (Antinori et al. 2012).

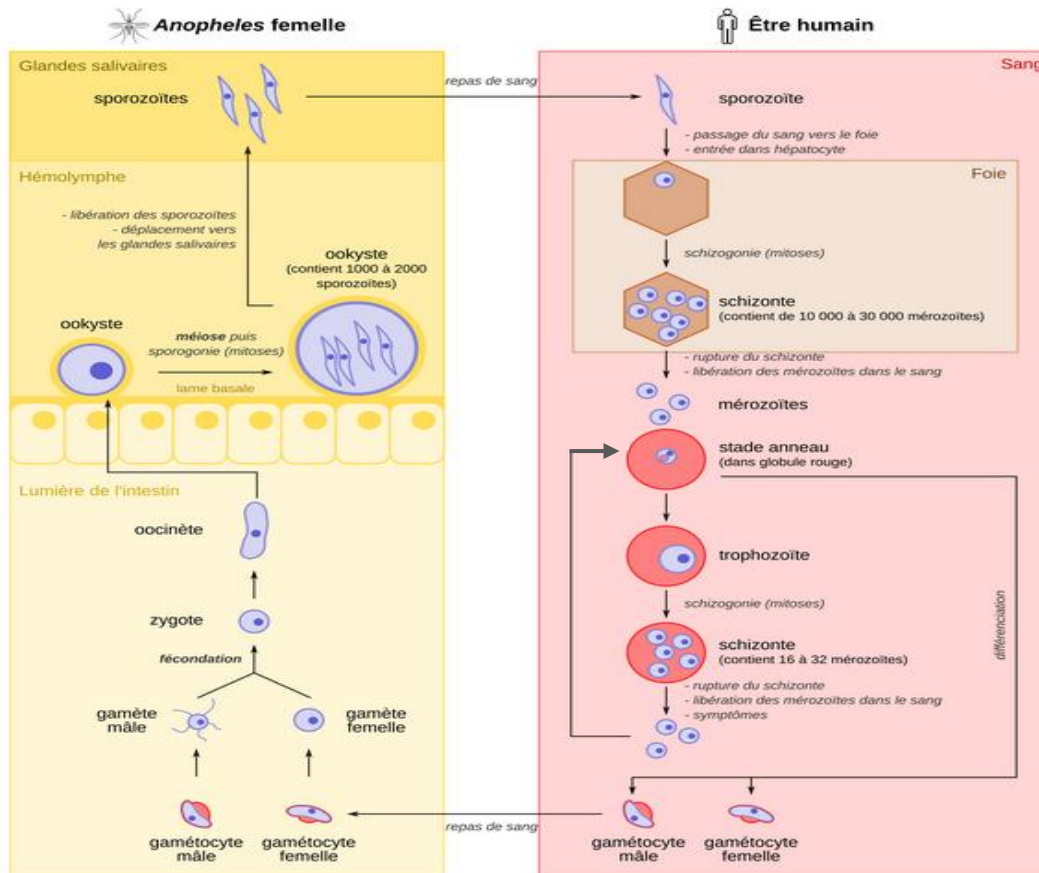


Figure 3 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum* (Ookyste = Oocyste, Oocinète = Ookinète)
 (Source : Pascal Combemorel, « Planete Vie » publié le 02.2019.)

I.1.5. Méthodes de lutte antivectorielle

Depuis 2016, le vaccin RTS,S/AS01 (RTS,S ou *Mosquirix*, GSK Vaccines) est opérationnel pour les enfants en Afrique subsaharienne. Toutefois, l'OMS recommande son utilisation chez les enfants vivants dans des zones de transmission modérée à élevée pour prévenir le paludisme à *P. falciparum* (WHO 2021). Cependant, la lutte anti-vectorielle reste le principale moyen utilisée dans la prevention et la lutte contre le paludisme (Townson et al. 2005; WHO 2016). Elle est une stratégie de lutte qui cible les vecteurs du paludisme dans le but de limiter le contact homme-vecteur et avec pour conséquence la diminution de la transmission des plasmodies par les anopheles (WHO 2016). Cette lutte consiste à mettre en place des traitements à grande échelle sur tout le territoire. Plus grande est l'étendue des opérations de lutte, meilleur sera l'impact des traitements aux insecticides sur le moustique. Ces méthodes de lutte peuvent être dirigés contre différents stades de developpement du vecteurs.

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

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

La lutte biologique peut être également envisageable. Elle se fait par l'utilisation des prédateurs naturels (poissons qui se nourrissent uniquement de larves) ou encore les bactéries entomopathogènes telle que *Bacillus thuringiensis* (Abagli, Alavo, and Brodeur 2014; Bawin et al. 2015).

I.1.5.2. Lutte contre les Adultes d'*Anopheles*

Cette méthode utilise principalement la pulvérisation intra-domiciliaire (PID) et la distribution des moustiquaires imprégnées et longue durée d'action (MILDA). Cette dernière est la plus répandue et la plus utilisée le but visé étant de réduire au maximum le contact entre l'homme et le vecteur, tout en éliminant ce dernier. La PID est la lutte «imagocide», donc le but visé ici est d'éliminer le plus grand nombre de vecteur en particulier les vecteurs endophiles et anthropophiles comme *An. funestus s.s.* et *An. gambiae* qui ont l'habitude de se poser sur les murs des habitations.

Il existe aussi la pulvérisation spatiale qui consiste à pulvériser à plus ou moins grande échelle des insecticides le plus souvent à l'extérieur des habitations (Carnevale et al. 2009), et la lutte génétique. Cette dernière consiste à réduire la densité des populations de moustique en procédant à une auto destruction ou à une modification de leur patrimoine génétique (Carnevale et al. 2009). Ainsi peut se dérouler ce processus : dans certaines localités bien délimitées il y a un relâchement des mâles stériles qui après accouplement et fécondation avec des femelles, elles ne pourraient donner des progénitures futures (Lofgren et al. 1974).

I.1.5.3. Réduction du contact homme/vecteur

Dans un premier temps les moustiquaires qu'on utilisait n'étaient pas imprégnées d'insecticides ce qui ne servait que de barrière physique entre les hommes et le vecteur. Après de nombreuses recherches au fil des années, il a été mis sur pieds des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) qui ont considérablement augmenté l'efficacité de ces moustiquaires (Josiane Etang et al. 2007), ces moustiquaires ont été améliorés pour plus d'efficacité (Etang et al. 2016). Ces MII agissent de manières différentes et les effets sont multiples à savoir : un effet irritant de courte distance qui augmente le taux de sortie des moustiques, un effet excito-répulsif à longue distance qui limite le nombre d'anophèle entrant dans la maison. Enfin un effet "knock-down" (kd = assommer les moustiques) qui assomme les moustiques venus en contact avec la MII (Carnevale et al. 2009). Les moustiquaires sont considérées par l'OMS comme étant le meilleur outil de protection individuelle et familiale contre le paludisme.

Malgré l'évolution de la moustiquaire, les anophèles continuent de piquer préférentiellement dans la nuit et à l'intérieur des maisons. C'est pourquoi les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) ("Long Lasting Insecticidal Nets : LLIN") ont vu le jour depuis plusieurs années afin qu'elles soient acceptées et accessibles par la population et les communautés. L'avantage des MILDA est leur longue durée d'action estimée entre trois et quatre ans et le fait qu'aucune ré-imprégnation n'est nécessaire durant l'utilisation (Guillet, N'Guessan, and Darriet 2001; WHO 2018). Au Cameroun les MILDA ont été distribués pour la dernière fois en 2016 (PNLP 2018). D'autres méthodes telles que des répulsifs qu'on met sur la peau dans le but d'éloigner les insectes ont également été décrits. Ils peuvent être sous forme de spray, de lotion, de crème ou de lingettes qui sont composés d'une substance active (synthétique ou naturelle) et de différents excipients. Au Burkina Faso une technique qui vise à imprégner les rideaux et vêtements (insectifuges-insecticides) a été développée dans le but de réduire significativement la transmission du paludisme (Christian, Jacqueline, and Don 1997; Pietra et al. 1991).

I.2. Différents types d'insecticides utilisés contre les insectes et leur mode d'action

Il existe 6 grandes classes d'insecticides connues en santé publique.

I.2.1. Pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des pyréthrines (extrait naturel de fleurs de chrysanthème). Ces insecticides sont classés en deux groupes. Le Groupe 1, à l'exemple de la perméthrine, ne dispose pas d'un groupement cyanure en alpha de la liaison ester. Le Groupe 2 comprend entre autre la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine, la cyfluthrine. Ils possèdent tous un groupe cyanure en alpha de la liaison ester. Les pyréthriinoïdes constituent la principale classe d'insecticide utilisée et recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires compte tenu de leur action foudroyante (effet « knockdown »), et de leur faible toxicité pour les mammifères (Hemingway et al. 2004; WHO 2020). Ils sont également les principaux insecticides utilisés en pulvérisation intra-domiciliaire à effet rémanent (PID) (Riveron et al. 2013). Leur mode d'action se traduit par le maintien des canaux sodiques ouverts pendant longtemps, ce qui bloque de façon prolongée la transmission de l'influx neuromusculaire et conduit à la mort de l'insecte (Schleier III* and Peterson 2011). Au vue de cela, la résistance aux pyréthriinoïdes, la seule classe d'insecticides actuellement utilisés dans les MII, continue de se répandre au niveau mondial (WHO 2020).

I.2.2. Organochlorés (DDT)

Les organochlorés sont en majorités constitués de Dichloro-DiphénylTrichloroéthane (DDT). Ils ont pour cible principale les canaux sodiques voltage dépendent (CNaVD) des insectes. Le mode d'action du DDT est ciblé sur le système nerveux central et périphérique, il y a ouverture des CNaVD car les DDT empêchent leur fermeture. Ce processus entraine un déséquilibre ou une perturbation ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Il en résulte donc une perturbation de la transmission de l'influx nerveux à travers le nerf, provoquant ainsi un effet de choc ou «knockdown» suivi d'une paralysie qui entraine la mort de l'insecte (Davies et al. 2007).

I.2.3. Organophosphorés

Ce sont les dérivés de l'acide phosphorique : le malathion, le fénitrothion, et le pirimiphosméthyl et sont les plus utilisés en santé publique pour les aspersion intra-domiciliaires. Ils ont pour cible l'acétylcholinestérase dont ils inhibent l'activité (S. Lee and Barron 2016). L'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine en choline et en acétyle. L'acétylcholine agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques situées dans le système nerveux central de l'insecte ce processus se passe lors de la transmission de l'influx nerveux. Selon la littérature il est

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

I.2.4. Carbamates

Les carbamates sont les dérivés de l'acide carbamique. Ce sont les moins persistants dans la nature et les plus biodégradables. Le bendiocarbe et le propoxure sont les insecticides les plus courants, et sont utilisés en aspersion intra-domiciliaires pour lutter contre le paludisme (Carnevale et al. 2009). Ces insecticides sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase avec un processus d'action pareil à celui des organophosphorés. La résistance au carbamate peut également être conférée par un mécanisme de résistance au site cible avec des mutations sur le gène Ace-1 qui induisent habituellement une résistance aux insecticides organophosphorés (Hemingway and Ranson 2000).

I.2.5. Pyrroles

Les pyrroles sont une classe relativement nouvelle de produits chimiques de lutte contre les nuisibles qui permettent de traiter efficacement un large éventail d'infestations d'insectes. Il est un composé chimique organique utilisé comme ingrédient actif dans de nombreux produits antiparasitaires courants. Cette substance a été développée pour répondre aux infestations d'insectes qui commençaient à résister aux pyréthroïdes, une classe de produits chimiques qui imitent les effets des pyréthrines naturelles. Ils sont généralement plus efficaces lorsqu'ils sont combinés à d'autres ingrédients chimiques actifs. Le chlorfénapyr est la seule substance active actuellement disponible dans le commerce qui soit classée parmi les pyrroles. Il agit en perturbant la capacité des insectes à produire de l'énergie dans leurs mitochondries. Le manque d'énergie nouvelle empêche l'insecte d'accomplir des fonctions cruciales telles que se nourrir, se déplacer et se toiletter, et il finit par mourir. En fait, le composé pyrrole utilise le métabolisme de l'insecte contre lui, ce qui entraîne son autodestruction une fois que la substance s'est répandue dans son corps.

I.2.6. Néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes représentent une classe de produits chimiques conçus pour imiter les propriétés de la nicotine, un produit chimique qui crée une dépendance. En fait, le terme néonicotinoïde signifie littéralement "nouvel insecticide semblable à la nicotine". Parmi les

ingrédients actifs néonicotinoïdes les plus populaires, citons : l'acétamipride, le dinotéfurane, l'imidaclopride, le thiaméthoaxam et d'autres encore... Ils se comportent comme la nicotine, en agissant sur le système nerveux central de l'insecte cible, en se liant aux cellules nerveuses et en provoquant une surstimulation et une perturbation. Les insectes exposés aux néonicotinoïdes présentent des symptômes de spasmes et de perte de contrôle des fonctions corporelles, de paralysie et finalement de mort.

I.3. Mécanismes de résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides

Les études aux laboratoires ont permis de montrer que la résistance aux insecticides observées dans de nombreuses populations de vecteur de paludisme peuvent être dues à plusieurs mécanismes (Low et al. 2013; Riveron et al. 2013), parmi lesquels la détoxification naturelle des insecticides par les enzymes ou alors à une mutation de la cible de l'insecticide. Chacun de ses mécanismes est contrôlé par au moins un gène qui peut présenter différents allèles (A. Enayati and Hemingway 2010). De façon générale, ces différents mécanismes sont regroupés en quatre grandes catégories.

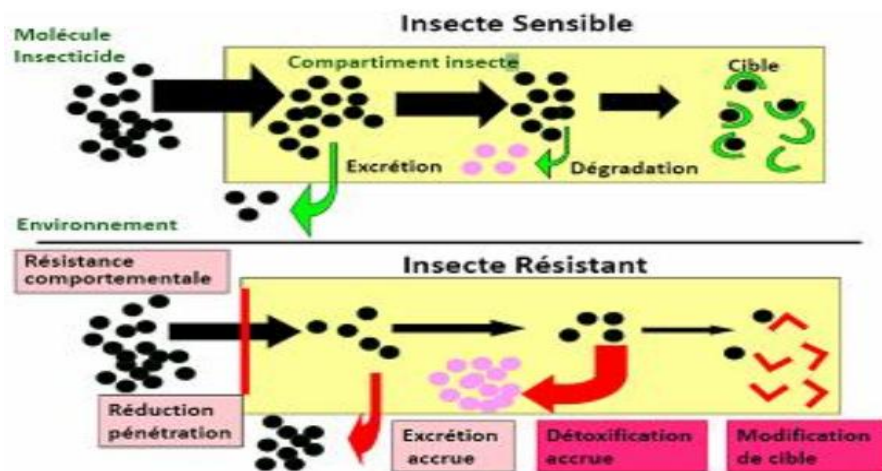


Figure 4 : Schémas illustrant les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides.

(Source : Corbel et N'Guessan, 2013.)

I.3.1. Résistance comportementale

La résistance comportementale est l'un des mécanismes les plus difficile à élucidé, car son mécanisme n'est pas encore réellement démontré par rapport aux autres mécanismes de résistance (Djogbénu et al. 2009). Elle repose sur le fait que lorsque le moustique ressent la présence de

l'insecticide, il change immédiatement son comportement lui évitant donc tout contact avec la molécule de l'insecticide.

I.3.2. Résistance cuticulaire

On parle de résistance cuticulaire lorsqu'il y a modification chimique de la cuticule de l'insecte entraînant une diminution de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme et aboutissant à la survie des individus. La cuticule possède des propriétés physico-chimiques très particulières, car c'est un milieu biologique très complexe ayant notamment une très forte lipophilie. Les caractéristiques de cette résistance font d'elle un important acteur dans la résistance aux insecticides chimiques. De ce fait, une étude des mesures par microscopie à balayage électronique a montré une plus grande épaisseur de cuticule chez une souche d'*An. funestus s.l* résistante aux pyréthrinoïdes comparée à une souche sensible (Wood et al. 2010).

I.3.3. Résistance par modification de la cible de l'insecticide

Ce mécanisme est très répandu chez les insectes. Il repose sur les modifications de la conformation de la protéine cible de l'insecticide, ce qui entraîne ainsi une réduction de la capacité de fixation de ce dernier ainsi que son effet. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux tel le récepteur à l'acétylcholinestérase (AChE) (responsable de la résistance aux organophosphates et aux carbamates), le récepteur au canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) (responsable de la résistance aux organochlorés et aux pyréthrinoïdes encore appelé résistance knock-down), le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (responsable de la résistance à la dieldrine) (A. Enayati and Hemingway 2010; Hemingway and Ranson 2000). Ces trois cibles réagissent de manière spécifique à ces insecticides et ainsi qu'a lieu d'action.

- Le récepteur à l'Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine dans le but de stopper la transmission synaptique et régler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique. Cette molécule est la cible des organophosphorés et des carbamates. Grâce aux sites actifs de l'acétylcholinestérase (site anionique et la triade catalytique Ser-His-Glu) il y aura réaction avec l'acétylcholine qui va subir une hydrolyse. Ce qui va induire la libération de la choline et un intermédiaire acétyle-enzyme sera formé (Soreq and Seidman 2001). Les moustiques ont développé une résistance aux insecticides organophosphorés et carbamates grâce à la mutation

rencontrée chez l'acétylcholinestérase (Ibrahim et al. 2016; Weill et al. 2003). Deux anophèles majeurs du paludisme ont ce type de résistance aux insecticides (*An. gambiae s.l* et *An. funestus s.l*). En ce qui concerne *An. gambiae s.l*, cette mutation est due à une substitution glycine-sérine (G119S), signalée en Afrique de l'Ouest (Weill *et al.*, 2003). Cette même mutation a également été détectée chez *Culex pipiens* (Bonning et al. 1991; Low et al. 2013). D'après des études antérieures la mutation G119S n'a pas été trouvée chez *An. funestus s.l* (Cuamba et al. 2010) ni chez *Aedes aegypti* (Vontas et al. 2012). Toutefois des études récentes menées par Ibrahim et collaborateurs ont prouvé la présence d'une mutation à la position 485 du gène ACE 1, où l'on observe un changement d'asparagine à isoleucine (N485I) qui a été décrite en 2016 chez *An. funestus s.s* (Ibrahim et al. 2016).

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

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

Il existe deux principales mutations de type kd. La mutation la plus courante est celle rencontrée chez *An. gambiae* d'Afrique de l'Ouest. Ici, on observe à la position 1014 du gène, un changement de la leucine par la phénylalanine (L1014F) qui est due à une résistance de grande intensité au DDT, à la perméthrine et également à une résistance croisée à tous les pyréthriinoïdes (Martinez Torres *et al.*, 1998). Une autre mutation est encore observée au niveau du même codon dans ce cas il y a un remplacement de la leucine plutôt par la sérine (L1014S), cette mutation est rencontrée chez *An. gambiae* et *An. arabiensis* qui ont été résistants à la perméthrine dans une étude menée au Kenya (Ranson et al. 2000). Dans le cas d'*An. funestus* on ne note encore aucune présence de "kd" selon les études passées effectuées (Irving and Wondji 2017; Riveron et al. 2013; Wondji et al. 2011).

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

Le récepteur du canal GABA est la cible des phénylpyrazoles et de certains organochlorés (cyclodiènes). Le GABA est la cible principale des neurotransmetteurs inhibiteurs et il joue un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale (hyperpolarisation membranaire) chez les vertébrés et les invertébrés. Les récepteurs des insecticides ont une composition en sous-unités très inconnues pour l'instant. De nos jours trois sous-unités ont été clonées chez *Drosophila melanogaster*, il s'agit de RDL (résistance à la dieldrine), GRD (GABA et le récepteur de liaison glycine de *Drosophila*) et LCCH3 (Ligand-gated Chloride Channel Homologue 3) (Hosie et al. 2001). Pour le récepteur de l'acide gamma 15 aminobutyrique, une mutation au niveau du codon 296 du gène GABA a été observée avec remplacement de l'alanine par la glycine (A296G) (Rauh et al. 1997) qui est responsable de la résistance à la dieldrine chez *An. gambiae* (BROOKE et al. 2006). On observe aussi une résistance similaire chez *An. funestus* et *An. arabiensis* sur le même récepteur avec plutôt un changement d'alanine à sérine (A296S) (Du et al. 2005; Wondji et al. 2011).

I.4.4. La résistance métabolique

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

- **Les monooxygénases à Cytochrome P450 (CYP450)**

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

- **Les Carboxylestérases (COEs)**

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

- **Les glutathions S-transférases (GSTs)**

Les glutathions S-transférases représentent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles et activent durant le métabolisme des xénobiotiques. Ces protéines sont

retrouvées chez les vertébrés comme chez les invertébrés et sont principalement localisées au niveau de cytosol. Elles sont impliquées dans le transport intracellulaire et la biosynthèse d'hormone qui joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif (A. A. Enayati, Ranson, and Hemingway 2005). Les GSTs sont principalement impliquées dans la résistance au DDT (Hemingway and Ranson 2000). Chez *An. funestus* dans plusieurs pays d'Afrique, les GSTs ont été associées à la résistance au DDT par la mutation présente sur le gène GSTe2 (L119F) (Riveron, Yunta, et al. 2014). On a aussi enregistré une résistance aux pyréthrinoïdes au Bénin et au Cameroun qui est due à la présence de ces GSTs (Riveron, Yunta, et al. 2014) et à la résistance aux organophosphates (Hemingway et al. 2004).

- **UDP-glycosyltransférases (UGT)**

Les UDP-glycosyl transférases (UGT) constituent une importante superfamille d'enzymes de biotransformation et ont été trouvées dans tous les organismes vivants, y compris les virus, les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Elles catalysent le transfert (l'addition) de groupes glycosyl d'un donneur de sucre activé à une variété de produits chimiques hydrophobes nocifs, de métabolites endo- et xénobiotiques, générant des produits hydrosolubles qui peuvent être excrétés efficacement, ce qui entraîne la détoxification et l'élimination de leurs substrats ; ils interviennent dans plusieurs processus physiologiques, notamment la détoxification, l'olfaction, la formation de la cuticule et la pigmentation. Les fonctions des UGT dans la détoxification des substances de défense de la plante hôte ont été signalées chez de nombreux insectes, notamment chez les lépidoptères tels que *Manduca sexta*, la pyrale du maïs *Ostrinia furnacalis*, *Helicoverpa armigera*, *H. assulta*, *H. zea* et *Heliothis virescens*, ainsi que *Spodoptera littoralis*. (Xiuxia Li et al. 2017). Ils peuvent métaboliser non seulement des endo-métabolites et des métabolites secondaires défensifs des plantes, mais aussi les insecticides. Sur la base de leurs fonctions puissantes dans le métabolisme des produits phytochimiques, on suppose que les UGT des insectes sont impliquées dans la détoxification des insecticides, et par conséquent dans le développement de la résistance aux insecticides. En fait, il y a quatre décennies, Bull et Whitten ont documenté l'implication d'une conjugaison glucosidique accrue dans la résistance au méthyl parathion chez les tordeuses du tabac *H. virescens* (Bull and Whitten 1972) et il y a 10 ans, Lee et collaborateurs ont apporté la preuve d'une résistance métabolique basée sur l'UGT à un autre insecticide organophosphoré, le pyraclofos, chez la mouche domestique *Musca domestica* (J.-Y. Lee et al. 2006). Une étude menée en 2019 a décrit une famille et des mutations des UGTs potentiellement

impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. sinensis*, et jette une base importante pour mieux comprendre et poursuivre les recherches sur la fonction UGT dans la défense contre le stress des insecticides (Zhou et al. 2019). Des études récentes menées en 2021 ont mis en évidence la surexpression de certains UDP Glycosyl transférases chez *An. gambiae* et *An. funestus* à l'instar de Afun011266 et Afun004354 (Kouamo et al. 2021; Wondji et al. 2022), cependant, leur rôle dans la résistance aux insecticides n'a toujours pas été clairement élucidé.

	CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	
--	--	--

II.1. Description du site d'étude et collecte des échantillons

II.1.1. Description du site d'étude

Cette étude a été réalisée en mars 2020 à Mibellon (6°46'N, 11°70'E), un village du Cameroun située dans la région de l'Adamaoua, dans le département de Mayo-Banyo et ayant pour chef-lieu l'arrondissement de Bankim. La région de l'Adamaoua est située dans la zone montagneuse formant une transition entre le sud forestier du Cameroun et le nord de la savane. Mibellon est situé dans la commune de Bankim, à proximité de plans d'eau permanents, dont un lac et des marécages qui constituent des sites de reproduction appropriés pour les moustiques. Les activités humaines sont principalement la pêche, la chasse et l'agriculture de subsistance, y compris les plantations de maïs, de pastèques et de café. Une enquête menée dans la région a révélé une forte utilisation d'insecticides dans les plantations de café et de pastèques. Ces insecticides sont principalement des pyréthroïdes, des néonicotinoïdes et des carbamates.

La Commune de Bankim fait partie des 03 Communes que compte le département de Mayo-Banyo : est limitée au Nord, par la Commune de Mayo-Darlé. A l'Est, par les communes de Ngambé Tikar et de Yoko dans la région du Centre. Au Sud, par la Commune de Magba dans la région de l'Ouest avec limite sur le fleuve Mapé. A l'Ouest, par la commune de Nwa dans la région du Nord-ouest, et par la République Fédérale du Nigéria (limite sur le mont Mambila sur une distance de 35 km). Mibellon est situé à environ 463,6km de Yaoundé en passant par la nationale N15 (région de l'Ouest). La commune de Bankim compte environ 101.551 habitants dont 550 à 1800 habitants pour Mibellon d'après le dernier recensement en 2014. Elle est composée de plusieurs groupes ethniques. Bankim est caractérisé par un climat est de type tropical humide, il a les caractéristiques suivantes : Zone de basse altitude variant de 500 à 800 m, la Commune de Bankim présente dans sa majeure partie, un climat de type équatorial humide et chaud, avec des températures moyennes de l'ordre de 23°C. On note principalement une saison pluvieuse qui va de mi-mars à mi-novembre (soit sur 08 mois), et une saison sèche de mi-novembre à mi-mars.

Les sols de la Commune de Bankim sont pour l'essentiel des sols ferrallitiques et hydro-morphes, même si quelques nuances sont observées d'une zone à l'autre (Des sols limoneux argilo sableux dans les zones de bas fond, des sols latéritiques bruns dans les zones de savanes disséminées et des sols ferrallitiques humifères sombres dans les zones des galeries forestières). Le réseau hydrographique de la Commune de Bankim est constitué principalement de deux fleuves dont le Mbam qui longe toute la limite Est de la Commune et qui fait office de limite avec la zone

de Ngambé Tikar, et la Mapé qui fait office de limite avec la zone de Magba, il existe plusieurs rivières qui sont tous affluents de ces deux fleuves, entre autres le KWI ; le NGOUM ; le NGWIN ; le NGI ; le DJWAKAR et leurs affluents. La Zone de transition entre la forêt et la savane, et donc à écologie fragile, la Commune de Bankim présente des galeries forestières principalement le long des cours d'eau, et des savanes arborées et arbustives dans sa majeure partie. (Commune de Bankim 2015).

Cette commune a fait l'objet de notre étude parce qu'il a été prouvé que le vecteur *An. funestus* est le principal vecteur de paludisme dans cette région pendant la saison sèche. Le village a bénéficié des campagnes de couverture universelle des MILDA ces dernières années plus précisément en 2016. La résistance aux insecticides a été reportée chez les principaux vecteurs du paludisme dans cette localité

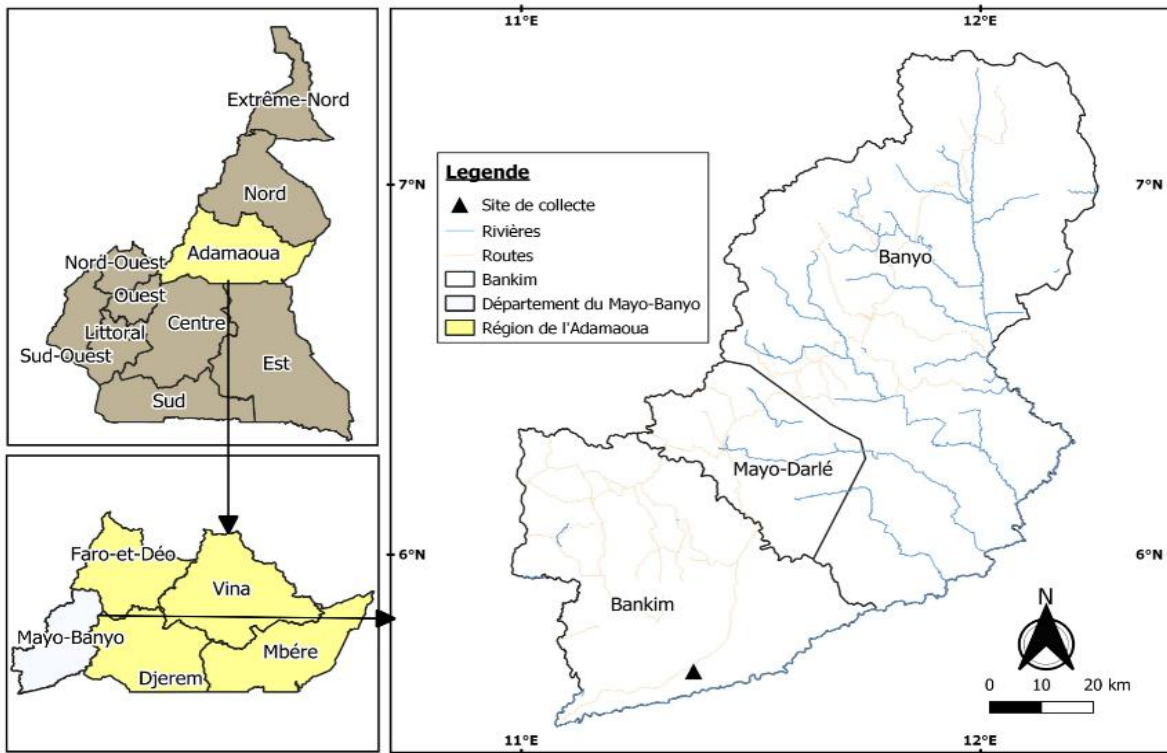


Figure 5 : Le site de collecte d'*An. funestus* à Mibellon (Bankim)

(Source : Institut nationale de cartographie, 2019 modifié.)

II.1.2. Collecte des échantillons et Identification morphologique

Les moustiques adultes ont été collectés dans les maisons d'habitations chaque matin de 6 à 11 heures à l'aide de l'aspirateur électrique *Prokopack* (John W Hook, Gainesville, FL, USA)

qu'on promène dans tous les coins des pièces de la maison (angle du mur, sous les meubles, sous le lit, sous la moustiquaire). Un consentement verbal a été donné par les propriétaires des maisons avant le début des collectes. Les moustiques ainsi collectés, ont été conservés dans des gobelets en papier munis d'un voile et placés dans une glacière recouverte d'une serviette humide. La totalité des échantillons collectés ont ensuite été transportés à l'insectarium du C.R.I.D à Yaoundé (Cameroun). Une fois à l'insectarium, une identification morphologique de quelques spécimens a été effectuée sous une loupe binoculaire à partir des clés spécifiques d'identification des Anophèles (Maureen Coetzee 2020). Les moustiques gravides (femelles gravides) ont 4 à 5 jours plus tard été incités à pondre des œufs en utilisant la méthode de ponte forcée. Dans cette méthode, chaque femelle gravide est placée dans un tube Eppendorf de 1,5mL contenant du coton humidifié et du papier filtre, pour des pontes individuelles. Les œufs obtenus ont été mis dans des gobelets en papier contenant de l'eau minérale pour qu'ils puissent éclore et les adultes ont été assommés et conservés à -20°C dans des tubes Eppendorf 1,5mL contenant du *Silica gel* pour les tests futurs. Après l'éclosion, les larves ont été transférées dans des bacs d'élevage et nourries avec la *TetraMinBaby*® (aliment pour alevins) jusqu'à l'obtention des nymphes, ces derniers ont été triés quotidiennement puis placés dans des cages. Les femelles adultes de nouvelles générations (F1) ainsi obtenues ont été utilisées pour les tests de sensibilité aux pyréthrinoïdes après 2 à 5 jours d'existence.



Figure 6 : Dispositif de collecte des moustiques adultes et collecte intradomiciliaire.

(Source : photos prise sur le terrain, Mibellon, 2020)

II.2. Evaluation du profil de sensibilité des moustiques du genre *An. funestus* aux Pyréthriinoïdes

Les tests de sensibilité aux pyréthriinoïdes ont été réalisés sur les moustiques adultes de la génération F1 âgés de 2-5 jours suivant le protocole de l’OMS (WHO 2016). Les insecticides testés comprenaient la Perméthrine (0,75% ; 3,75% et 7,5%), la Deltaméthrine (0,05% ; 0,25% et 0,5%). Les moustiques témoins ont été exposés aux papiers non imprégnés. Les taux de mortalité ont été déterminés 24h après exposition aux Pyréthriinoïdes. Les moustiques morts ont été transférés dans les tubes eppendorf 1,5mL contenant le *Silica gel* puis conservés à -20°C tandis que les survivants ont été conservés à -80°C dans des tubes Eppendorf 1,5mL contenant du *RNAlater*.

L’interprétation des résultats se fait comme décrit ci-dessous :

- une mortalité $\geq 98\%$ la population est dite sensible
- une mortalité entre 90-97,99% résistance probable
- une mortalité $< 90\%$ la population est dite résistante

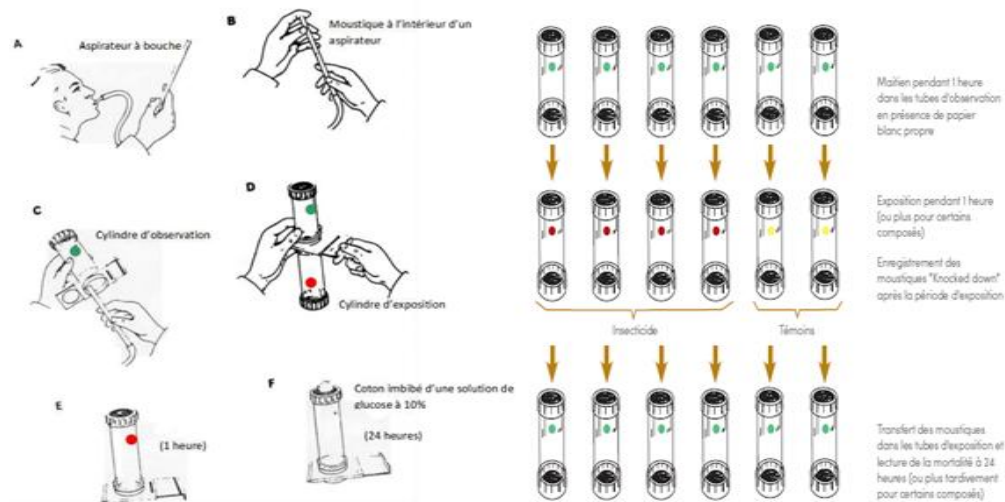


Figure 7 : Les différentes étapes dans la réalisation du test de sensibilité de l'OMS pour la concentration discriminante et celles correspondant à 5 et 10 fois cette concentration (WHO, 2016)

II.3. Extraction des biomolécules

II.3.1. Extraction de l'ADN

Les échantillons de moustiques de la F0 ont été soumis à une extraction d'ADN en utilisant le protocole décrit par Livak, 1984 (composition du Livak pour 100mL est la suivante : 1,6mL de NaCl 5M ; 5,48g de sucrose ; 1,57g de Tris ; 10,16mL de EDTA 0,5M et de 2,5mL de SDS 20%). Le tampon Livak a été au préalable chauffé dans un bain-marie à 65°C. Les moustiques entiers ont été placés chacun dans un tube Eppendorf de 1,5mL étiqueté puis broyés dans 100µL de tampon Livak à l'aide des pilons à broyage stérile et d'un broyeur à moteur. Après une incubation à 65°C pendant 30minutes au bain-marie, suivi d'une brève micro-centrifugation (10 à 15sec) pour condenser le broyat, 14µL d'acétate de potassium 8M ont été ajoutés à chaque échantillon puis mélangés à l'aide d'un vortex et incubés dans la glace pendant 30minutes. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 13500tr/min pendant 20minutes à 4°C pour séparer les débris cellulaires et les protéines dénaturées de l'ADN. Le surnageant de chaque tube a été transféré dans un nouveau tube eppendorf de 1,5mL étiqueté. A ce surnageant, 200µL d'éthanol absolu ont été ajoutés et homogénéisés à l'aide d'un vortex puis centrifugés à 13500tr/min pendant 15 minutes à 4°C afin de décanter les acides nucléiques des impuretés. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 100µL d'éthanol 70% glacé. L'alcool a été entièrement retiré et les tubes laissés ouverts au séchage sur la paillasse pendant environ 1 heure afin d'éliminer l'alcool résiduel. L'ADN ainsi extrait a été reconstitué dans 100µL dH₂O (*Sigma Water*), puis incubé à 65°C pendant 10minutes. La solution a été mélangée à l'aide du vortex puis la concentration en Acide nucléique a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientificinc., Wilmington, USA). Les échantillons ont été ensuite conservés à -20°C pour analyses ultérieures.

II.3.2. Extraction de l'ARN

Trois pools de 10 moustiques de la F1 (résistants et control) ont été utilisés. Cinq groupes d'échantillons ont été constitués à savoir : Perméthrine résistants, Deltaméthrine résistants, control (les moustiques du terrain non exposés), Fang (souche sensible du laboratoire), Fumoz (souche résistante du laboratoire). L'extraction de l'ARN a été faite grâce au kit d'extraction Pico-pure suivant les instructions du fabricant. A cet effet l'extraction s'est faite en deux étapes : extraction puis isolation de l'ARN total.

3 reliquats de 10 moustiques ont été collectés et broyés à l'aide d'un pilon stérile et d'un broyeur à moteur dans des tubes Eppendorf de 1,5mL contenant 100µL du tampon d'extraction (XB). Toutes les étapes se faisant sur la glace, les échantillons ont été initialement incubés à 42°C pendant 30minutes. Pendant cette incubation, des colonnes de purification de l'ARN ont été préconditionnées en introduisant 250µL de tampon de conditionnement (CB) sur la membrane de la colonne puis portées en incubation à température ambiante pendant 5minutes, suivi d'une centrifugation des colonnes dans le tube collecteur fourni par le fabricant à 16000rcf pendant 1minute ensuite les tubes collecteurs ont été vidés. Dans le but de séparer le culot au surnageant, les échantillons ont été centrifugés à 14000rcf pendant 2minutes, puis le surnageant a été pipeté et introduit dans un nouveau tube à Eppendorf en se rassurant de ne transférer aucun débris.

Par la suite 100µL d'éthanol 70% ont été introduits dans le surnageant et le mélange a été ensuite introduits dans la colonne de purification préconditionnée. Puis une première centrifugation de 2minutes à 100rcf a été faite, suivi immédiatement d'une seconde centrifugation à 16000rcf pendant 30secondes, le flux qui a traversé la membrane de purification a été éliminé. 100µL de tampon de lavage 1 (W1) ont été introduits dans la colonne de purification suivi d'une centrifugation pendant 1minute à 8000rcf. Les échantillons ont ensuite subi un traitement à base de DNase. Pour cela 5µL de DNase est mélangé à 35µL de tampon RDD par inversion lente. La solution DNase ainsi obtenue (40µL) a été introduite dans la colonne de purification suivie d'une incubation pendant 15minutes à température ambiante. Par la suite, 40µL de tampon 1 (W1) ont été introduits à l'intérieur de chaque colonne de purification suivi d'une centrifugation à 8000rcf pendant 1minute. 100µL de tampon de lavage 2 (W2) ont été introduits dans la colonne de purification à deux reprises et centrifugé pendant 1minute à 8000rcf dans un premier temps, ensuite pendant 2minutes à 16.000rcf. La colonne de purification a été vérifiée pour s'assurer que le fluide a traversé la membrane et que ce dernier a été versé après chaque centrifugation. Elle est ré-centrifugée à 16000rcf pendant 1minute et transférée dans un nouveau tube de micro-centrifugation qui se trouve dans le kit. Enfin, 30µL de tampon d'élution ont été introduits délicatement sur la membrane de la colonne de purification. Une incubation de la colonne pendant 1minute à température ambiante s'est faite, suivie d'une centrifugation pendant 1minute à 16000rcf pour éluer l'ARN. L'ARN ainsi obtenu a été conservé à -80°C après lecture des différentes concentrations à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop Lite pour analyses ultérieures.

II.3.3. Synthèse de l'ADNc

Pour la synthèse de l'ADNc, 1000ng d'ARN ont été utilisés. Le calcul suivant a été effectué pour évaluer le volume d'ARN à utiliser pour la synthèse de l'ADNc : Volume d'RNA=1000ng/conc RNA puis, on ramène le volume à 8µL en ajoutant de l'eau moléculaire stérile. Pour une concentration de 347,5ng/µL, le volume à prélever a été de : $1000\text{ng}/347,5\text{ng}/\mu\text{L} = 2,8\mu\text{L}$, puis on ajoute 5,2µL dH₂O pour avoir un volume final = 8µL.

Pour cette synthèse 1µL d'Oligo (dt) 20 (50 mM) a été utilisé : 8µL d'ARN + dH₂O ; 3µL d'eau moléculaire stérile et 1µL de dNTPs (10 mM) pour un premier temps et le tout a été porté à 65°C pendant 5minutes. Par la suite un mix comprenant : 4µL de tampon de brin 5x ; 1µL de DTT 0,1M ; 1µL de « RNase Out » et 1,5µL de "Superscript III RT" a été préparé, puis mélangé avec la première solution. A la fin une solution ayant un volume de 20,5µL a été obtenue et introduit dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) avec les conditions suivantes : 25°C→5min ; 50°C→60min ; 70°C→15min.

A la fin du cycle, les échantillons ont été retirés du thermocycleur et 1µL de RNase H (E-Coli) y a été ajouté et le tout incubé à 37°C pendant 20minutes, pour éliminer toute possibilité de présence d'ARN dans le milieu. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C pour analyse ultérieure.

II.4. Identification moléculaire des moustiques du genre *An. funestus*

➤ Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

Elle est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN. Afin de différencier l'espèce du groupe à partir de biomolécules d'ADN des moustiques de F0 obtenu précédemment, nous avons réalisé un Cocktail PCR d'identification d'espèce.

L'ADN extraite a été amplifié à l'aide d'un thermocycle (GeneTouch Bioer) en utilisant une multitude d'amorces : l'amorce sens UV : TGTGAACTGCAGGACACAT et les amorces antisens, FUN : GCATCGATGGGTAAATCATG ; PAR : TGCGGTCCCAAGCTAGGTTC ; RIV : CAAGCCGTTTCGACCCTGATT ; VAN : TGTCGACTTGGTAGCCGAAC ; LEES : TACACGGGCGCCATGTAGTT ; d'une enzyme polymérase « *Kapa taq* » ; des nucléotides libres (dNTPs) ; d'un activateur d'enzyme Mgcl₂ et de l'eau moléculaire (Koekemoer et al. 2002).

Le mélange d'amplification contenait 1,5µL de tampon A 10x, 0,12µL de dNTPs 25mM ; 0,9µL de Mgcl₂ ; 0,51µL d'amorces sens et antisens ; 7,79µL dH₂O (*Sigma Water*), et 0,12µL d'enzyme polymérase « *Kapa Taq* ». A l'intérieur de chaque tube PCR 1µL d'ADN y a été

introduit. Les conditions d'amplification de la PCR sont une dénaturation initiale de 2minutes à 94°C, suivie de 35cycles d'amplification (dénaturation : 30secondes à 94°C, hybridation : 30secondes à 45°C, extension : 40secondes à 72°C) et d'une extension finale de 5minutes à 72°C.

➤ **Electrophorèse**

L'électrophorèse est une technique permettant la séparation des molécules porteuses de charges électriques comme les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques dont l'ADN. Son principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique créé par une tension continue, ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charges électrique totale, masse moléculaire, nature du support, conditions physico-chimiques), la vitesse de migration varie, les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que celles de grandes tailles.

Après PCR, les produits obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, préparé en introduisant 2g de poudre d'agarose dans 100mL de solution tampon Tris-Acétate-EDTA (tampon TAE) 1x. La solution a été portée à ébullition dans un four à micro-ondes pendant près 2minutes. Après refroidissement, 1µL de *Midori Green* (Bulldog Bio Inc., Hampshire UK) y a été ajouté et la solution a été coulée dans un moule d'électrophorèse muni de peignes pour former des puits. Après gélification, le gel a été transféré dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE, 3µL de produit d'amplification ont été déposés dans les différents puits après avoir été mélangés à 1µL de tampon de charge (composé : de bleu bromophénol ; de xylène cyanol ; EDTA pH 7,6 et de glycérol) qui permet d'une part de densifier les amplicons et les entrainer au fond des puits et d'autre part, de suivre la migration. Un marqueur de poids moléculaire (100kb ou Ladder IV) a été introduit dans l'un des puits du gel pour une estimation de la taille des différentes bandes.

L'électrophorèse s'est déroulée sous une tension de 150volts à 300mA pendant environ 35minutes. La fin de la migration, les produits de PCR ont été visualisés à l'aide du système de documentation Enduro TM GDS G-Box sous lumière ultraviolette pour la détection des différentes bandes.

II.5. Evaluation du niveau d'expression des gènes candidats de résistance métabolique par (RT-qPCR)

Un ensemble de 5 dilutions successives au 1/5^{ième} à partir du stock d'ADNc original a été fait (dilution 1 au 5^{ième} ; dilution 2 au 25^{ième} ; dilution 3 au 125^{ième} ; dilution au 625^{ième} ; dilution

5 au 3125^{ième}). Pour cette manipulation, la dilution 2 au 1/25^{ième} (10µL dilution 1 plus 40µL ddH₂O) qui est celle choisie en fonction de la courbe standard d'étalonnage réalisée et l'évaluation des gènes candidats a été faite en fonction des gènes de ménage (*housekeeping genes*, gènes toujours exprimés chez *An. funestus*) RSP7 et Actine. Pour la préparation de la solution mix, 10µL de la solution de SYBR Green a été introduites dans un tube eppendorf 1,5mL contenant 0,6µL de paires d'amorces sens : qPCRUGT4354F : CCGATGGATGAAGCAATCTT ; qPCRUGT11266F : AAGCGTCACTCGAAACCAGT et antisens : qPCRUGT4354R : TTGTTTTTCATTTTAGCCGAAGTT ; qPCRUGT11266R : GCCAATGGCCAATTACAATC à 10mM et 7,8µl dH₂O (*Sigma Water*). Du fait de la photosensibilité du SYBR Green, le mélange ainsi préparé a été posé sur de la glace à l'abri de la lumière. Dans chaque puits de la plaque d'Agilent Technologie et en fonction des amorces spécifiques, 9µL de la solution mix a été introduit et ensuite 1µL d'ADNc dilué a été ajouté. Par la suite une centrifugation de la plaque à 3000tr/min pendant 1minute a été faite dans le but de faire descendre la solution réactionnelle au fond des tubes.

La plateforme MxPro-MX3005P (Agilent®) a été utilisée pour la PCR en temps réel selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 3minutes à 95°C, suivie de 40cycles d'amplification (dénaturation : 10secondes à 95°C, hybridation-extension : 10secondes à 60°C), le temps total de la manipulation est de 1h12min54sec. On sélectionne les puits et on les met en surbrillance en fonction des amorces (lors de la courbe standard ou lors de l'analyse des échantillons inconnus).

NB : Tous les échantillons doivent être en réplica de trois, une seule dilution est utilisée pour tous les échantillons.



Figure 8 : Photographie d'une machine Agilent Technologies, Mx3005P
(Source : photos prise au laboratoire, CRID, 2020)

II.6. Analyse de la diversité génétique et recherche des potentiels marqueurs de résistance *UGT Afun004354* aux Pyréthriinoïdes chez *An. funestus* s.s.

II.6.1. Amplification et purification du gène *UGT Afun004354*

II.6.1.1. Amplification du gène *UGT Afun004354*

La réaction de polymérase en chaîne ou "*Polymerase Chain Reaction*" (PCR) est une technique d'amplification d'une séquence d'acide nucléique. Elle consiste à réaliser une succession d'amplification d'une matrice d'acide nucléique. Dans la plupart des cas on utilise l'ADN polymérase, une enzyme capable de copier une séquence d'acide nucléique et par conséquent de créer les polymères. Pour cette amplification l'enzyme utilisée était *Phusion Taq* car il permet l'amplification des séquences longue riche en GC et possède une haute-fidélité.

Le fragment d'ADN complémentaire du gène *UGT Afun004354* qui contient la partie du codon a été amplifié à l'aide d'un thermocycleur (GeneTouch Bioer) en utilisant une paire d'amorces : amorce sens CdnaUGT4354F : ATGTGGTTGCGATTCGTTTT ; amorce antisens est CdnaUGT4354R : TTACGATCGTTTAGGTTTGG. Le mélange d'amplification contenait 3 μ L de tampon HF 5x qui permet d'améliorer les performances de l'ADN polymérase de "*Phusion taq*" sur certaines matrices difficiles ou longues, telles que les matrices riches ou celles présentant des structures secondaires complexes. Puis 0,12 μ L dNTPs 25mM ; 0,51 μ L d'amorces sens et antisens ; 9,71 μ L dH₂O (*Sigma Water*), et 0,12 μ L d'enzyme *Phusion Taq*. A l'intérieur de chaque tube 1 μ L d'ADNc y a été introduit. Les conditions d'amplification de la PCR sont une dénaturation initiale

de 1minute à 98°C, suivie de 35cycles d'amplification (dénaturation : 10secondes à 98°C, hybridation : 10secondes à 63°C, extension : 2minutes à 72°C) et d'une extension finale de 10minutes à 72°C. Dans le but d'augmenter la quantité d'ADN produits.

Les amplicons ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse comme ci-dessus, seul le marqueur de poids moléculaire était différent (1kb ou Ladder I).

II.6.1.2. Purification du gène *UGT Afun004354* par gel extraction (QIAGEN)

Après amplification, une première électrophorèse a été faite dans le but d'identifier les bandes d'ADN correspondant au gène d'intérêt (*UGT Afun004354*). Une seconde électrophorèse avec la totalité du produit d'amplification a été effectuée, afin de concentrer l'amplicons comme décrit précédemment.

Une fois la migration terminée, les bandes d'ADNc ont été excisées du gel d'agarose grâce à un scalpel. Les tranches de gel ont ensuite été introduites dans des tubes Eppendorfs 1,5mL étiquetés puis pesés. 3 volumes de tampon QG y ont été ajoutés dont le but est de dissoudre le gel (200mg de gel = 600µL de tampon) et ensuite incubée à 50°C pendant 10minutes jusqu'à ce que la tranche de gel soit complètement dissoute. Le contenu du tube est ensuite homogénéisé grâce au *vortex* toutes les 2 à 3minutes. Jusqu'à dissolution totale des tranches de gel montrant une coloration jaune. Un volume d'isopropanol a été ajouté à chaque échantillon et le tout a été homogénéisé. Une colonne de centrifugation *QIAquick* étiqueté identique à celles des tubes est introduite dans un tube collecteur fourni de 2mL. Les échantillons y ont été introduits dans le but de lier l'ADNc, suivi d'une centrifugation pendant 1minute. Le fluide contenu dans le tube collecteur a été versé et la colonne réintroduit dans le même tube collecteur. Pour des volumes d'échantillons avec une charge supérieure à 800µL, ils ont été essorés et appliqués à nouveau dans le vide. Puisque les échantillons étaient destinés au séquençage, 500µL de tampon QG ont encore été ajoutés à la colonne et centrifuger pendant 1minute.

L'éluât contenu dans le collecteur a été vidé et 750µL de tampon PE ont été ajouté suivi d'une centrifugation pendant 1minute. Chaque colonne a été placée dans un nouveau tube d'Eppendorf 1,5mL et 30µL dH₂O (*Sigma water*) ont été ajoutés au centre de la matrice de chaque colonne. Après une incubation 1minute à température ambiante (pour décoller l'ADNc de la membrane), l'éluat a été faite par centrifugation pendant 1minute, les amplicons ont été conservé

à -20°C. Toutes les étapes de centrifugation ont été effectuées à 13000tr/min dans une centrifugeuse réfrigérante de table classique de marque (Labnet International, Inc.).

II.6.2. Clonage du gène *UGT Afun004354*

Le clonage est un ensemble de méthodes qui sont utilisées pour insérer un ADN recombinant dans un vecteur (porteur de molécules d'ADN), qui va répliquer de façon identique les fragments d'ADN recombinant dans un organisme hôtes.

II.6.2.1. Préparation des cellules chimio-compétentes

Les cellules bactériennes ont été striées sur une plaque LB agar avec ou sans antibiotiques en fonction de ce qui est recherché. Les cellules ont été mises dans un incubateur à 37°C toute la nuit (18h) dans le but de les laisser croître. Par la suite, 5 colonies ont été introduites chacune dans des tubes contenant 5mL du milieu LB (plus une sélection d'antibiotiques). Les cellules ont poussé à 37°C sous agitation à 225tr/min. La pré-culture a été diluée à OD600 = 0,5, puis 1mL de culture a été ajouté à 50mL de LB. Les cellules vont croître à 37°C (225tr/min) jusqu'à ce que la OD600 = 0,4 pendant environ 2 à 3heures. Les cellules ont été ensuite transférées dans les flacons tubes de 50mL et placée sur la glace pendant environ 20minutes, puis centrifugées à 4°C pendant 10minutes à 5000tr/min.

Pour le reste de la procédure, les cellules ont été transportées sur la glace et remises en suspension dans une chambre froide. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 25mL de CaCl₂ 50mM froid, suivi d'une incubation sur la glace pendant 20minutes. Les cellules ont été centrifugées pendant 10minutes à 5000tr/min à 4°C. Puis le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension par pipetage dans un tube 1,5mL. Enfin, 50µL de cellules sont transférés dans les tubes Eppendorf de 1,5mL placés sur la glace. Puis stocker à -80°C, pour des analyses ultérieures. Tout au long du processus, les cellules ont été traitées avec précaution. Aucun tourbillon ou pipetage en excès n'a été effectué, en particulier lorsque les cellules ont été remises en suspension dans CaCl₂ afin éviter la lyse des cellules qui aurait diminuée la quantité de cellules compétentes.

II.6.2.2. Ligation de l'insert dans le vecteur *PJET 1.2*

Après purification des amplicons et préparation des cellules compétentes, 5µL de tampon de réaction ont été introduit dans un tube à Eppendorf 1,5mL, ainsi que 5µL d'amplicons purs. 0,5µL de vecteur "*Blunt PJET 1.2*", dans lequel un amplicon va s'insérer pour le clonage, a ensuite été

ajouté. Ce vecteur contient un gène d'enzyme de restriction mortelle qui est perturbé par la liaison d'un *insert* dans le site de clonage. La conséquence ici est le fait que seules les cellules bactériennes contenant des plasmides recombinants seront capables de former des colonies sur le milieu de culture. Puis 0,5µL de "*T4 ligase*" a été ajouté permettant ainsi l'insertion de l'amplicon dans le vecteur. "L'ADN *T4 ligase*" catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyle juxtaposées entre l'amplicon et le vecteur. Il joint également des fragments d'ADN avec les extrémités terminales cohésives ou francs, mais n'a aucune activité sur les acides nucléiques simples brins. Enfin, les échantillons sont mélangés par un *vortex*, puis incubés à température ambiante pendant 30minutes dans le but de solidifier la liaison.

II.6.2.3. Transformation dans la cellule bactérienne (E. Coli)

De la solution de ligature obtenue dans la précédente étape, 5µL ont été prélevés et introduit dans 50µL des cellules "*DH5α*", puis incubés sur la glace pendant 30minutes. Une fois l'incubation terminée, les échantillons ont été exposés à un choc thermique pendant 45secondes à 42°C, ce qui va permettre d'exercer une pression sur les cellules bactériennes et ainsi conduire à la rupture des parois afin de permettre au vecteur de traverser la paroi bactérienne et de s'insérer dans la bactérie. La cellule "*DH5α*" est la souche "*E. coli*" la plus fréquemment utilisée pour les applications de clonages de routine, elle permet aussi d'augmenter la stabilité et la qualité de l'ADN plasmique obtenu à partir de Miniprep (*QIAGEN*). 300µL de solution "*SOC media*" a été ajouté et laissé à température ambiante, puis incubé à 37°C pendant 1heure dans un incubateur agitant dans le but de laisser croître les bactéries. Le "*SOC media*" a été utilisé dans l'étape finale de la transformation des cellules bactériennes pour obtenir une transformation maximale "d'*E. coli*". Sur le milieu "LB+AMP", 100mL de la solution obtenue est prélevée etensemencée puis incubé à 37°C toute la nuit (18h). Le matin les colonies sont vérifiées dans le but de connaître celles qui ont poussé. Ensuite quelques-unes d'entre elles ont été choisies et mélangées à 15µL dH₂O (*Sigma Water*) dans des tubes PCR avec pour objectif de diluer et de vérifier qu'elles contiennent l'*insert* d'intérêt au travers d'une PCR.

II.6.3. Selection des colonies positives

Après 18h incubation, les colonies individuelles (5 colonies par milieu sur boîte de Petri) ont été sélectionnées et diluer avec 15µL dH₂O (*Sigma Water*) dans des tubes PCR individuellement.

Pour la préparation du mélange, 1,5µL de tampon A 10x a été introduit dans le tube Eppendorf 1,5mL, dans le but de mettre les enzymes de restrictions dans les conditions de réactions optimales. Puis 0,75µL de chlorure de magnésium (MgCl₂) 25mM a été ajouté dans le but d'optimiser la concentration en ion Mg²⁺ lors de la PCR. Ensuite 0,12µL de dNTPs 25mM qui a pour but d'ajouter les nucléotides sur le fragment d'ADN et 0,4µL une paire d'amorces PJET750 sens : CCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAA et antisens : TCCTGTCTCAGTTTCCTGAAGCTTGCTC à 10mM. L'enzyme "*Kapa Taq*" polymérase (Qiagen) qui a pour rôle d'améliorer la spécificité, la sensibilité et le rendement de la solution a été ajouté à un volume de 0,12µL, enfin 10,71µL dH₂O (*Sigma Water*) y ont été introduits. Cette amplification se déroule comme la PCR normale décrite plus haut, juste les conditions qui changent : une dénaturation initiale de 3minutes à 95°C, suivie de 25cycles d'amplification (dénaturation : 30secondes à 94°C, hybridation : 30secondes à 60°C, extension : 2,5minutes à 72°C) et d'une extension finale de 5minutes à 72°C. Dans le but d'augmenter la quantité d'ADN produits

Le tout dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% à 120volts pendant 30minutes. Les bandes du gène (1500bp) d'intérêt ont été purifiées pour séquençage.

II.6.4. Purification des clones par Miniprep et Sequencage

II.6.4.1. Purification des clones par Miniprep (QIAGEN KIT)

Les clones portant l'ADN recombinant ont été sélectionnés pour purification. A cet effet 5µL de chaque solution ont été introduites dans un tube contenant 50mL du milieu LB. Le mélange a été introduit dans un incubateur agitateur toute la nuit afin de laisser croître. Le lendemain matin, 5mL des solutions positives (solution ayant montré une croissance de cellule) ont été prélevées et introduites dans des tubes. Puis centrifugés à 8000tr/min pendant 3minutes à température ambiante. Ensuite les cellules bactériennes contenues dans le culot ont été remises en suspension dans 250µL de tampon P1, la solution RNase A a été ajoutée, homogénéisée et le tout a été transféré dans un tube à centrifuger. 250µL de tampon P2 y a été ajouté et mélangé en inversant le tube 4 à 6 fois jusqu'à obtention d'une solution claire (Si vous utilisez le réactif LyseBlue, la solution deviendra bleue, ne laissez pas la réaction de lyse se poursuivre pendant plus de 5minutes). Le tampon N3 a été ajouté à un volume de 350µL et mélangé immédiatement et soigneusement en

inversant le tube 4 à 6 fois (la solution devient incolore si c'est le réactif LyseBlue). Il s'en suit une centrifugation pendant 10 minutes à 13000tr/min dans une micro-centrifugeuse de table. Le surnageant obtenu précédemment a été prélevé et introduite dans une colonne de centrifugation *QIAprep 2.0*, puis centrifugé pendant 30-60 secondes à 13000tr/min et l'éluât ayant traversé la membrane a été éliminé. La colonne a été ensuite lavée en ajoutant 0,75mL de tampon PE préalablement préparé par ajout de l'éthanol à 70°. Ensuite une centrifugation pendant 30-60 secondes à 13000tr/min et l'éluât ayant traversé la membrane a été éliminée. La colonne de centrifugation *QIAprep 2.0* a été transférée dans le tube de collecte et centrifugé à nouveau pendant 1 minute à 13000tr/min pour éliminer le tampon de lavage résiduel. Puis la colonne a été placée dans un tube Eppendorf 1,5mL pour éluer l'ADNc. Au centre de la colonne, 30µL d'eau stérile moléculaire ont été ajoutés puis laissés reposer pendant 1 minute à température ambiante et enfin centrifuger pendant 1 minute à 13000tr/min, avec pour le but d'augmenter la concentration d'ADNc purifié. L'ADNc pure ainsi obtenu a été dilué à une concentration finale d'environ 100ng/µL pour séquençage.

II.6.3.2. Séquençage

C'est un processus qui consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des acides nucléotidiques pour un fragment d'ADN données. Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de Maxam-Gilbert (Etats Unis) et de Frederick Sanger (Grande-Bretagne) ont été décrites en 1977 (Lamoril et al. 2008). Pour ce travail, les échantillons ont été envoyés en Allemagne à une compagnie de biologie moléculaire : « Microsynth Seqlab GmbH » pour être séquencés.

II.6.5. Analyse de la diversité génétique

Après obtention des séquences, l'analyse de la diversité génétique a été réalisé au travers des logiciels suivants : DnaSP v5.10.01 pour obtenir les données sur le nombre de sites polymorphes ou variables (s), les indices de diversité haplotypique (h et dh) et nucléotidique (π), le nombre moyen de différences nucléotidiques par séquence (k), les paramètres Tajima (D) ;Fu et Li (D*) (Kern and Begun 2005) et F (Ezawa, Landan, and Graur 2013) ; MEGA-X v7.0.21 pour la construction l'arbre phylogénétique (Kumar, Stecher, and Tamura 2016) et TCS v1.21 et tcsBU pour la construction du réseau haplotique (Clement, Posada, and Crandall 2000; Santos et al. 2015).

II.6.6. Recherche des potentiels marqueurs de résistance de *UGT AFUN004354*

Une fois les séquences obtenues, plusieurs analyses ont été faites dans le but de visualiser, de corriger manuellement les séquences après une vérification du chromatogramme lorsque nécessaire par le logiciel *BioEdit* v7.2.5. L'alignement des séquences utilisant l'outil *ClustalW Multiple Alignment* intégré dans *BioEdit* v 7.2.5.0 a été fait (Thompson, Higgins, and Gibson 1994). La recherche du polymorphisme dans *Dnasp6.0*, ainsi que dans *BioEdit* v 7.2.5.0 et la traduction des acides nucléiques en protéines dans *BioEdit* v 7.2.5.0 ont été réalisés pour détecter la présence de mutation dans le gène *UGT Afun004354* ou toutes autres mutations potentiellement responsables de la résistance aux Pyréthriinoïdes chez les moustiques du genre *An. funestus* s.s l'un des vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun.

II.7. Exploitation et analyses des données

II.7.1. Test de sensibilité aux Pyréthriinoïdes

Les valeurs du taux de mortalité qui correspondent à la proportion de moustiques morts au bout de 24 heures après exposition à l'insecticide ont été calculées à l'aide du tableur Excel 2007 suivant la formule ci après et associée à une erreur standard.

$$\text{Taux de mortalité observée} = \frac{\text{nombre de moustiques morts}}{\text{nombre total de moustiques exposés}} \times 100$$

II.7.2. Analyse comparative du niveau d'expression des gènes *UGT Afun004354* et *Afun011266* chez *An.funestus*

L'analyse du niveau d'expression des gènes candidats et leurs potentiels rôles dans la résistance aux Pyréthriinoïdes a été réalisée grâce au logiciel *MxPro-MX3005P* (Agilent®). Pour cela nous avons mis en évidence le taux d'expression de certains gènes candidats de résistance chez *An. funestus* collectés dans la région de Mibellon et ceux du laboratoire (Fang et Fumoz). Le niveau de signification a été évalué en fonction de la valeur de P (0,05).

II.7.3. Etude de la diversité génétique du gène *UGT Afun004354* chez les moustiques du genre *An. funestus*

II.7.3.1. Analyse des paramètres de la variabilité génétique.

Il s'agissait ici de déterminer la diversité génétique du gène *UGT Afun004354* chez *An. funestus s.s.* A cet effet, une analyse plus approfondie des différentes portions du gène séquencé a été effectuée en fonction des différents groupes d'échantillons. Pour chaque groupe, le nombre de sites polymorphes ou variables (s), les indices de diversité haplotypique (h et dh) et nucléotidique (π), le nombre moyen de différences nucléotidiques par séquence (k), les paramètres Tajima (D) ;Fu et Li (D*) (Kern and Begun 2005) et F (Ezawa, Landan, and Graur 2013) permettant d'estimer la variabilité génétique et la stabilité démographique de la population ont été calculés grâce au logiciel DnaSP v5.10.01 (Librado and Rozas 2009).

II.7.3.2. Analyse de la distribution phylogénétique et haplotypique

Les distances génétiques entre les haplotypes ont été estimées grâce au logiciel MEGA-X v7.0.21 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016). Ce logiciel a également servi à la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Cho 2012). Les intervalles de confiance des associations entre haplotypes ont été calculés en utilisant la méthode «bootstraps» avec 1000 répliques (O'Meara 2012). Les logiciels d'estimation des cladogrammes TCS v1.21 et tcsBU (Clement, Posada, and Crandall 2000; Santos et al. 2015) ont permis d'élaborer le réseau d'haplotypes.

II.7.4. Analyse du polymorphisme de *UGT Afun004354* chez *An. funestus s.s*

Une fois les séquences brutes obtenues, plusieurs analyses ont été faites dans le but de rechercher la sélection d'un allèle particulier. L'alignement des séquences utilisant l'outil *ClustalW Multiple Alignment* intégré dans BioEdit v 7.2.5.0 (Thompson, Higgins, and Gibson 1994), le polymorphisme dans Dnasp6.0 a été réalisé pour déterminer la présence de mutation dans le gène *UGT Afun004354* ou toutes autres mutations potentiellement responsables de la résistance aux Pyrèthrinoides chez *An. funestus s.s* l'un des vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun.

	CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
--	--	--

III.1. RESULTATS

III.1.1. Profil de sensibilité aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus s.s* à Mibellon

An. funestus s.s a été collecté à Mibellon et a montré une résistance aux pyréthriinoïdes de type I et II avec des taux de mortalité de $20,47 \pm 6,86\%$ et $19,44 \pm 2,78\%$ observé 24h après exposition respectivement pour la perméthrine 1x et la deltaméthrine 1x (Figure 9). Une forte résistance a également été observée aux pyréthriinoïdes de type I et II de concentrations élevées, avec des mortalités de $68,34 \pm 2,62\%$ et $83,41 \pm 4,25\%$ pour la perméthrine 5X et 10X, $53,68 \pm 8,22\%$ et $89,75 \pm 2,25\%$ pour la deltaméthrine 5X et 10X (Figure 9).

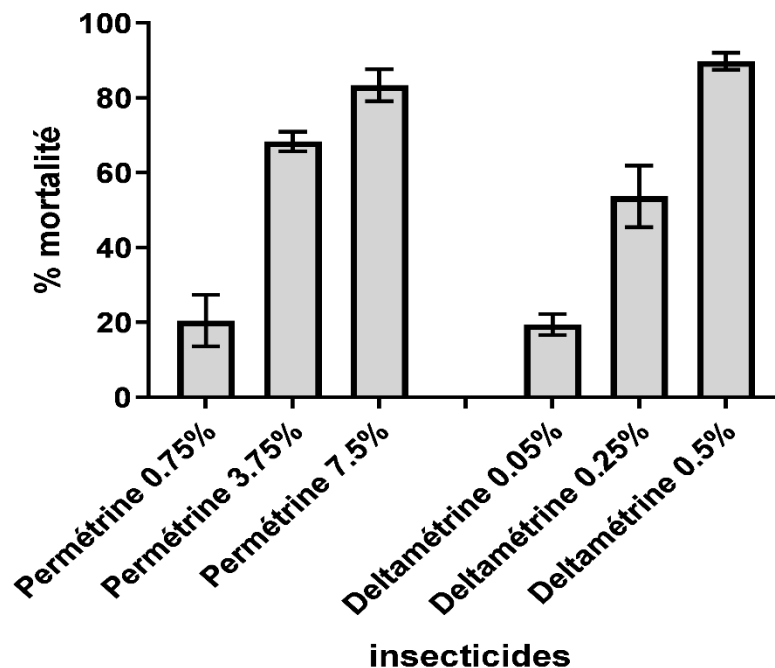


Figure 9 : Profil de sensibilité des pyréthriinoïdes chez *Anophèles funestus s.s.* de Mibellon.

Légende : les différentes hauteurs du diagramme à barres représentent les taux de mortalité des moustiques exposés à différentes concentrations de Permétrine et Deltamétrine et les représentations graphiques observées au-dessus des hauteurs du diagramme indiquent l'erreur ou l'incertitude dans les mesures présentées.

III.1.2. Identification moléculaire des espèces chez *An. funestus* à Mibellon

L'identification moléculaire pour la confirmation de l'espèce a porté sur 110 échantillons d'*An. funestus s.l.* Tous les échantillons ont été amplifiés avec succès et les résultats ont montré qu'il s'agissait de 110 *An. funestus s.s* dont 100% (Figure 10).

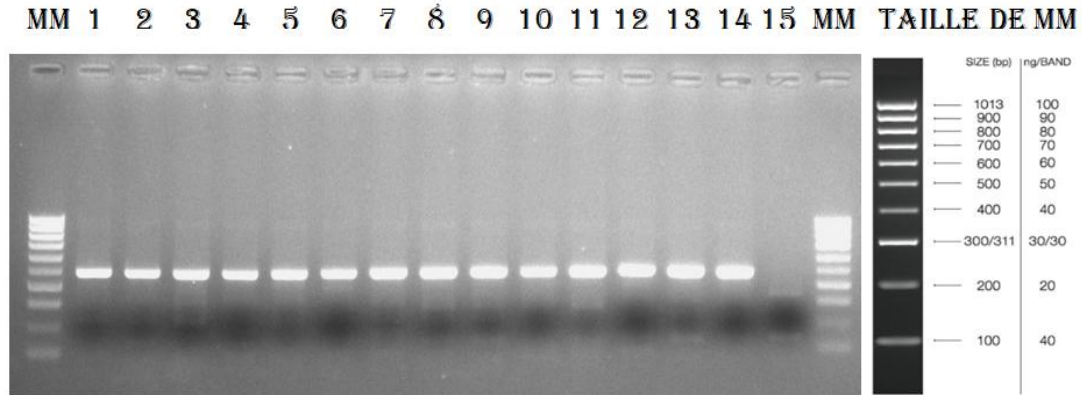


Figure 10 : Electrophorogramme montrant l'identification moléculaire chez *An. funestus*

Légende : MM : Marqueur de poids moléculaire (Ladder IV) ; de 1 à 13 échantillons testés avec une bande observée autour de 500 paires de base ; échantillon 14 est le contrôle positif avec une bande observée autour de 500 paires de base et le 15 est le contrôle négatif.

III.1.3. Niveau d'expression des *UGTs AFUN011266* et *AFUN004354*

L'analyse du gène *Afun004354* de la famille des UDP glycosyl transférases a montré qu'il est surexprimé chez les moustiques résistants aux Pyréthroïdes ; chez les groupes : control, Deltaméthrine vivant, Perméthrine vivant et Fumoz nous avons obtenu un taux de retranscription respectif de $4,83 \pm 0,93$; $5,79 \pm 4,87$; $10,39 \pm 0,26$ et $23,21 \pm 0,65$ (figure 11). Il a été aussi observé que ce gène a le taux de retranscription élevé chez Fumoz, suivie des moustiques résistants à Perméthrine par rapport au control donc la P-value est de 0.09 traduisant une induction de ce gène chez les moustiques de terrain. Tandis que le gène *Afun011266* a des taux de retranscription presque inexistante chez tous les groupes testés.

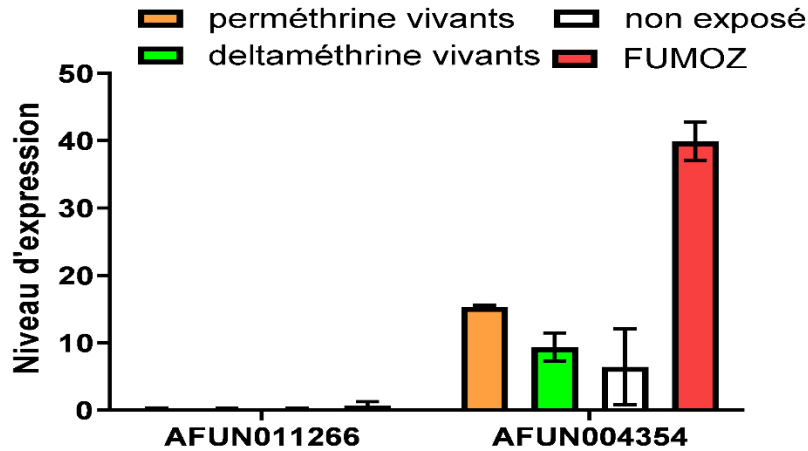


Figure 11 : Résultats de la PCR quantitative montrant les gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes.

Légende : les différentes hauteurs du diagramme à barres représentent les taux de retranscription des 2 gènes UDP glycosyl transférases testées chez différents groupes de moustiques et donc le numéro d'accèsion ou d'ordre est *Afun011266* et *Afun004354*. Et les représentations graphiques observées au-dessus des hauteurs du diagramme indiquent l'erreur ou l'incertitude dans les mesures présentées.

III.1.4. Diversité génétique d'*UGT AFUN004354* et potentiels marqueurs de résistance aux Pyréthrinoïdes chez *An. funestus s.s*

III.1.4.1. Amplification de *UGT Afun004354* chez *An. funestus s.s*

Pour cette amplification, une paire d'amorces sens et antisens a été utilisée. L'amplification a été faite pour chaque échantillon selon différents groupes à savoir : Permétrine vivants, Deltamétrine vivants, souches de laboratoire Fumoz et Fang. La présence d'une bande à 1587 pb montre que l'amplification du gène *Afun004354* était réussie, car c'est à cette taille qu'on s'attendait à voir les bandes d'amplification (Figure 12).

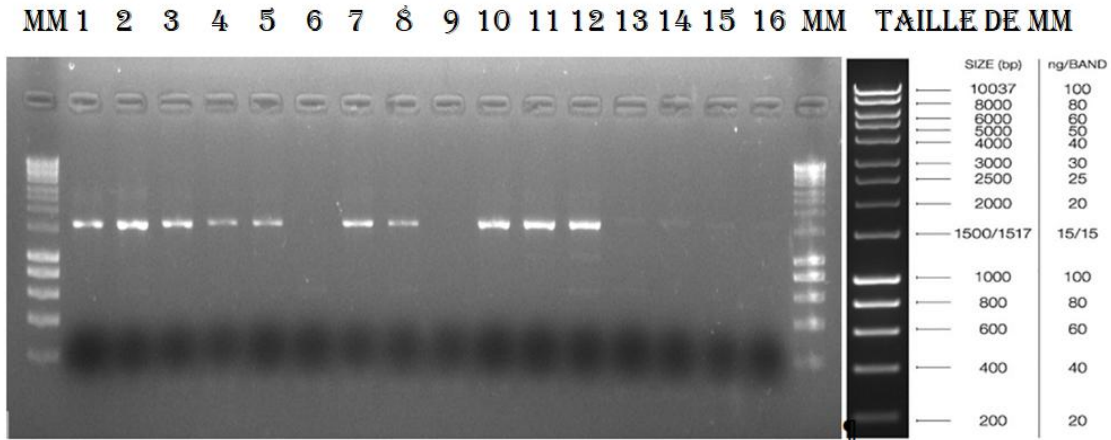


Figure 12 : Electrophorégramme d'amplification représentant la présence du gène Afun004354

Légende : MM : Marqueur de poids moléculaire (Ladder I) ; de 1 à 15 échantillons testés avec une bande observée au-dessus de 1500 paires de base et l'échantillon 16 est le contrôle négatif.

III.1.4.2. Sélection des plasmides possédant les *UGT AFUN004354*

Les produits de PCR qui sont obtenus par purification de l'ADN extrait du gel avaient des concentrations comprises 8,8 et 47,4ng/μL avec la majorité ayant une valeur supérieure à 20ng/μL, ces derniers sont insérés et liés dans le vecteur *PJET1.2*. Après clonage et PCR des colonies grattées à 10 colonies des différents groupes à savoir : Permétrine vivants, Deltamétrine vivants, souches de laboratoire Fumoz et Fang, les colonies possédantes le gène d'intérêt (1587pb) dans le vecteur (750pb) ont eu une taille d'environ 2400pb, celles qui n'avaient pas insérer le gène d'intérêt n'ont pas amplifiées (figure 13).

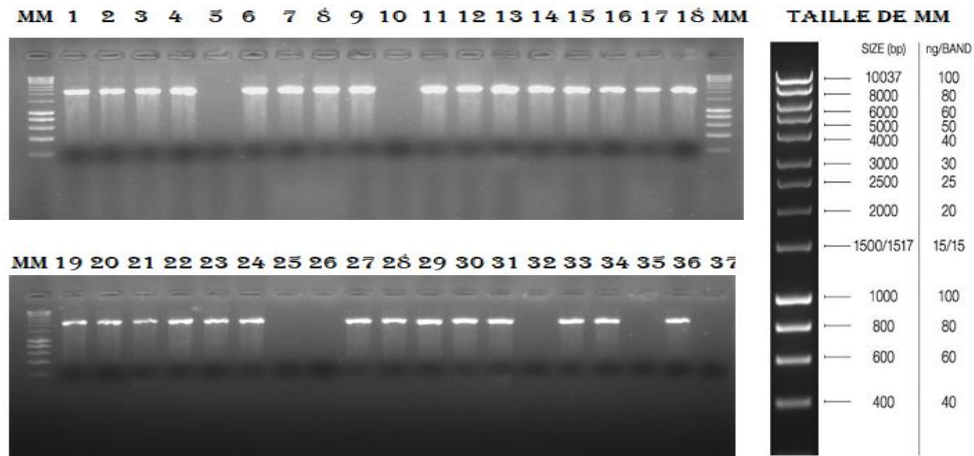


Figure 13 : Electrophorégramme montrant les produits d'amplification du gène d'intérêt après clonage.

Légende : MM : Marqueur de poids moléculaire (Ladder I) ; de 1 à 36 échantillons testés avec une bande observée chez certains autour de 2500 paires de base et l'échantillon 37 est le contrôle négatif.

III.1.4.3. Diversité génétique du gène *UGT Afun004354*

➤ Diversité nucléotidique

Sur 60 bonnes séquences obtenues, il a été dénombré au total 47 sites mutationnels (**s**) dans le gène. La diversité nucléotidique (π) est faible chez les souches de Laboratoire que chez celle du terrain. Globalement, le nombre de mutations qui entraînent un changement fonctionnel (**NSyn**) dans les séquences d'acides aminés produites s'est avéré presque identique aux changements de type non-fonctionnel (**Syn**) dans le gène, qui étaient non significatifs. Selon les résultats de **Syn** et de **NSyn** dans les groupes étudiés, nous constatons une grande diversité de ce gène. Le tableau 2 ci-après représente les éléments de la diversité génétique des séquences du gène *Afun004354* chez *An. funestus* s.s. en fonction du profil de résistance aux pyréthroïdes.

Pour les tests **D** de Tajima et **D*** de Fu et Li dans la majorité des cas, les valeurs obtenues étaient négatives, ceci suggère une expansion démographique ou une augmentation des variantes haplotypiques dans la population d'étude, également un excès de mutations à faible fréquence (mutation récentes). Par ailleurs, la valeur positive de **D** et **D*** chez la souche de laboratoire Fang indique un excès de mutation à fréquence intermédiaire. Toutefois, les valeurs de **D** et de **D*** obtenues étaient statistiquement non significatives, ce qui laisse supposer que les changements observés sur ce gène peuvent être dus au hasard. Le rapport **Ka/ks**, nous montre des valeurs inférieures à 1, traduisant une sélection purificatrice ou stabilisatrice (agissant contre les changements).

Tableau 1 : paramètres génétiques de l'UDP Glycosyl transférase dans les populations étudiées

Fragment complet séquencé (1497bp)												
Echantillons	n	S	h	Hd	Syn	Nsyn	π	D	D*	Ka	ks	Ka/ks
FANG	10	7	7	0.911	4	3	0.00211	1.50834	1.38219 *	0.00104	0.00575	0.181
FUMOZ	11	6	5	0.709	2	4	0.00085	-1.35867	-1.61683	0.00080	0.00100	0.8
Mibellon control non-exposé	12	20	12	1	10	10	0.00305	-1.18684	-1.23973	0.00196	0.00671	0.292
Mibellon deltaméthrine exposé	13	20	12	0.987	10	10	0.00385	-0.22724	-0.22630	0.00219	0.00944	0.271
Mibellon perméthrine exposé	13	17	10	0.949	9	8	0.00278	-0.82333	-0.78899	0.00172	0.00635	0.271
Total	60	47	45	0.984	na	na	0.00332	-1.65810	-1.66470			

Légende : N = nombre d'espèce séquencée ; S = nombre de sites de polymorphisme ; h = nombre d'haplotypes ; dh = diversité haplotypique ; Syn = mutations synonymes ; Nsyn = mutations non synonymes ; π = diversité nucléotidique ; D et D* = Statistiques Tajima et Fu et Li ; ns = non significiant ; π , ka and ks sont multipliés par 10^2 , * = P < 0.05; * = P < 0.02

➤ Arbre de vraisemblance génétique

L'analyse de l'arbre phylogénétique entre les différents haplotypes identifié n'a révélé aucun groupement particulier associé à un phénotype mais plutôt une grande diversité de ce gène. Un *Bootstrap Consensus* des séquences a été fait, en considérant les valeurs supérieures à 50, mais aucune différence significative n'a été observée entre les séquences (Figure 15). Cependant le schéma montre qu'il n'y a pas de regroupement spécifique en fonction des clades, ils ne sont pas regroupés entre famille donc il n'existe aucune différence significative. Par ailleurs les espèces Fang et Fumoz sont groupés séparément, l'espèce Fang se retrouve avec certaines souches control non exposées du terrain tandis que l'espèce Fumoz se regroupe en majorité entre elle et avec certaines souches résistantes du terrain (Deltaméthrine, Permethrine). Quant aux souches de terrain (Permethrine, Deltaméthrine et control non-exposé), elles sont très dispersées.

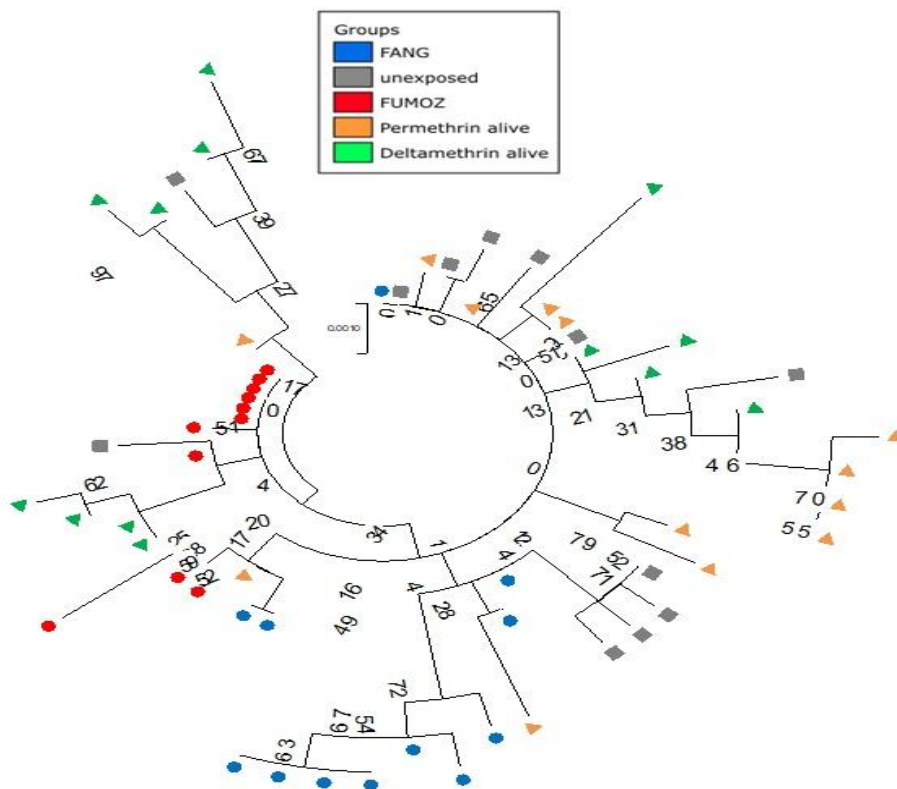


Figure 14 : Arbre phylogénétique des haplotypes d'*An. funestus* s.s. construit à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance.

➤ Diversité haplotypique

L'analyse des réseaux d'haplotypes du gène *Afun004354* en fonction de leurs profils de résistance montre que ce gène possède 45 haplotypes (**h**) avec une diversité haplotypique (**dh**) de 0,984. Le nombre d'haplotype (**h**) est faible et pratiquement pareil chez les souches de laboratoire à savoir 7 et 5 (Fang et Fumoz) tant dis qu'il est élevé chez les souches de terrain respectivement 10 et 12. Il existe un haplotype majeur observé chez Fumoz et Fang avec un haplotype partagé et des singletons révélant une diversité réduite dans les colonies de laboratoire. Les moustiques ayant survécus à la Deltaméthrine sont plus diversifiés que les autres. Par ailleurs, aucun haplotype majeur n'a été observé dans les souches exposées (deltaméthrine et perméthrine) et non exposées (control), ce qui montre qu'aucun haplotype n'est sélectionné (Figure 16).

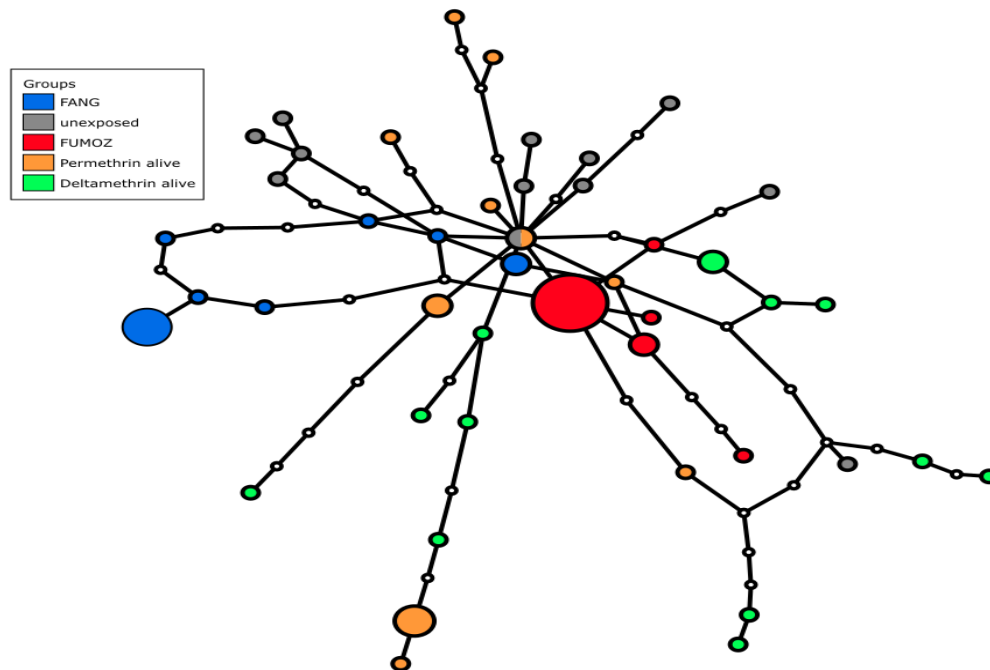


Figure 15 : Réseau d'haplotypes du gène *Afun004354* chez *An. funestus* s.s. à Mibellon

III.1.4.4. Potentiels marqueurs de la résistance aux pyréthrinoïdes

L'analyse de la traduction d'acides nucléiques montre plusieurs mutations d'acides aminés. Toutefois, ces changements bien que nombreux et non particulier à un groupe ne semblent pas être sélectionnés et associés à la résistance aux pyréthrinoïdes (Tableau 2).

Tableau 2 : Changement des Acides aminés observé dans le gène Afun004354

	1	4	6	9	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	5
Position polymorphe	2	3	8	0	2	8	2	8	2	0	8	9	0	1	4	6	0
AFUN004354CDS	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Fang R1-1	M	F	L	Q	E	Q	I	L	I	I	V	K	F	E	A	H	V
Af4354Fang R2-5	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	K	A	H	V
Af4354Fang R3-1	M	F	L	Q	E	Q	I	L	I	I	V	K	F	E	A	H	V
Af4354Fang R3-5	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Fumoz R1-1	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Fumoz R1-2	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	K	F	E	A	H	V
Af4354Fumoz R1-3	M	L	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Fumoz R2-4	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	M
Af4354Fumoz R3-4	M	F	H	Q	E	Q	M	L	I	I	V	E	F	K	A	H	V
Af4354Mib-Ctrl R1-1	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Ctrl R1-5	L	F	H	L	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Ctrl R2-5	M	L	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	K	T	H	V
Af4354Mib-Ctrl R3-4	M	F	H	Q	E	H	I	L	I	I	V	K	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Delta R1-2	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Delta R2-1	M	L	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	K	A	H	V
Af4354Mib-Delta R2-2	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	Q	V
Af4354Mib-Delta R2-3	M	L	H	Q	E	Q	I	L	V	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Perm R1-1	M	F	H	Q	E	Q	I	L	V	I	V	K	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Perm R1-3	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Perm R1-5	M	F	H	Q	K	Q	I	L	I	I	V	E	F	E	A	H	V
Af4354Mib-Perm R2-2	M	F	H	Q	E	Q	I	L	I	I	V	E	F	K	A	H	V

Légende : en lettre les différents acides aminés après traduction d'un codon : M : Méthionine ; F : Phénylalanine ; H : Histidine ; Q : Glutamine ; E : Acide glutamine ; I : Isoleucine ; L : Leucine ; V : Valine ; A : Alanine ; K : Lysine ; T : Thréonine.

En jaune l'A.A est identique au codon référentiel et en bleu, l'A.A muté.

III.2. DISCUSSION

La présente étude dans la localité de Mibellon, Cameroun a eu pour but de caractériser les gènes UDP-Glycosyl transférase chez *Anopheles funestus* s.s, un vecteur principal du paludisme et leur potentielle implication dans la résistance aux pyréthrinoïdes au Cameroun. De toutes les espèces du groupe *An. funestus* décrites dans la littérature, seule *An. funestus* s.s. a été présente dans ce site d'étude. Ces espèces sont bien connues de la faune anophélienne du Cameroun. Leur présence avait déjà été rapportée au cours des travaux antérieurs (Antonio-nkondjio et al. 2006; Cohuet et al. 2004). Ce résultat démontre une fois de plus que cette espèce a une vaste distribution géographique en zone de savane et également au Cameroun où elle est considérée comme vecteur majeur du paludisme (Cohuet et al. 2004). Toutefois l'on ne peut exclure la présence d'autres espèces du groupe *An. funestus* dans cette localité du fait que la collecte a été effectuée en saison sèche qui est une saison favorable au développement de ce dernier, néanmoins quelques spécimens d'*An. gambiae* ont également été retrouvés dans cette localité ce qui est en accord avec des études antérieures (Menze et al. 2018b). En effet, la limitation du nombre de site sélectionnés et le type de collecte à savoir collecte intra-domiciliaire pourraient avoir empêché la détection des espèces exophiles du groupe et probablement d'autres espèces (M Coetzee and Fontenille 2004; Morgan et al. 2010). Ceci pourrait expliquer le nombre élevé d'*An. funestus* s.s. capturé dans cette étude.

Dans le cadre de la mise au point des stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme au Cameroun, qui constitue une préoccupation majeure en santé publique. La résistance aux insecticides constitue un aspect majeur, préoccupant et très développé (Antonio-Nkondjio et al. 2015; Josiane Etang et al. 2007; Menze et al. 2018b; 2016) car elle est une réelle menace des succès et stratégies mises en place dans la prévention contre le paludisme. N'ayant pas utilisé les synergies et les cônes tests par manque d'un nombre considérable de moustiques. Cette étude, avec des taux de mortalité à $83,41 \pm 4,25$ % pour perméthrine 10X et $89,75 \pm 2,25$ % pour Deltaméthrine 10X, a prouvé un niveau élevé de résistance aux Pyréthrinoïdes tels qu'il est décrit dans les régions palustres, ce dernier étant la principale insecticide recommandée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (Menze et al. 2016; WHO 2021). Ce qui nous interpelle à prendre de nouvelles mesures et stratégies (moustiquaires de nouvelles générations) et d'investiguer sur les différents mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides pour lutter contre la super résistance aux insecticides et le paludisme dans cette localité du Cameroun.

Cette population d'*An. funestus* a été résistante et fortement résistante aux Pyréthriinoïdes (de type I : Perméthrine et de type II : Deltaméthrine) dans l'Adamaoua du Cameroun ce qui corrobore avec les études de Menze et collaborateurs en 2018 et d'autres études faites dans d'autres localités du pays et d'Afrique. (Menze *et al.*, 2018a ; Ndo *et al.*, 2018 ; Tchouakui *et al.*, 2021), prouvant ainsi que l'extension de la résistance et de la forte résistance aux Pyréthriinoïdes au Cameroun et en Afrique. L'on pourrait avoir comme hypothèse que la résistance et son extension soit lié à une forte pression de sélection due à l'utilisation des moustiquaires imprégnées et/ ou alors à l'utilisation abusive et non contrôlée des insecticides domestiques par les habitants (Myamba *et al.* 2002; Trape *et al.* 2011; Vulule *et al.* 1994) d'où la nécessité d'alterner les classes d'insecticides lors de leur application en lutte antivectorielle. L'on peut aussi prétendre que l'agriculture effectuée dans cette région avec une forte utilisation des pesticides par les acteurs de ce domaine. Ces pesticides qui ont le plus souvent les mêmes cibles que les insecticides utilisés en santé publique pourraient contribuer à la sélection de gène contribuant à la résistance chez ces vecteurs (Chouaïbou *et al.* 2008; Dabiré *et al.* 2009; Yadouleton *et al.* 2011).

Des études transcriptomiques précédentes utilisant des micro-réseaux et RNA-Seq avaient identifié certaines UDP Glycosyl Transférases qui étaient surexprimées chez les moustiques survivants aux insecticides. Il a été démontré que UGT *AFUN011266* était surexprimée chez les moustiques résistants au DDT sur le terrain avec un taux de retranscription supérieur à 1,5 (Kouamo *et al.* 2021) mais notre étude a montré que ce gène n'était pas surexprimé, ni chez les moustiques résistants du terrain (Mibellon, Cameroun) ni chez la souche résistante du laboratoire (Fumoz). UGT *AFUN004354* qui a été précédemment identifiée parmi les autres gènes de détoxification surexprimés chez Fumoz avec un taux de retranscription de 2,1 par RNA-Seq (Wondji *et al.* 2022) a été trouvé régulé à la hausse chez les moustiques de terrain (Mibellon, Cameroun) et la souche résistante du laboratoire (Fumoz), montrant des résultats similaires entre RT-qPCR et les résultats RNA-Seq. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les facteurs qui conduisent à la surexpression de ce gène, qui pourrait être soit des éléments cis- ou trans-régulateurs pour démontrer l'implication des UDP Glycosyl transférases dans la résistance aux Pyréthriinoïdes (Mugenzi *et al.* 2019), soit à son implication dans la résistance aux Pyréthriinoïdes (Xiuxia Li *et al.* 2017). Des tests *in vitro* utilisant l'expression hétérologue et *in vivo* utilisant l'interférence ARN ou des mouches transgéniques pourraient également être utilisés pour valider

fonctionnellement le rôle de cette UDP Glycosyl Transférase dans la résistance aux pyréthriinoïdes. Il sera aussi meilleur de bien étudier tous les gènes UDP-Glycosyl transférases.

Le gène *AFUN004354* est hautement polymorphe, avec 47 sites polymorphes et 45 haplotypes. Ce niveau de polymorphisme dépasse largement celui précédemment rapporté pour les gènes P450 et GSTs (*CYP6P9a*, *CYP6P9b* et *GSTe2*) chez *An. funestus* (Mugenzi et al. 2019; Riveron, Yunta, et al. 2014). Le polymorphisme élevé d'UGT *AFUN004354* est similaire à celui rapporté chez *An. funestus* pour le gène *CYP6M7* (Riveron, Ibrahim, et al. 2014) et chez *An. gambiae* pour le gène *APL1* qui est associé aux réponses immunitaires contre *Plasmodium falciparum* (Rottschaefer et al. 2011).

Aucun allèle *AFUN004354* particulier ne semble être le plus associé à la résistance aux pyréthriinoïdes pour la perméthrine et la deltaméthrine, contrairement à l'identification d'allèles de résistance prédominants d'autres gènes de détoxification comme *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (Mugenzi et al. 2019), ce qui suggère qu'aucun balayage sélectif n'agit sur ce gène. Des travaux complémentaires sur la voie de régulation des UDP Glycosyl Transférases permettront de mieux comprendre pourquoi ce gène n'a pas subi le même balayage sélectif que d'autres gènes de détoxification tels que *CYP6P9a* ; *CYP6P9b* et GSTs. L'absence de sélection directionnelle sur *AFUN004354* pourrait également s'expliquer par un rôle fonctionnel plus généraliste de ce gène, en particulier s'il pouvait protéger le moustique contre une large gamme de substances étrangères telles que les toxines végétales (allélochimiques) ou même s'il était impliqué dans des fonctions de détoxification ou autres que la détoxification (formation des cuticules). D'autres études sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

	<p>CONCLUSION PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS</p>	
--	--	--

Au terme de cette étude dont l'objectif était de caractériser les gènes UDP-Glycosyl transférase chez *Anopheles funestus* s.s, un vecteur principal du paludisme et leur implication potentielle dans la résistance aux pyréthriinoïdes au Cameroun, il en ressort que :

- l'espèce prédominante a été *An. funestus* dans la localité de Mibellon pendant cette période d'étude, et l'on a observé une forte résistance aux pyréthriinoïdes utilisés en santé publique ;
- une surexpression d'un gène UDP Glycosyl Transférase présent dans cette population a été détectée à l'instar de *Afun004354* bien que son implication probable dans la résistance aux pyréthriinoïdes et aussi autres insecticides demeure à prouver ;
- ce gène étant présent dans cette localité, fait l'objet d'une forte diversité génétique observée et aucun allèle ne semble être associé à une résistance.

Dans nos travaux futurs nous nous proposons d'étendre cette étude à d'autres localités du Cameroun et d'Afrique ; de valider la possible implication du gène UGT *Afun004354* dans la résistance métabolique aux pyréthriinoïdes.

Par ailleurs, nous recommandons aux populations l'usage généralisé et quotidien de moustiquaires qui limitent la transmission du paludisme.

- Aux chercheurs, nous recommandons de surveiller l'évolution de la transmission du paludisme ; d'informer les cultivateurs du bienfondé d'une agriculture sans pesticides chimiques, d'approfondir des recherches sur les méthodes de lutte biologique dans le but de pallier au développement de la résistance chez les vecteurs et d'investiguer les nouveaux mécanismes de résistance chez les vecteurs du paludisme, qui peuvent être à l'origine de la super-résistance observée.
- Aux pouvoirs publics, nous recommandons d'intégrer dans les programmes de lutte antivectorielle, la distribution des moustiquaires de seconde génération (qui contiennent en plus de l'insecticide, des inhibiteurs d'enzymes de détoxification) et d'envisager les pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides (PID) à effet rémanent ainsi que des pulvérisations spatiales à base des insecticides de nouvelle génération. Également une éducation des populations sur le bon usage des moustiquaires pendant leur sommeil est conseillée.

REFERENCES

- Abagli, Az, Tbc Alavo, and J Brodeur. 2014. "Microorganismes entomopathogènes, prédateurs et parasites des moustiques: Perspectives pour la lutte raisonnée contre les vecteurs du paludisme en Afrique sub-saharienne." *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8 (1): 340. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i1.29>.
- Anofel. 2014. "Polycopié National de Parasitologie et de Mycologie 2014." Paris : UMVF Edition, 411p.
- Antinori, Spinello, Laura Galimberti, Laura Milazzo, and Mario Corbellino. 2012. "BIOLOGY OF HUMAN MALARIA PLASMODIA INCLUDING PLASMODIUM KNOWLESI." *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4 (1): e2012013. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2012.013>.
- Antonio-nkondjio, Christophe, Clément Hinzoumbe Kerah, Frédéric Simard, Parfait Awono-ambene, Mohamadou Chouaibou, Timoléon Tchuinkam, and Didier Fontenille. 2006. "Complexity of the Malaria Vectorial System in Cameroon: Contribution of Secondary Vectors to Malaria Transmission." *Journal of Medical Entomology* 43 (6): 1215–21. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.6.1215>.
- Antonio-Nkondjio, Christophe, Billy Tene Fossog, Edmond Kopya, Yacouba Poumachu, Benjamin Menze Djantio, Cyrille Ndo, Timoléon Tchuinkam, Parfait Awono-Ambene, and Charles S Wondji. 2015. "Rapid Evolution of Pyrethroid Resistance Prevalence in Anopheles Gambiae Populations from the Cities of Douala and Yaoundé (Cameroon)." *Malaria Journal* 14 (April): 155. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0675-6>.
- Awono-ambene, H. P., P. Kengne, F. Simard, C. Antonio-Nkondjio, and D. Fontenille. 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 (4): 561–68. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.561>.
- Barrón, Maite G., Christophe Paupy, Nil Rahola, Ousman Akone-Ella, Marc F. Ngangue, Theodel A. Wilson-Bahun, Marco Pombi, et al. 2019. "A New Species in the Major Malaria Vector Complex Sheds Light on Reticulated Species Evolution." *Scientific Reports* 9 (1): 14753. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49065-5>.
- Bawin, T., F. Seye, S. Boukraa, J.-Y. Zimmer, F. Delvigne, and F. Francis. 2015. "La lutte contre les moustiques (Diptera: Culicidae): diversité des approches et application du contrôle biologique." *The Canadian Entomologist* 147 (4): 476–500. <https://doi.org/10.4039/tce.2014.56>.
- Bonning, B. C., J. Hemingway, R. Romi, and G. Majori. 1991. "Interaction of Insecticide Resistance Genes in Field Populations of *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in Response to Changing Insecticide Selection Pressure." *Bulletin of Entomological Research* 81 (1): 5–10. <https://doi.org/10.1017/S0007485300053177>.
- Bronner, Ulf, Paul CS Divis, Anna Färnert, and Balbir Singh. 2009. "Swedish Traveller with Plasmodium Knowlesi Malaria after Visiting Malaysian Borneo." *Malaria Journal* 8 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-15>.
- BROOKE, B. D., R. H. HUNT, T. S. MATAMBO, L. L. KOEKEMOER, P. VAN WYK, and M. COETZEE. 2006. "Dieldrin Resistance in the Malaria Vector Anopheles Gambiae in Ghana." *Medical and Veterinary Entomology* 20 (3): 294–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00639.x>.
- Brooke, B.D., G. Kloke, R.H. Hunt, L.L. Koekemoer, E.A. Tem, M.E. Taylor, G. Small, J. Hemingway, and M. Coetzee. 2001. "Bioassay and Biochemical Analyses of Insecticide

- Resistance in Southern African *Anopheles Funestus* (Diptera: Culicidae).” *Bulletin of Entomological Research* 91 (4): 265–72. <https://doi.org/10.1079/BER2001108>.
- Bull, Don L., and Chandler J. Whitten. 1972. “Factors Influencing Organophosphorus Insecticide Resistance in Tobacco Budworms.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20 (3): 561–64. <https://doi.org/10.1021/jf60181a061>.
- Carnevale, Pierre, Vincent Robert, Sylvie Manguin, Vincent Corbel, Didier Fontenille, Claire Garros, Christophe Rogier, and J. Roux. 2009. *Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*.
- Cho, Anna. 2012. “Constructing Phylogenetic Trees Using Maximum Likelihood,” 58.
- Chouaïbou, M., J. Etang, T. Brévault, P. Nwane, C. K. Hinzoumbé, R. Mimpfoundi, and F. Simard. 2008. “Dynamics of Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* s.l. from an Area of Extensive Cotton Cultivation in Northern Cameroon: Dynamics of Insecticide Resistance.” *Tropical Medicine & International Health* 13 (4): 476–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02025.x>.
- Christian, Lengeler, Cattani Jacqueline, and de Savigny Don. 1997. *Un Mur Contre La Malaria : Du Nouveau Dans La Prévention Des Décès Dus Au Paludisme*.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. “TCS: A Computer Program to Estimate Gene Genealogies,” October, 3. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>.
- Coetzee, M, and D Fontenille. 2004. “Advances in the Study of *Anopheles Funestus*, a Major Vector of Malaria in Africa.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (7): 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.012>.
- Coetzee, Maureen. 2020. “Key to the Females of Afrotropical *Anopheles* Mosquitoes (Diptera: Culicidae).” *Malaria Journal* 19 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3144-9>.
- Coetzee, Maureen, Richard Hunt, Richard Wilkerson, Alessandra della Torre, Mamadou Coulibaly, and Nora Besansky. 2013. “*Anopheles Coluzzii* and *Anopheles Amharicus*, New Members of the *Anopheles Gambiae* Complex.” *Zootaxa* 3619 (February): 246–74. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3619.3.2>.
- Cohuet, Anna, Frederic Simard, Charles S. Wondji, Christophe Antonio-Nkondjio, Parfait Awono-Ambene, and Didier Fontenille. 2004. “High Malaria Transmission Intensity Due to *Anopheles Funestus* (Diptera: Culicidae) in a Village of Savannah–Forest Transition Area in Cameroon.” *Journal of Medical Entomology* 41 (5): 901–5. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.901>.
- Commune de Bankim. 2015. “Plan communal de developpement (pcd) de la commune de bankim.”
- Cuamba, Nelson, John C. Morgan, Helen Irving, Andrew Steven, and Charles S. Wondji. 2010. “High Level of Pyrethroid Resistance in an *Anopheles Funestus* Population of the Chokwe District in Mozambique.” *PLOS ONE* 5 (6): e11010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011010>.
- Dabiré, K.R., A. Diabaté, M. Namountougou, K.H. Toé, A. Ouari, P. Kengne, C. Bass, and T. Baldet. 2009. “Distribution of Pyrethroid and DDT Resistance and the L1014F Kdr Mutation in *Anopheles Gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa).” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103 (11): 1113–20. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.01.008>.
- Davies, T. G. E., L. M. Field, P. N. R. Usherwood, and M. S. Williamson. 2007. “DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels.” *IUBMB Life* 59 (3): 151–62. <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>.

- Djogbénou, Luc, Pierrick Labbé, Fabrice Chandre, Nicole Pasteur, and Mylène Weill. 2009. "Ace-1 Duplication in *Anopheles Gambiae*: A Challenge for Malaria Control." *Malaria Journal* 8 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-70>.
- Djouaka, Rousseau F, Adekunle A Bakare, Ousmane N Coulibaly, Martin C Akogbeto, Hilary Ranson, Janet Hemingway, and Clare Strode. 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): 538. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-538>.
- Du, W., T. S. Awolola, P. Howell, L. L. Koekemoer, B. D. Brooke, M. Q. Benedict, M. Coetzee, and L. Zheng. 2005. "Independent Mutations in the Rdl Locus Confer Dieldrin Resistance to *Anopheles Gambiae* and *An. Arabiensis*." *Insect Molecular Biology* 14 (2): 179–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00544.x>.
- Enayati, A. A., H. Ranson, and J. Hemingway. 2005. "Insect Glutathione Transferases and Insecticide Resistance." *Insect Molecular Biology* 14 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>.
- Enayati, A., and J. Hemingway. 2010. "Malaria Management: Past, Present, and Future." *Annual Review of Entomology* 55 (1): 569–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085423>.
- Etang, Josiane, Arthur Mbida Mbida, Patrick Ntonga Akono, Jerome Binyang, Carole Else Eboumbou Moukoko, Leopold Gustave Lehman, Parfait Awono-Ambene, et al. 2016. "Anopheles Coluzzii Larval Habitat and Insecticide Resistance in the Island Area of Manoka, Cameroon." *BMC Infectious Diseases* 16 (1): 217. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1542-y>.
- Ezawa, Kiyoshi, Giddy Landan, and Dan Graur. 2013. "Detecting Negative Selection on Recurrent Mutations Using Gene Genealogy." *BMC Genetics* 14 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-37>.
- Fontenille, Didier, and Frédéric Simard. 2004. "Unravelling Complexities in Human Malaria Transmission Dynamics in Africa through a Comprehensive Knowledge of Vector Populations." *Advances on Some Vector-Borne Diseases* 27 (5): 357–75. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.005>.
- Fontenille, Didier, S Wanji, and H.P. Awono-Ambene. 2000. "Anopheles Hancocki, Vector Secondaire Du Paludisme Au Cameroun." *Bulletin de Liaison et de Documentation - OCEAC*, 23–26.
- Guillet, P, R N'Guessan, and F Darriet. 2001. "Combined Pyrethroid and Carbamate 'two-in-One' Treated Mosquito Nets: Field Efficacy against Pyrethroid-Resistant *Anopheles Gambiae* and *Culex Quinquefasciatus*." *Medical and Veterinary Entomology*, 8.
- Hargreaves, K., L. L. Koekemoer, B. D. Brooke, R. H. Hunt, J. Mthembu, and M. Coetzee. 2000. "Anopheles Funestus Resistant to Pyrethroid Insecticides in South Africa." *Medical and Veterinary Entomology* 14 (2): 181–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00234.x>.
- Hay, Simon I, Carlos A Guerra, Peter W Gething, Anand P Patil, Andrew J Tatem, Abdisalan M Noor, Caroline W Kabaria, et al. 2009. "A World Malaria Map: Plasmodium Falciparum Endemicity in 2007." *PLOS Medicine* 6 (3): e1000048. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000048>.

- Hemingway, Janet, Nicola J Hawkes, Lynn McCarroll, and Hilary Ranson. 2004. "The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes." *Molecular and Population Biology of Mosquitoes* 34 (7): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.
- Hemingway, Janet, and Hilary Ranson. 2000. "Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease." *Annual Reviews Entomology* 45: 371–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>.
- Hosie, A.M, S.D Buckingham, J.K Presnail, and D.B Sattelle. 2001. "Alternative Splicing of a Drosophila GABA Receptor Subunit Gene Identifies Determinants of Agonist Potency." *Neuroscience* 102 (3): 709–14. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00483-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00483-8).
- Ibrahim, Sulaiman S., Miranda Ndula, Jacob M. Riveron, Helen Irving, and Charles S. Wondji. 2016. "The P450 CYP 6Z1 Confers Carbamate/Pyrethroid Cross-resistance in a Major African Malaria Vector beside a Novel Carbamate-insensitive N485I Acetylcholinesterase-1 Mutation." *Molecular Ecology* 25 (14): 3436–52. <https://doi.org/10.1111/mec.13673>.
- Irving, Helen, and Charles S. Wondji. 2017. "Investigating Knockdown Resistance (Kdr) Mechanism against Pyrethroids/DDT in the Malaria Vector Anopheles Funestus across Africa." *BMC Genetics* 18 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0539-x>.
- Josiane Etang, Lucien Manga, Jean-Claude Toto, Pierre Guillet, Etienne Fondjo, and Fabrice Chandre. 2007. "Spectrum of Metabolic-Based Resistance to DDT and Pyrethroids in Anopheles Gambiae s.l. Populations from Cameroon." *Journal of Vector Ecology* 32 (1): 123–33. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2007\)32\[123:SOMRTD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2007)32[123:SOMRTD]2.0.CO;2).
- Kern, Andrew D., and David J. Begun. 2005. "Patterns of Polymorphism and Divergence from Noncoding Sequences of Drosophila Melanogaster and D. Simulans: Evidence for Nonequilibrium Processes." *Molecular Biology and Evolution* 22 (1): 51–62. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh269>.
- Koekemoer, LL, L Kamau, RH Hunt, and M Coetzee. 2002. "A Cocktail Polymerase Chain Reaction Assay to Identify Members of the Anopheles Funestus (Diptera: Culicidae) Group." *Am J Trop Med Hyg* 66 (6): 804–11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.804>.
- Kouamo, Mersimine F. M., Sulaiman S. Ibrahim, Jack Hearn, Jacob M. Riveron, Michael Kusimo, Magellan Tchouakui, Terence Ebai, et al. 2021. "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 (4): 561. <https://doi.org/10.3390/genes12040561>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Lamoril, J., N. Ameziane, J.-C. Deybach, P. Bouizegarène, and M. Bogard. 2008. "Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie." *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23 (5): 260–79. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016>.
- Lee, J.-Y., J. Colinas, J. Y. Wang, D. Mace, U. Ohler, and P. N. Benfey. 2006. "Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Transcription Factor Expression in Arabidopsis Roots." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (15): 6055–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510607103>.
- Lee, Sehan, and Mace G. Barron. 2016. "A Mechanism-Based 3D-QSAR Approach for Classification and Prediction of Acetylcholinesterase Inhibitory Potency of Organophosphate and Carbamate Analogs." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 30 (4): 347–63. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9910-7>.

- Li, Xianchun, Mary A. Schuler, and May R. Berenbaum. 2007. "Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics." *Annual Review of Entomology* 52 (1): 231–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>.
- Li, Xiuxia, Bin Zhu, Xiwu Gao, and Pei Liang. 2017. "Over-Expression of UDP-Glycosyltransferase Gene *UGT2B17* Is Involved in Chlorantraniliprole Resistance in *Plutella Xylostella* (L.): *UGT2B17* Gene and Chlorantraniliprole Resistance." *Pest Management Science* 73 (7): 1402–9. <https://doi.org/10.1002/ps.4469>.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. "DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data." *Bioinformatics* 25 (11): 1451–52. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Lofgren, CS, DA Dame, SG Breeland, DE Weidhaas, G Jeffery, R Kaiser, HR Ford, MD Boston, and KF Baldwin. 1974. "Release of Chemosterilized Males for the Control of Anopheles Albimanus in El Salvador. 3. Field Methods and Population Control." *Am J Trop Med Hyg* 23 (2): 288–97. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1974.23.288>.
- Loughlin, Samantha O'. 2020. "The Expanding Anopheles Gambiae Species Complex. Pathogens and Global Health." *Pathogens and Global Health* 114 (1): 1–1. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1722434>.
- Low, Van Lun, Chee Dhang Chen, Han Lim Lee, Tiong Kai Tan, Chin Fong Chen, Cherng Shii Leong, Yvonne Ai Lian Lim, Phaik Eem Lim, Yusoff Norma-Rashid, and Mohd Sofian-Azirun. 2013. "Enzymatic Characterization of Insecticide Resistance Mechanisms in Field Populations of Malaysian *Culex Quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)." Edited by Mario Soberón. *PLoS ONE* 8 (11): e79928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079928>.
- Menze, Benjamin D., Jacob M. Riveron, Sulaiman S. Ibrahim, Helen Irving, Christophe Antonio-Nkondjio, Parfait H. Awono-Ambene, and Charles S. Wondji. 2016. "Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles Funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations." *PLOS ONE* 11 (10): e0163261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163261>.
- Menze, Benjamin D., Murielle J. Wondji, William Tchapgá, Micareme Tchoupo, Jacob M. Riveron, and Charles S. Wondji. 2018a. "Bionomics and Insecticides Resistance Profiling of Malaria Vectors at a Selected Site for Experimental Hut Trials in Central Cameroon." *Malaria Journal* 17 (1): 317. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2467-2>.
- . 2018b. "Bionomics and Insecticides Resistance Profiling of Malaria Vectors at a Selected Site for Experimental Hut Trials in Central Cameroon." *Malaria Journal* 17 (1): 317. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2467-2>.
- Molineaux, Louis, John Storey, Joel E. Cohen, and Anthony Thomas. 1980. "A Longitudinal Study of Human Malaria in the West African Savanna in the Absence of Control Measures: Relationships between Different Plasmodium Species, in Particular *P. Falciparum* and *P. Malariae*." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29 (5): 725–37. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.725>.
- Montella, Isabela Reis, Renata Schama, and Denise Valle. 2012. "The Classification of Esterases: An Important Gene Family Involved in Insecticide Resistance - A Review." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (4): 437–49. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>.
- Morgan, John C., Helen Irving, Loyce M. Okedi, Andrew Steven, and Charles S. Wondji. 2010. "Pyrethroid Resistance in an *Anopheles Funestus* Population from Uganda." Edited by Laurent Rénia. *PLoS ONE* 5 (7): e11872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011872>.

- Mouatcho, Joel, Anthony J. Cornel, Yael Dahan-Moss, Lizette L. Koekemoer, Maureen Coetzee, and Leo Braack. 2018. "Detection of Anopheles Rivulorum-like, a Member of the Anopheles Funestus Group, in South Africa." *Malaria Journal* 17 (1): 195. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2353-y>.
- Mouchet, Jean, and Pierre Carnevale. 1991. "Les vecteurs et la transmission. In Danis M. (ed.), Mouchet Jean (ed.) Paludisme." In , 34–59. Paris.
- Mouchet, Jean, Pierre Carnevale, Marc Coosemans, Julvez Jean, Sylvie Manguin, Dominique Richard-Lenoble, and Jacques Sircoulon. 2004. *Biodiversité Du Paludisme Dans Le Monde*. Éditions John Libbey Eurotext. Vol. 462. Paris.
- Mugenzi, Leon M. J., Benjamin D. Menze, Magellan Tchouakui, Murielle J. Wondji, Helen Irving, Micareme Tchoupo, Jack Hearn, Gareth D. Weedall, Jacob M. Riveron, and Charles S. Wondji. 2019. "Cis-Regulatory CYP6P9b P450 Variants Associated with Loss of Insecticide-Treated Bed Net Efficacy against Anopheles Funestus." *Nature Communications* 10 (1): 4652. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12686-5>.
- Mulamba, Charles, Jacob M. Riveron, Sulaiman S. Ibrahim, Helen Irving, Kayla G. Barnes, Louis G. Mukwaya, Josephine Birungi, and Charles S. Wondji. 2014. "Widespread Pyrethroid and DDT Resistance in the Major Malaria Vector Anopheles Funestus in East Africa Is Driven by Metabolic Resistance Mechanisms." *PLOS ONE* 9 (10): e110058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110058>.
- Myamba, J., C. A. Maxwell, A. Asidi, and C. F. Curtis. 2002. "Pyrethroid Resistance in Tropical Bedbugs, *Cimex Hemipterus* , Associated with Use of Treated Bednets: Pyrethroid Resistance in Tropical Bedbugs." *Medical and Veterinary Entomology* 16 (4): 448–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00389.x>.
- Ndo, Cyrille, Edmond Kopya, Marie Agathe Donbou, Flobert Njiokou, Parfait Awono-Ambene, and Charles Wondji. 2018. "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* 11 (1): 157. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2759-y>.
- O'Meara, Brian C. 2012. "Evolutionary Inferences from Phylogenies: A Review of Methods." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43 (1): 267–85. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160331>.
- Pierre Aubry, and Bernard-Alex Gaüzère. 2019. "Paludisme : actualités 2019." *Medecine Tropicale*, November, 28.
- Pietra, Y., P. Procacci, G. Sabatinelli, S. Kumlien, L. Lamizana, and G. Rotigliano. 1991. *Impact de l'utilisation Des Rideaux Imprégnés de Permethrine Sur Le Paludisme Dans Une Zone Rurale de Haute Transmission Au Burkina Faso*. *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*. 84, 375-385.
- PNLP. 2018. "Rapport d'activités du programme national de lutte contre le paludisme en 2017." ———. 2020. "La situation du paludisme au cameroun : morbidite et mortalite, Rapport annuel 2019."
- Pruss-Ustun, Annette, and Carlos Corvalan. 2007. "How Much Disease Burden Can Be Prevented by Environmental Interventions." *Epidemiology* 18 (1): 167–78. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000239647.26389.80>.
- Ranson, H., B. Jensen, X. Wang, L. Prapanthadara, J. Hemingway, and F. H. Collins. 2000. "Genetic Mapping of Two Loci Affecting DDT Resistance in the Malaria Vector

- Anopheles Gambiae.” *Insect Molecular Biology* 9 (5): 499–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00214.x>.
- Rauh, James J., Caleb W. Holyoke, Daniel A. Kleier, James K. Presnail, Eric A. Benner, Daniel Cordova, Michael H. Howard, et al. 1997. “Polycyclic Dinitriles: A Novel Class of Potent GABAergic Insecticides Provides a New Radioligand, [3H]BIDN.” *Invertebrate Neuroscience* 3 (2–3): 261–68. <https://doi.org/10.1007/BF02480383>.
- Rhodain, Francois, and C. Perez. 1985. *Precis d’entomologie Medicale et Veterinaire; Notions d’epidemiologie Des Maladies a Vecteurs*. Paris : Maloine.
- Riveron, Jacob M, Sulaiman S Ibrahim, Emmanuel Chanda, Themba Mzilahowa, Nelson Cuamba, Helen Irving, Kayla G Barnes, Miranda Ndula, and Charles S Wondji. 2014. “The Highly Polymorphic CYP6M7 Cytochrome P450 Gene Partners with the Directionally Selected CYP6P9a and CYP6P9b Genes to Expand the Pyrethroid Resistance Front in the Malaria Vector Anopheles Funestus in Africa.” *BMC Genomics* 15 (1): 817. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-817>.
- Riveron, Jacob M., Helen Irving, Miranda Ndula, Kayla G. Barnes, Sulaiman S. Ibrahim, Mark J. I. Paine, and Charles S. Wondji. 2013. “Directionally Selected Cytochrome P450 Alleles Are Driving the Spread of Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (1): 252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216705110>.
- Riveron, Jacob M, Cristina Yunta, Sulaiman S Ibrahim, Rousseau Djouaka, Helen Irving, Benjamin D Menze, Hanafy M Ismail, et al. 2014. “A Single Mutation in the GSTe2 Gene Allows Tracking of Metabolically Based Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector.” *Genome Biology* 15 (2): R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27>.
- Rottschaefter, Susan M., Michelle M. Riehle, Boubacar Coulibaly, Madjou Sacko, Oumou Niaré, Isabelle Morlais, Sekou F. Traoré, Kenneth D. Vernick, and Brian P. Lazzaro. 2011. “Exceptional Diversity, Maintenance of Polymorphism, and Recent Directional Selection on the APL1 Malaria Resistance Genes of Anopheles Gambiae.” Edited by David S. Schneider. *PLoS Biology* 9 (3): e1000600. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000600>.
- Rubert, A., L. Guillon-Grammatico, J. Chandénier, I. Dimier-Poisson, and G. Desoubieux. 2016. “Insecticide resistance in Anopheles mosquitoes : additional obstacles in the battle against malaria.” *Médecine et Santé Tropicales* 26 (4): 423–31. <https://doi.org/10.1684/mst.2016.0634>.
- S. Casimiro, M. Coleman, J. Hemingway, and B. Sharp. 2006. “Insecticide Resistance in Anopheles Arabiensis and Anopheles Gambiae from Mozambique.” *Journal of Medical Entomology* 43 (2): 276–82. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)043\[0276:IRIAAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)043[0276:IRIAAA]2.0.CO;2).
- Santos, Wlaldemir R., Walmir R. Santos, Pedro P. Paes, Isac A. Ferreira-Silva, André P. Santos, Natan Vercese, Dalmo R.L. Machado, et al. 2015. “Impact of Strength Training on Bone Mineral Density in Patients Infected With HIV Exhibiting Lipodystrophy.” *Journal of Strength and Conditioning Research* 29 (12): 3466–71. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001001>.
- Schleier III*, Jerome J., and Robert K. D. Peterson. 2011. “CHAPTER 3 Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides.” In *Green Trends in Insect Control*, 94–131. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849732901-00094>.
- Singh, Balbir, Lee Kim Sung, Asmad Matusop, Anand Radhakrishnan, Sunita SG Shamsul, Janet Cox-Singh, Alan Thomas, and David J Conway. 2004. “A Large Focus of Naturally

- Acquired Plasmodium Knowlesi Infections in Human Beings.” *The Lancet* 363 (9414): 1017–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4).
- Soreq, Hermona, and Shlomo Seidman. 2001. “Acetylcholinesterase — New Roles for an Old Actor.” *Nature Reviews Neuroscience* 2 (4): 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- Spillings, Belinda L, Basil D Brooke, Lizette L Koekemoer, John Chipwanya, Maureen Coetzee, and Richard H Hunt. 2009. “A New Species Concealed by Anopheles Funestus Giles, a Major Malaria Vector in Africa.” *Am J Trop Med Hyg* 81 (3): 510–15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.510>.
- Swierczynski, Giovanni, and Maria Gobbo. 2008. “Atlas of Human Malaria (Atlante Della Malaria Umana).” *Journal of Travel Medicine* 15 (March): 143–44. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2008.00196.x>.
- Tchouakui, Magellan, Leon M. J. Mugenzi, Benjamin D. Menze, Jude N. T. Khaukha, Williams Tchappa, Micareme Tchoupo, Murielle J. Wondji, and Charles S. Wondji. 2021. “Pyrethroid Resistance Aggravation in Ugandan Malaria Vectors Is Reducing Bednet Efficacy.” *Pathogens* 10 (4): 415. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040415>.
- Thompson, Julie D, Desmond G Higgins, and Toby J Gibson. 1994. “CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice” 22 (July): 8. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Torre, A. della, C. Fanello, M. Akogbeto, J. Dossou-yovo, G. Favia, V. Petrarca, and M. Coluzzi. 2001. “Molecular Evidence of Incipient Speciation within Anopheles Gambiae s.s. in West Africa.” *Insect Molecular Biology* 10 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2001.00235.x>.
- Townson, H, M B Nathan, M Zaim, P Guillet, L Manga, R Bos, and M Kindhauser. 2005. “Exploiting the Potential of Vector Control for Disease Prevention.” *Bulletin of the World Health Organization* 83 (12): 942–47.
- Trape, Jean-François, Adama Tall, Nafissatou Diagne, Ousmane Ndiath, Alioune B Ly, Joseph Faye, Fambaye Dieye-Ba, et al. 2011. “Malaria Morbidity and Pyrethroid Resistance after the Introduction of Insecticide-Treated Bednets and Artemisinin-Based Combination Therapies: A Longitudinal Study.” *The Lancet Infectious Diseases* 11 (12): 925–32. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70194-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70194-3).
- Vontas, J., E. Kioulos, N. Pavlidi, E. Morou, A. della Torre, and H. Ranson. 2012. “Insecticide Resistance in the Major Dengue Vectors Aedes Albopictus and Aedes Aegypti.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104 (2): 126–31. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>.
- Vulule, J. M., R. F. Beach, F. K. Atieli, J. M. Roberts, D. L. Mount, and R. W. Mwangi. 1994. “Reduced Susceptibility of Anopheles Gambiae to Permethrin Associated with the Use of Permethrin-Impregnated Bednets and Curtains in Kenya.” *Medical and Veterinary Entomology* 8 (1): 71–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00389.x>.
- Weill, Mylène, Olivier Duron, Pierryck Labbé, Arnaud Berthomieu, and Michel Raymond. 2003. “La résistance du moustique Culex pipiens aux insecticides.” *médecine/sciences* 19 (12): 1190–92. <https://doi.org/10.1051/medsci/200319121190>.
- WHO. 2009. “World Malaria Report 2009.” <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44234>.
- . 2016. “Test Procedure for Insecticides Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes.” 56.

- . 2017. *World Malaria Report 2017*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259492>.
- . 2018. “World Malaria Report 2018,” 210.
- . 2020. “World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress and Challenges,” 151.
- . 2021. *World Malaria Report 2021*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>.
- Wondji, Charles S., Michael Coleman, Immo Kleinschmidt, Themba Mzilahowa, Helen Irving, Miranda Ndula, Andrea Rehman, John Morgan, Kayla G. Barnes, and Janet Hemingway. 2012. “Impact of Pyrethroid Resistance on Operational Malaria Control in Malawi.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (47): 19063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217229109>.
- Wondji, Charles S., Roch K. Dabire, Zainab Tukur, Helen Irving, Rousseau Djouaka, and John C. Morgan. 2011. “Identification and Distribution of a GABA Receptor Mutation Conferring Dieldrin Resistance in the Malaria Vector *Anopheles Funestus* in Africa.” *Special Issue: Toxicology and Resistance* 41 (7): 484–91. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.03.012>.
- Wondji, Charles S, Jack Hearn, Helen Irving, Murielle J Wondji, and Gareth Weedall. 2022. “RNAseq-Based Gene Expression Profiling of the *Anopheles Funestus* Pyrethroid-Resistant Strain FUM0Z Highlights the Predominant Role of the Duplicated *CYP6P9a/b* Cytochrome P450s.” Edited by J Birchler. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 12 (1): jkab352. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab352>.
- Wondji, Charles S, Helen Irving, John Morgan, Neil F Lobo, Frank H Collins, Richard H Hunt, Maureen Coetzee, Janet Hemingway, and Hilary Ranson. 2009. “Two Duplicated P450 Genes Are Associated with Pyrethroid Resistance in *Anopheles Funestus*, a Major Malaria Vector.” *Genome Research* 19 (3): 452–59. <https://doi.org/10.1101/gr.087916.108>.
- Wood, O R, S Hanrahan, M Coetzee, L L Koekemoer, and B D Brooke. 2010. “Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*.” *Parasites & Vectors* 3 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>.
- Yadouleton, Anges, Thibaud Martin, Gil Padonou, Fabrice Chandre, Alex Asidi, Luc Djogbenou, Roch Dabiré, et al. 2011. “Cotton Pest Management Practices and the Selection of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Gambiae* Population in Northern Benin.” *Parasites & Vectors* 4 (1): 60. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-60>.
- Zhou, Yong, Wen-Bo Fu, Feng-Ling Si, Zhen-Tian Yan, Yu-Juan Zhang, Qi-Yi He, and Bin Chen. 2019. “UDP-Glycosyltransferase Genes and Their Association and Mutations Associated with Pyrethroid Resistance in *Anopheles Sinensis* (Diptera: Culicidae).” *Malaria Journal* 18 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2705-2>.

ANNEXES




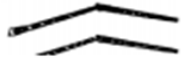

ANNEXE I :

CLES DES ANOPHELES VECTEURS MAJEURS AU CAMEROUN (adultes)













CARACTERES COMMUNS

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

CARACTERES DISTINCTIFS

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

AUTRES CRITERES BIOMETRIQUES

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

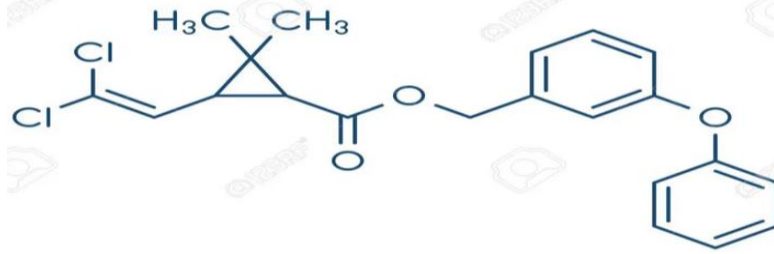
Source : Coetzee, M., 2020. Key to the females of Afrotropical Anopheles mosquitoes (Diptera: Culicidae). Malar. J. 19, 70. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3144-9>

ANNEXE II :

Préparation de la solution LB (*Luria Bertani*)

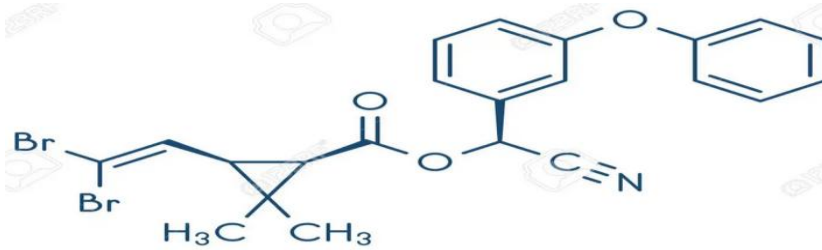
Pour préparer un volume de 500mL de la solution LB, 5g de tryptone ont été pesé et introduit dans un erlenmeyer : 2,5g d'extrait de levure, 5g de Chlorure de Sodium (NaCl), 7,05g d'Agar et 500µL d'ampicilline y ont été ajoutés. La solution a été mélangée et préparée dans un autoclave ainsi que tout le matériel nécessaire pour la préparation des cellules compétentes. C'est sur ce milieu de culture que les cellules vont croître sous forme de colonies.

ANNEXE III :



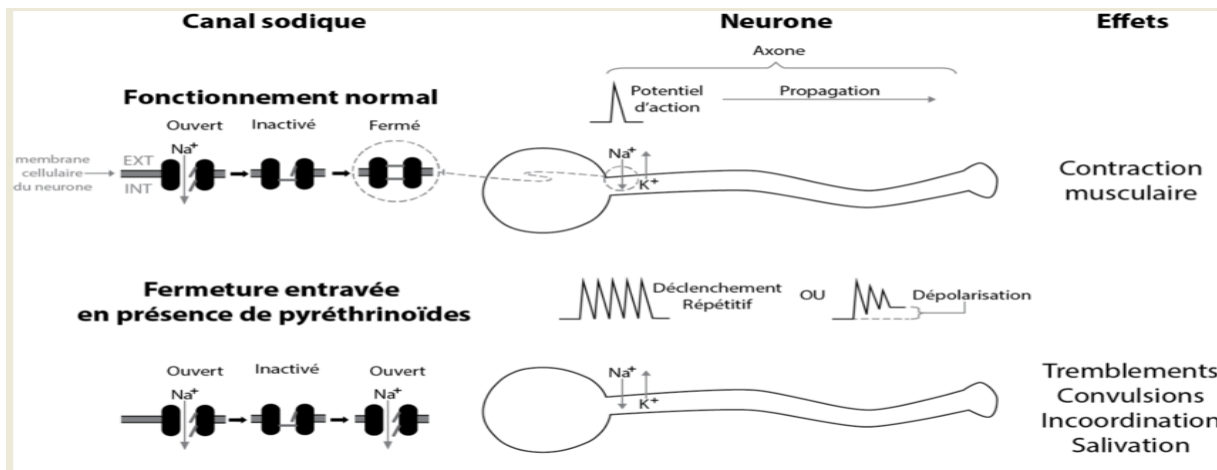
Molécule chimique d'insecticide de perméthrine

(Source : <https://fr.123rf.com/clipart-vecteurs/>)



Molécule chimique d'insecticide de deltaméthrine

(Source : <https://fr.123rf.com/clipart-vecteurs/>)



Mécanisme d'action de pyréthrinoïdes

(Source : ResearchGate, Mode d'action des pyréthrinoïdes sur les neurones. | Download

Scientific Diagram )

ANNEXE IV :

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

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

N° 2021/07/1379/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 28 juillet 2021

setcominae@yahoo.com

CLAIRANCE ETHIQUE

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

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'établir les bases moléculaires de la super-résistance aux insecticides et d'évaluer son influence des outils de lutte antivectorielle et la transmission du paludisme. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. Les notices d'information et les formulaires de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

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

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

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

Ampliations

- MINSANTE



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