

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix - Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

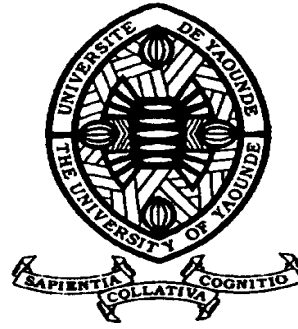
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET

PHYSIOLOGIE ANIMALES

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE

ET ECOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace - Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL

BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATORY OF
PARASITOLOGY AND ECOLOGY

Coût biologique de la résistane aux insecticides chez *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera: culicidae); un des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique,

Thèse de Doctorat Ph/D en Biologie des organismes animaux

Par : TCHOUAKUI Magellan

Master ès Sciences

Sous la direction de

NJIOKOU Flobert

Professeur Université de Yaoundé I

Année Académique : 2020





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

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de la **Thèse de Doctorat/Ph.D** en Biologie des Organismes Animaux (Option Physiologie Animale) de monsieur **TCHOUAKUI Magellan**, matricule 08Q0992, soutenance autorisée par la correspondance N° 20-727/VREPDTIC/DAAC/DEPE du Recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 29 Mai 2020, attestons que les corrections exigées au candidat lors de cette évaluation faite le 16 Juin 2020, ont réellement été effectuées et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle.

En foi de quoi cette attestation lui est délivrée pour servir et valoir de ce que de droit.

Yaoundé, le 14 07 2020

Président du Jury

Charles Félix Bilong
Professeur

Examineur


A. FODENY

Chef de Département



Charles Félix Bilong
Professeur

Enseignants permanents de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 03 Janvier 2020

ADMINISTRATION

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

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

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

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Inspecteur de service MINESUP</i>

21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste

4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/U YI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANT E</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste

28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

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

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NGOOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste

23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
26	GODSWILL NTSOMBAH NTSE-FONG	Assistant	En poste
27	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
23	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste

34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Departement UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Recto- rat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme & Diplomes</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Ser-

			vice/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebo- lowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste

11	WOAFO Paul	Professeur	En poste
----	------------	------------	----------

12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste

33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

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

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>

12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste

36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (05)	3 (2)	39 (16)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (13)
BPV	06 (0)	10 (02)	9 (04)	07 (01)	31 (9)
CI	10 (1)	10 (02)	12 (02)	03 (0)	35 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	03 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	10 (02)	26 (3)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (01)	30 (2)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	17 (5)
PHY	11 (0)	16 (01)	10 (03)	03 (0)	40 (4)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (04)	02 (0)	43(6)
Total	68 (4)	100 (27)	130 (29)	46 (10)	344 (70)

Soit un total de	344 (70) dont :
- Professeurs	68 (4)
- Maîtres de Conférences	100 (27)
- Chargés de Cours	131 (29)
- Assistants	46 (10)
 () = Nombre de Femmes	 45

Dédicace

A mes parents et aux familles TONGA et KEMADJOU pour tout le soutien indéfectible et leur contribution à mon éducation.

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont débuté à l'unité de recherche de *Liverpool school of Tropical Medicine* basée à l'OCEAC (Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale) à Yaoundé au Cameroun. Ces travaux ont été achevés au *Centre for Research in Infectious Diseases (CRID)* également à Yaoundé au Cameroun. Ce travail a bénéficié du soutien financier du projet *Wellcome Trust Senior Fellowship in Biomedical Sciences* (101893/13/Z) accordé au Pr Charles Sinclair WONDJI.

Avant de restituer les principaux résultats de ces travaux, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la bonne réalisation. Je pense particulièrement au/aux/à :

- **Pr Charles S. WONDJI** sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Il m'a accueilli chaleureusement dans son laboratoire et m'a accordé sa confiance et son soutien pour démarrer ces travaux de recherche sur le coût de la résistance aux insecticides chez les anophèles. Au début de cette aventure je n'étais qu'un novice dans le domaine de la biologie moléculaire et de l'entomologie médicale. Il m'a guidé pas à pas dans ce monde de la recherche, élargi mon champ de recherche sur les maladies à transmission vectorielle. Ce parcours fut très riche en expérience et je finis cette thèse avec un sentiment de satisfaction. J'ai beaucoup appris de lui car il a été un vrai mentor pour moi. Sa confiance placée à mon égard et ses multiples conseils ont été pour moi une véritable source de motivation et d'encouragement. Je suis ravi d'avoir pu effectuer ce travail à ses côtés et d'avoir bénéficié de ses potentialités scientifiques. Merci encore Professeur ;
- **Pr. Flobert NJIOKOU**, pour la confiance placée à mon égard depuis le cycle de master et pour m'avoir orienté vers l'unité de recherche de *Liverpool school of Tropical medicine* (LSTM) aujourd'hui devenue CRID. Sans lui, je n'aurais jamais découvert ce monde de la

recherche aussi passionnant. Merci aussi Professeur pour avoir assuré le suivi de ce travail ;

- Drs **Jacob Riveron MIRANDA** et **Michael KUSIMO** pour le suivi apporté tout au long de ce travail et leur contribution à la rédaction de plusieurs articles scientifiques ;
- Dr. **Hugues Clotaire NANA DJEUNGA**, pour m’avoir initié au domaine de la recherche scientifique. Ses multiples orientations et conseils et aussi bien l’amour du travail bien fait ont été d’un très grand atout pour la réalisation de ce travail ; Merci Hugues ;
- **tous les enseignants** du Département de Biologie et Physiologie Animales (BPA) de l’Université de Yaoundé 1 pour les enseignements reçus ;
- Drs **ELANGA N’DILLE Emmanuel Clément**, **Basile KAMGANG**, **Cyrille NDO Parfait AWONO-AMBENE**, **Antonio NKONDJIO**, **Billy TENE**, **Marcel SANDEU**, **Trésor MELACHIO**, **Huguette SIMO**, **Delya DJUICY**, pour les conseils et les orientations apportés tout au long de ce travail ;
- Mme **Murielle WONDJI**, avec qui j’ai réalisé ma première PCR. Merci Madame pour l’initiation aux techniques de biologie moléculaire ; pour les conseils et le soutien à mon égard ;
- techniciens de laboratoire **Williams TCHAPGA**, **Mi-carême TCHOUPPO**, **Térence EBAL**, **Etienne ONANA** et **Jean Claude TOTO** pour leur franche collaboration ;
- M. **Guy Bertrand TAPOKO** et Mme **Carine NGUEMENI** pour leur soutien et l’accompagnement pendant ces années de dur labeur ;
- Mr **Robert Daouda**, le “**pilote de route**” comme on l’appelle souvent, qui a toujours été disponible à me conduire sur le terrain pour la collecte d’échantillon à chaque fois qu’il y’avait besoin, merci Robert ;
- camarades de laboratoire **Lynda DJOUNKWA**, **Léon MUGENZI**, **Amen NAKEBANG**, **Benjamin MENZE DJANTIO**, **Daniel NGUETE**, **Mersimine KOUAMO**, **Ruth SAN-**

DEU, Aurélie YOUNGANG, Achille BINYANG, Arnel TEDJOU, Theodel WILSON-BAHUN, Yvan FOTSO, pour leur collaboration ;

- Je n'oublie pas les étudiants de master dont j'ai eu le plaisir d'accompagner les premiers Pas en entomologie, dans la rédaction des mémoires et d'articles scientifiques à savoir : **Ange TCHAKOUNTE, Tatiane ASSATSE MATAKAFO et Vanessa NGANNANG.**

Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

- Je pense profondément à ma petite sœur chérie **Mirabelle TCHAMBA** et mon petit frère **Jhovany TONGA**. Ce travail est aussi le vôtre.
- Je pense également à ma tendre moitié, **Rose Ghislaine BAMAYANGONA BAYOMO** pour son soutien, ses encouragements et son affection ; je la remercie chaleureusement pour cela. Sans oublier mes amis et compagnons de tous les jours à savoir : **Lanvin KEPNGOP, Jean Marc TSAGMO, Lionel Brice FEUFACK, Simen PIUS et Rodrigue TSAYEM**. Plus que des amis, vous êtes des frères pour moi.

Enfin, je témoigne ma gratitude envers ma famille entière, mes amis et tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'avancée de ce travail.

Sommaire

Enseignants permanents de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I	i
Dédicace.....	xxi
Remerciements.....	xxii
Sommaire.....	xxv
Liste des figures	xxviii
Liste des tableaux	xxxii
Liste des abréviations.....	xxxiv
Résumé.....	xxxvi
Abstract	xxxviii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME	4
I.1. EPIDEMIOLOGIE.....	5
I.1.1. Situation du paludisme dans le monde.....	5
I.1.2. Situation du paludisme au Cameroun	7
I.2. AGENT PATHOGENE DU PALUDISME.....	8
I.2.1. Systématique	8
I.2.2. Répartition géographique du genre <i>plasmodium</i>	9
I.2.3. Cycle biologique du plasmodium	11
I.2.4. Lutte contre les agents du paludisme	13
I.3. LES VECTEURS DU PALUDISME	16

I.3.1. Systématique	16
I.3.2. Biologie et cycle de développement des anophèles	17
I.3.3. Quelques vecteurs majeurs du paludisme	19
I.3.4. Lutte contre les vecteurs du paludisme	24
I.3.5. Résistance des vecteurs aux insecticides	31
I.3.6. Coût biologique de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme	42
I.4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉES À L'ETUDE DU PALUDISME	45
I.4.1. Extraction d'ADN.....	45
I.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>).....	46
I.4.3. Electrophorèse et révélation des produits d'amplification par PCR.....	50
I.4.4. Séquençage de l'ADN.....	51
CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES	52
II.1. CADRE GEOGRAPHIQUE	53
II.1.1. Site d'étude d'Obout.....	53
II.1.2. Site d'étude de Mibellon.....	54
II.1.3. Site d'étude de Tibati.....	55
II.2. MATERIEL ET METHODES.....	56
II.2.1. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique médiée par le glutathion S-transférase	56

II.2.2. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique médiée par les Cytochromes P450s.....	66
II.2.3. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique sur la compétence et la capacité vectorielle des femelles sauvages d' <i>Anopheles funestus</i>	70
II.2.4. Exploitations et analyses des données.....	73
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	78
III.1. RESULTATS	79
III.1.1. Coût biologique de la résistance métabolique médiée par le glutathion S-transférase.....	79
III.1.2. Coût biologique de la résistance métabolique médiée par le cytochrome P450	105
III.1.3. Impact de la résistance métabolique sur l'infection a <i>Plasmodium</i> spp chez <i>An. funestus</i> : cas du gène <i>GSTe2</i>	118
III.2. DISCUSSION.....	131
III.2.1. Résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme dans les sites étudiés ...	131
III.2.2. Impact de la résistance sur les traits de vie d' <i>Anopheles funestus</i>	135
III.2.3. Restauration de la sensibilité aux insecticides en absence de pression de sélection	143
III.2.4. Impact de la résistance métabolique sur la compétence et la capacité vectorielle des femelles sauvages d' <i>Anopheles funestus</i>	145
CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	154
ANNEXES	174

Liste des figures

Figure 1 : Pays endémiques au paludisme dans le monde en 2017.	5
Figure 2 : Évolution de l'incidence du paludisme dans le monde entre 2010 et 2017.	6
Figure 3 : Variation de l'incidence hospitalière du paludisme dans les dix régions du Cameroun	8
Figure 4 : Classification partielle des Plasmodiums d'après Bruce-Chwatt.	9
Figure 5 : Cycle biologique de développement du plasmodium.	13
Figure 6 : Cycle biologique des anophèles.	18
Figure 7 : Distribution des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique.	24
Figure 8 : Contribution de différentes interventions dans la lutte contre le paludisme de 2000 -2015.	25
Figure 9 : Répartition de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les principaux vecteurs du paludisme (complexe <i>An. gambiae</i> et groupe <i>An. funestus</i>) en Afrique de 2005 à 2019.	32
Figure 10 : Illustration des mécanismes physiologiques de résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme.	41
Figure 11 : Illustration des différentes étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).	47
Figure 12 : Principe du génotypage par TaqMan (a) et courbes sigmoïdes représentant l'amplification des échantillons d'ADN obtenues après une PCR quantitative (qPCR) (b).	50
Figure 13 : Localisation du site de collecte d'Obout.	54
Figure 14 : Localisation des sites de collecte de Mibellon et Tibati.	55
Figure 15 : Dispositif de collecte des moustiques adultes à l'intérieur des maisons.	57
Figure 16 : Procédure du test de sensibilité aux insecticides à l'aide des tubes de l'OMS. ...	59

Figure 17 : Déroulement du test d'efficacité des moustiquaires à l'aide des cônes en plastique.	61
Figure 18 : Nuage de points montrant l'infection à Plasmodium spp par la méthode TaqMan.	72
Figure 19 : Bandes révélées suite à la migration sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du gène ITS2 permettant d'identifier les espèces du groupe <i>An. funestus</i> s.l.	80
Figure 20 : Profil de résistance d' <i>An. funestus</i> s.s d'Obout après exposition aux tubes OMS (a) et tests en cône (b).	81
Figure 21 : Profil de sensibilité aux insecticides chez <i>An. funestus</i> de Mibellon	83
Figure 22 : Profil de susceptibilité aux insecticides chez <i>An. funestus</i> de Tibati.....	85
Figure 23 : Photographie obtenue après migration sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène GSTe2 en utilisant le nouveau test diagnostic (AS-PCR) permettant de révéler les génotypes à la mutation L119F.	88
Figure 24 : Distribution des génotypes aux locus L119F-GSTe2 et A296S-RDL chez les femelles sauvages collectés dans les trois sites d'étude.	89
Figure 25 : Diagrammes présentant l'influence de la mutation L119F au locus <i>GSTe2</i> sur la fécondité et la fertilité des femelles sauvages d' <i>Anopheles funestus</i> collectées à Mibellon.	92
Figure 26 : Répartition des génotypes au locus <i>GSTe2</i> à différents étapes de développement des stades immatures d' <i>Anopheles funestus</i>	94
Figure 27 : Effet de la mutation L119F-GSTe2 sur la longévité des adultes (G1) d' <i>An. funestus</i> en condition de laboratoire.....	96
Figure 28 : Diversité nucléotidique du gène <i>GSTe2</i> chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon en relation avec la longévité des moustiques adultes.....	99

Figure 29 : Diversité haplotypique et arbre phylogénétique du gène GSTe2 chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon en relation avec la longévité des moustiques.	101
Figure 30 : Diversité haplotypique et arbre phylogénétique du gène GSTe2 chez <i>Anopheles funestus</i> de Mibellon en relation de la longévité des moustiques (G1) et des allèles.	102
Figure 31 : Répartition des génotypes au locus L119F-GSTe2 entre les mâles accouplés, les mâles non accouplés et les femelles accouplées.	104
Figure 32 : Profil de susceptibilité aux insecticides chez les souches hybrides générées par le croisement entre la souche résistante (FUMOZ) et la souche sensible de référence (FANG).	105
Figure 33 : Histogramme présentant le niveau d'expression du gène <i>CYP6P9a</i> , les taux de mortalité après exposition aux insecticides et les résultats du génotypage du locus <i>CYP6P9a</i> permettant de valider l'implication de ce gène dans la résistance aux pyréthrinoïdes.....	107
Figure 34 : Association entre le gène <i>CYP6P9a</i> et la fécondité/fertilité des femelles d' <i>An. funestus</i>	110
Figure 35 : Distribution des génotypes du locus <i>CYP6P9a</i> à différents stade de développement des stades immatures d' <i>An. funestus</i>	112
Figure 36 : Influence de l'allèle <i>CYP6P9a_R</i> sur la longévité des adultes d' <i>An. funestus</i>	114
Figure 37 : Évaluation de la restauration de la sensibilité chez la souche hybride FANG / FUMOZ.....	116
Figure 38 : Portion d'individus <i>An. funestus</i> s.l. d'Obout (a) et Mibellon (b) infectée par <i>Plasmodium</i> spp en utilisant la méthode TaqMan.	118
Figure 39 : Photographie du gel obtenu après amplification par Nested-PCR sur les moustiques positifs à l'infection par <i>Plamodium</i> spp avec la méthode TaqMan.....	120

Figure 40 : Influence de la résistance métabolique (L119F-GSTe2) sur l'infection et la transmission du plasmodium au sein des populations naturelles d' <i>An. funestus</i>	122
Figure 41 : Influence de la mutation A296S-RDL sur l'infection par <i>Plasmodium</i> spp chez les femelles d' <i>An. funestus</i> d'Obout.	125
Figure 42 : Distribution des génotypes combinés (GSTe2/Rdl) en fonction du statut d'infection	126
Figure 43 : Réseau d'haplotypes et arbre phylogénétique du gène GSTe2 chez <i>Anopheles funestus</i> s.s. de Mibellon en relation avec l'infection à <i>Plasmodium</i> spp.....	129
Figure 44 : Réseau d'haplotypes et arbre phylogénétique du gène GSTe2 chez <i>Anopheles funestus</i> s.s. de Mibellon en fonction des allèles et du statut infecté ou non infecté par <i>Plasmodium</i> spp	130

Liste des tableaux

Tableau I : Position systématique du genre <i>Anopheles</i>	16
Tableau II : Séquences d'amorces utilisées pour révéler les génotypes au locus <i>GSTe2</i>	65
Tableau III : Composition du milieu réactionnel pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR.....	70
Tableau IV : Condition de PCR pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR.....	70
Tableau V : composition de la faune culicidienne capturée dans les différents sites d'étude par la technique d'aspiration électrique	79
Tableau VI : Niveau d'association entre les génotypes L119F-GSTe2 et la capacité des femelles à pondre des œufs	91
Tableau VII : Niveau d'association entre les génotypes au locus L119F-GSTe2 et la formation des pupes	95
Tableau VIII : Niveau d'association entre les génotypes au locus L119F-GSTe2 et la longévité des adultes sauvages d' <i>An. funestus</i> maintenus au laboratoire	97
Tableau IX : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène <i>GSTe2</i> en fonction de l'âge des moustiques et des génotypes de la mutation L119F.	98
Tableau X : Répartition des génotypes au locus L119F du gène <i>GSTe2</i> entre les mâles accouplés, les femelles accouplées et les mâles non couplés comparés aux femelles collectées à l'intérieur des maisons	103
Tableau XI : Niveau d'association de différents génotypes au locus L119F-GSTe2 et le succès d'accouplement.....	104
Tableau XII : Niveau d'association entre les génotypes au locus <i>CYP6P9a</i> et la capacité des femelles d' <i>An. funestus</i> de laboratoire à pondre	109

Tableau XIII : Niveau d'association entre les génotypes au locus <i>CYP6P9a</i> et la formation des nymphes d' <i>An. funestus</i>	113
Tableau XIV : Niveau d'association entre les génotypes au locus <i>CYP6P9a</i> et la longévité des adultes	115
Tableau XV : Variation de la fréquence des génotypes (a) et des allèles (b) du gène <i>CYP6P9a</i> pendant dix générations dans un environnement sans insecticides.....	117
Tableau XVI : Distribution des génotypes au locus L119F-GSTe2 chez <i>An. funestus</i> en fonction de son statut d'infection à <i>Plasmodium</i> spp.....	121
Tableau XVII : Composition génotypique au locus L119F-GSTe2 chez <i>An. funestus</i> d'Obout et de Mibellon en fonction de leur statut infecté ou non infecté.....	123
Tableau XVIII : Niveau d'association de différents génotypes au locus L119F-GSTe2 et le statut d'infection à <i>Plasmodium</i> spp.....	124
Tableau XIX: Niveau d'association entre les génotypes au locus A296S-RDL et le statut d'infection à <i>Plasmodium</i> spp chez <i>An. funestus</i> s.s de Mibellon	125
Tableau XX : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène <i>GSTe2</i> en fonction du statut d'infection et du profil de résistance métabolique aux insecticides	127

Liste des abréviations

119F/F-GSTe2 : individu de génotype homozygote résistant (muté) pour la mutation L119F

296S/S-RDL : individu de génotype homozygote résistant (muté) pour la mutation A296S

A/A296-RDL : individu de génotype homozygote sensible (sauvage) pour la mutation A296S

A296S-RDL : changement de l'alanine en sérine à la position 296 du locus *RDL* et associée à la résistance à la dieldrine

AA-CYP6P9a : double insertion AA dans la région situé en avant du locus *CYP6P9a* et associée à la résistance aux pyréthriinoïdes

AA-CYP6P9a-RR : individu de génotype homozygote résistant (muté) pour la double insertion **AA-CYP6P9a**

AA-CYP6P9a-SS : individu de génotype homozygote sensible (sauvage) pour la double insertion **AA-CYP6P9a**

An.: *Anopheles*

CRID : *Centre for Research in Infectious Diseases*

DDT : Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane

DEM: DiEthylMaléate

dNTP : di-Nucléotide Tri-Phosphate

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique

GABA : Acide GammaAminoButyrique

GSTe2 : Glutathion-S-tranférase epsilon 2

GSTs : Glutathion-S-tranférases

kdr : knockdown resistance

L/L119-GSTe2 : individu de génotype homozygote sensible (sauvage) pour la mutation
L119F

L119F-GSTe2 : changement de la leucine en phénylalanine à la position 119 du locus *GSTe2*
et associée à la résistance au DDT/pyréthrinoïdes

LAV : Lutte AntiVectorielle

MII : Moustiquaire Imprégnée d’Insecticide

MILDA : Moustiquaire imprégnée à longue durée d’action

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

OVM : *Ovale/Vivax/Malariae*

PBO : Pyperonyl ButOxyde

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pulvérisation intradomiciliaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

RBM : Roll Back Malaria

RDL : Resistance to Dieldrine

s.l. : sensu lato (sens large)

s.s. : sensu stricto (sens stricte)

SIDA : Syndrome de l’ImmunoDéficiency Acquis

TAE : TriAcetate EDTA

Résumé

Les stratégies de gestion de la résistance aux insecticides telle que la rotation reposent sur l'hypothèse que la résistance aux insecticides serait associée à un coût biologique pouvant retarder la propagation des gènes de résistance au sein des populations de vecteur en absence de pression de sélection. Cependant, l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie ainsi que la capacité des moustiques résistants à transmettre le paludisme ont été jusqu'alors difficile à évaluer en raison de l'absence de marqueurs moléculaires. Afin de générer des données pouvant permettre aux pouvoirs publics d'améliorer les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme, nous avons dans cette étude, évalué l'impact de la résistance métabolique, sur les traits de vie d'*Anopheles funestus* en utilisant deux marqueurs récemment détectés : un appartenant au glutathion s-transférases (la mutation L119F-GSTe2) et l'autre aux cytochromes P450 (l'insertion AA-CYP6P9a).

L'étude de l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie des moustiques montre que, pour la résistance à base de glutathion s-transférases (GST), les moustiques de génotype homozygote résistant (119F/F-GSTe2) ont une fécondité réduite et un temps de développement plus long comparés aux individus hétérozygotes et homozygotes sensibles. Cependant, il a été noté que les moustiques de génotype homozygote résistant vivent significativement plus longtemps que ceux de génotype homozygote sensible montrant que cette mutation a un coût sur la fécondité des femelles et le temps de développement des larves mais aurait plutôt un bénéfice en ce qui concerne la longévité des femelles. Les observations similaires ont été faites pour le gène *CYP6P9a* que ce soit pour la fécondité des femelles que pour le temps de développement des larves. Toutefois, pour ce gène, aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne la longévité des moustiques de génotype homozygote résistant comparée à ceux de génotype homozygote sensible. Par ailleurs, il a été observé pour ce gène une augmentation significative de la fréquence de l'allèle sensible sur 10 générations en absence de pression de sélection d'insecticide ce qui pourra conduire à une restauration de la sensibilité.

L'évaluation de l'impact de la résistance métabolique (GST) sur la compétitivité d'accouplement des mâles sauvages, a permis d'identifier un total de 15 essais d'accouplement à Tibati et d'isoler 21 couples d'*An. funestus* de ces essais. Le génotypage du locus L119F-GSTe2 entre mâles accouplés et mâles non accouplés a révélé une fréquence plus élevée de

l'allèle résistant 119F (rapport de côtes (RC) = 2,1 ; $P = 0,03$) chez les mâles non accouplés comparée aux mâles accouplés mettant en évidence un coût de la résistance métabolique à base de GST sur la compétitivité d'accouplement des mâles sauvages.

Par ailleurs, l'évaluation de l'impact de la résistance métabolique (GST) sur l'infectivité au plasmodium n'a pas montré d'association significative ($\chi^2 = 0,34$; $P = 0,82$) entre les différents génotypes au locus L119F-GSTe2 et le statut d'infection à *Plasmodium* spp chez les moustiques sauvages en utilisant le moustique entier. Cependant, en analysant séparément l'infection oocystique et sporozoïtique, les moustiques de génotype homozygote résistant ont été significativement plus associés à l'infection par les sporozoïtes que les hétérozygotes (RC = 2,5 ; $P = 0,012$) et homozygotes sensibles (RC = 2,10 ; $P = 0,013$) indiquant que le parasite se développerait mieux chez les moustiques porteurs de l'allèle résistant de cette mutation.

Ces résultats montrent pour la première fois que la résistance métabolique causée par les cytochromes P450 et les glutathion S-transférases a un coût biologique chez les vecteurs du paludisme. Par conséquent, la mise en œuvre de stratégies de gestion basées sur la rotation d'insecticide pourrait aider à lutter contre la résistance aux pyréthrinoïdes sur le terrain si elles sont implémentées avant que les gènes de résistance ne soient fixés au sein des populations de vecteurs. Cependant, le fait que les moustiques résistants pour la mutation L119F vivent plus longtemps et présentent une plus grande capacité vectorielle montre que le gène *GSTe2* augmenterait le risque de transmission du paludisme dans les zones de forte résistance métabolique aux insecticides causée par ce gène.

Mots-clés : paludisme, insecticides, résistance métabolique, coût biologique, L119F-GSTe2, *CYP6P9a* et *Anopheles funestus*.

Abstract

Insecticide resistance management strategies, such as rotation of insecticide classes, rely on the hypothesis that insecticide resistance is associated with a fitness costs that may cause selection against resistance alleles in the absence of insecticide selection pressure. However, fitness costs incurred in the life-traits and the ability of resistant malaria mosquitoes to transmit *Plasmodium* parasites through metabolic resistance have so far been difficult to establish due to lack of suitable molecular markers. In order to generate data which could help to improve malaria vector control strategies, in this study we evaluated the impact of cytochrome P450-based (AA-CYP6P9a insert) and glutathione S-transferase mediated (L119F-GSTe2) metabolic resistance on the life traits of *Anopheles funestus* and on key parameters of its vectorial capacity.

Assessment of the impact of metabolic resistance on the life traits of mosquitoes revealed that homozygote resistant mosquitoes for the L119F mutation in the *GSTe2* gene have reduced fecundity and longer development time compared to heterozygote and homozygote susceptible individuals. However, it was observed that homozygote resistant mosquitoes live longer than those with the homozygote susceptible genotype showing that this mutation has a fitness costs on female fecundity and larval development time but has a benefit in terms of female's longevity. Similar results were observed for the *CYP6P9a* gene for both female fecundity and larval development time. However, for this gene, no significant difference was observed regarding the longevity of females with homozygote resistant genotype compared to those with the homozygote susceptible genotype. In addition, it has been noticed for this gene a significant increase frequency of the susceptible allele over 10 generations in the absence of insecticide selection pressure which could lead to the reversal of susceptibility.

Assessment of the impact of metabolic resistance on the mating competitiveness of wild male *An. funestus* identified a total of 15 mating swarms in Tibati whereas 21 couples of *An. funestus* were isolated from these swarms. Genotyping of the *GSTe2* locus for the L119F mutation between mated and unmated males revealed that the frequency of the 119F resistant allele was higher in the unmated males compared to those mated (odds-ratio (OR) = 2.1, $P = 0.03$), highlighting a fitness costs of this mutation on the mating competitiveness.

Furthermore, investigating the impact of metabolic resistance (GST) on *Plasmodium* infection in mosquitoes did not find a significant association ($\chi^2 = 0.34$; $P = 0.82$) between different genotypes for the L119F-GSTe2 mutation and the *Plasmodium* infection status in the field-collected whole mosquitoes (from Mibellon and Obout). However, by analyzing separate-

ly infection by oocysts and sporozoites, mosquitoes with homozygote resistant genotype were significantly more associated with sporozoite infection than heterozygotes (odd-ratio (OR)= 2.5; $P = 0.012$) and susceptible homozygotes individuals (OR = 2.10; $P = 0,013$) suggesting that the parasite developed better in mosquitoes bearing the resistant allele of this mutation.

These results show for the first time that metabolic resistance caused by Cytochrome P450 and Glutathione S-transferase is associated with a fitness costs in malaria vectors. Therefore, earlier implementation of strategies based on rotation of insecticide could help to tackle pyrethroid resistance in the field. However, the fact that resistant mosquitoes for the L119F mutation live longer and exhibit greater vectorial capacity suggests that GSTe2-based resistance probably increases the risk of malaria transmission in areas of high metabolic resistance to insecticides caused by this gene.

Keywords: malaria, insecticides, metabolic resistance, fitness costs, L119F-GSTe2, *CYP6P9a* and *Anopheles funestus*.

INTRODUCTION

Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique en Afrique malgré de nombreux progrès dans le contrôle de cette parasitose (OMS, 2018). Cette maladie est causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* Marchiafava et Celli, 1885, et transmis d'une personne à une autre par la piqûre de moustiques femelles du genre *Anopheles* Meigen, 1868. Au Cameroun, un cas de consultation sur quatre est lié au paludisme et un cas d'hospitalisation sur deux est dû à cette maladie (PNLP, 2018). Le contrôle repose essentiellement sur la lutte anti vectorielle à base de pulvérisation intra-domiciliaire (PID) et de moustiquaires imprégnés à longue durée d'action (MILDA). Ce moyen a contribué à une baisse significative de l'incidence et de la mortalité due à cette maladie entre 2000 et 2015 sur le plan mondial et au Cameroun (Bhatt *et al.*, 2015). Cependant une augmentation du nombre de cas de paludisme a été enregistrée au niveau mondial pendant les deux dernières années (OMS, 2018) montrant que la menace est persistante.

La résistance des vecteurs aux insecticides est l'une des principales causes de la persistance du paludisme en Afrique subsaharienne. En effet, après une dizaine d'année d'utilisation répétée d'insecticides, les vecteurs majeurs du paludisme à l'instar d'*Anopheles funestus* ont développé la résistance à toutes les quatre classes d'insecticides recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette résistance est particulière pour les pyréthrinoïdes qui, jusqu'à nos jours, est la principale classe d'insecticide recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires. La résistance résulte non seulement de l'utilisation massive d'insecticides en santé publique mais aussi des pesticides utilisés en agriculture et ceci constitue un véritable frein pour la lutte et le control du paludisme en Afrique. La résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus* par exemple a été reportée dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne. Elle a été reportée en Afrique australe [Afrique du Sud (Hargreaves *et al.*, 2000, Brooke *et al.*, 2001), Mozambique (Casimiro *et al.*, 2007, Cuamba *et al.*, 2010), Malawi (Hunt *et al.*, 2010, Wondji *et al.*, 2012)], Afrique de l'Est [Uganda, Kenya (Morgan *et al.*,

2010, Mulamba *et al.*, 2014) et Tanzanie (Lwetoijera *et al.*, 2014)], Afrique Centrale [Cameroun (Wondji *et al.*, 2011, Menze *et al.*, 2016, Menze *et al.*, 2018)], et Afrique de l'Ouest [Benin (Djouaka *et al.*, 2011, Djouaka *et al.*, 2016), Ghana (Okoye *et al.*, 2008, Riveron *et al.*, 2016), Sénégal (Samb *et al.*, 2016) et Nigéria (Djouaka *et al.*, 2016). Les deux principaux mécanismes à la base de cette résistance chez les vecteurs du paludisme sont principalement une mutation au niveau du site de fixation de l'insecticide (à l'exemple du type *knock-down resistance* dit «*kdr*») et la surexpression des enzymes de détoxification. Cependant, chez *An. funestus*, la résistance aux insecticides est principalement due aux enzymes de détoxifications appartenant à la famille des cytochromes P450 et des glutathion S- transférases. Chez cette espèce, il n'y a pas d'évidence de la résistance de type *kdr* connue chez *An. gambiae* (Irving et Wondji, 2017).

Les programmes actuels de gestion de la résistance telle que la rotation d'insecticides reposent principalement sur l'hypothèse que la résistance aux insecticides serait associée à un coût biologique chez le vecteur. De ce fait, il serait capital d'évaluer le coût biologique de la résistance aux insecticides chez les principaux vecteurs du paludisme afin de pouvoir mettre sur pied des mesures de lutte efficace. Des avancées ont été réalisées en ce qui concerne le coût biologique de la résistance du site cible du fait de l'existence des marqueurs génétiques de ce mécanisme. En effet, plusieurs études ont montré que dans certains cas, la résistance aux insecticides entraîne une diminution de la longévité des vecteurs, une diminution de l'infectiosité et un changement de comportement, ce qui réduirait la capacité vectorielle de l'insecte (Rivero *et al.*, 2010). D'autres études ont montré par ailleurs que cette résistance (du site cible) entraîne une réduction de la fécondité, de la fertilité et même de la compétitivité d'accouplement des mâles (Rowland, 1991a, Rowland, 1991b, Berticat *et al.*, 2002, Brito *et al.*, 2013, Platt *et al.*, 2015). Cependant, peu d'informations existent sur le coût biologique de la résistance métabolique du fait de l'absence de marqueurs moléculaires pour détecter ce

mécanisme. Toutefois, d'énormes progrès ont été réalisés récemment, notamment chez le vecteur *An. funestus*, avec la découverte de marqueurs moléculaires pour la résistance à base de glutathion S-transferase (L119F-GSTe2) (Riveron *et al.*, 2014) et à base de cytochrome P450 (*CYP6P9a*) (Weedall *et al.*, 2019). Ces nouveaux marqueurs offrent une grande opportunité pour évaluer l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie ainsi que la transmission du paludisme chez ce vecteur majeur du paludisme.

Dans la présente étude, en utilisant ces nouveaux marqueurs moléculaires, nous nous proposons d'évaluer le coût biologique de la résistance aux insecticides chez *An. funestus* afin de générer des données pouvant permettre aux pouvoirs publics d'améliorer les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. Plus précisément, il s'agit d'évaluer le (l') :

- coût biologique de la résistance métabolique médiée par les *GST* sur les traits de vie d'*An. funestus* ;
- coût biologique de la résistance métabolique médiée par les cytochromes P450 sur les traits de vie de ce vecteur ;
- impact de la résistance métabolique sur l'infection à *Plasmodium* spp et la transmission du paludisme.

Ce travail est organisé en trois chapitres encadrés par une introduction et une conclusion. Le premier chapitre présente les généralités sur le paludisme, la résistance aux insecticides et le coût biologique de la résistance. Le second porte sur la méthodologie utilisée ; il décrit le cadre géographique de l'étude, les protocoles utilisés, ainsi que les méthodes d'analyse des résultats. Le troisième chapitre expose les principaux résultats obtenus et leur discussion.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME

I.1. EPIDEMIOLOGIE

I.1.1. Situation du paludisme dans le monde

Le paludisme, maladie parasitaire la plus répandue dans le monde est due à la présence dans le sang de protozoaires hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium* Marchiafava et Celli, 1895 qui sont transmis à l'Homme par des moustiques femelles infectées, du genre *Anopheles* Meigen, 1818. Le paludisme est largement répandu dans les zones intertropicales sur le continent africain, mais aussi en Amérique du Sud, en Asie et dans quelques pays de la région méditerranéenne (**Figure 1**). On estime que l'incidence mondiale de la maladie est entre 100 et 300 millions de nouveaux cas chaque année. En 2017, 219 millions de nouveaux cas de paludisme ont été notés, représentant une augmentation de 8 millions par rapport à 2015 avec 90% provenant d'Afrique dont 3% au Cameroun (WHO, 2018). Cette infection touche principalement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

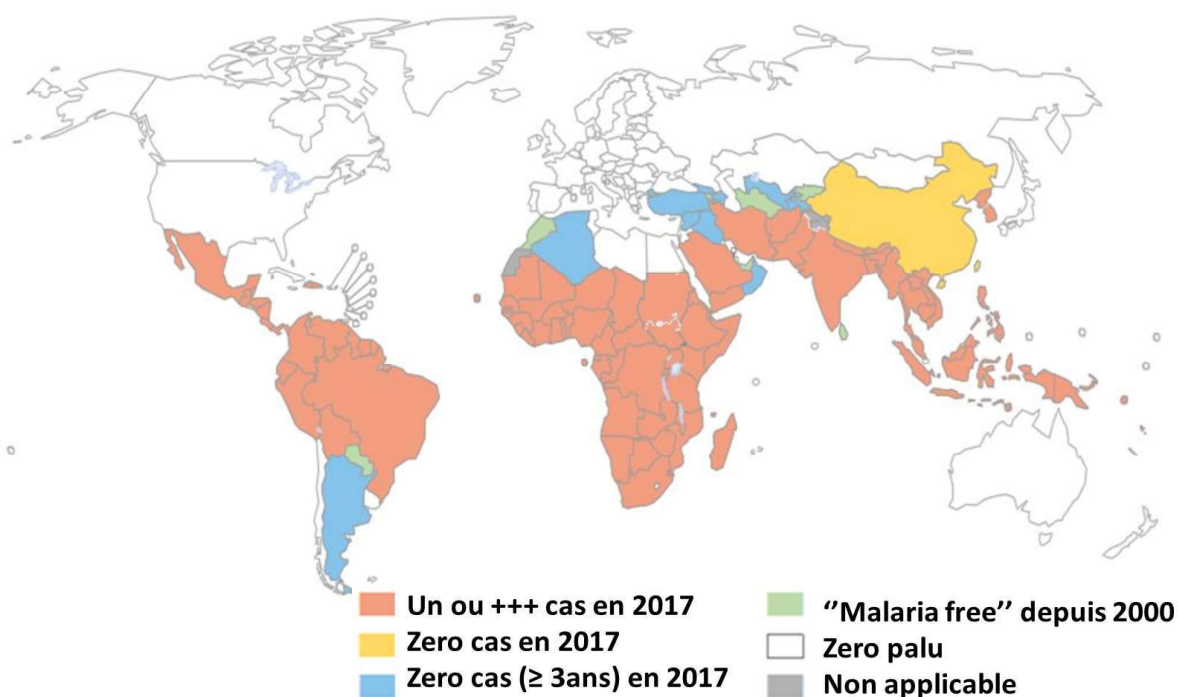


Figure 1 : Pays endémiques au paludisme dans le monde en 2017.

Source : OMS, 2018.

Toutefois, une baisse significative de l'incidence du paludisme a été enregistrée entre 2010 et 2015 (WHO, 2018) (**Figure 2**) avec plus de 70% de succès attribué à la lutte antivectorielle essentiellement menée au moyen des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) et de pulvérisations intra domiciliaires à effet rémanent (PID) (Bhatt *et al.*, 2015).

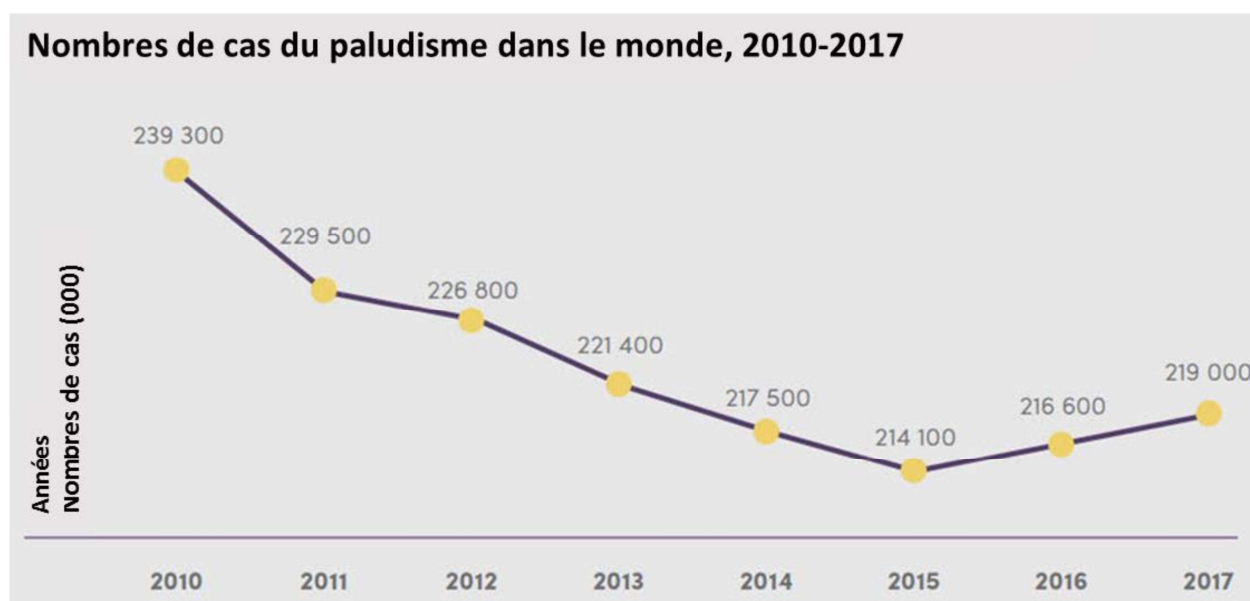


Figure 2 : Évolution de l'incidence du paludisme dans le monde entre 2010 et 2017.

Source : WHO, 2018.

Cette maladie demeure encore un sérieux problème de santé publique, principalement dans les pays en voie de développement avec une augmentation du nombre de décès palustre les deux dernières années (2016 et 2017) en raison de plusieurs facteurs. En effet, l'épidémiologie du paludisme dans une population donnée dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels la (les) :

- présence de sujets atteints de paludisme,
- présence d'anophèles,
- température moyenne supérieure ou égale à 15°C

- facteurs socio-économiques tels la construction de barrages, la proximité des habitations par rapport aux gîtes larvaires mais le plus souvent la mise au point des projets de développement agricole (surtout la riziculture) etc.
- efficacité des interventions de lutte

I.1.2. Situation du paludisme au Cameroun

Le paludisme est l'endémie la plus répandue au Cameroun avec plus de 2 millions de cas enregistrés en 2017 (OMS, 2018) et 3263 décès dans les formations sanitaires en 2018 principalement chez les enfants de moins de 5 ans (61% de cas). Le paludisme est à l'origine de 49,2% des cas d'hospitalisations au Cameroun. L'intensité du paludisme est assez stratifiée au Cameroun avec des zones à forte transmission et d'autres de faibles niveaux (**Figure 3**). Au regard de la carte, la région de l'Est est la plus touchée parmi les dix régions suivit de l'Adamaoua, du Sud-Ouest et du Centre. Selon les dernières estimations du programme national de lutte contre le paludisme (PNLP), la morbidité du paludisme au Cameroun est de 25,9% avec une mortalité de 14,6% (PNLP, 2018). Les conséquences de cette maladie sont très graves car elle contribue à la mortalité infanto-juvénile à travers les faibles poids de naissance, l'anémie sévère et les crises convulsives. Elle contribue également à la mortalité des enfants à travers les avortements et les accouchements prématurés. Tout ceci entraîne de lourdes conséquences socio-économiques au regard du taux d'absentéisme au travail, la faible productivité, le faible rendement scolaire ainsi que la pauvreté des ménages faisant ainsi du paludisme une préoccupation majeure.

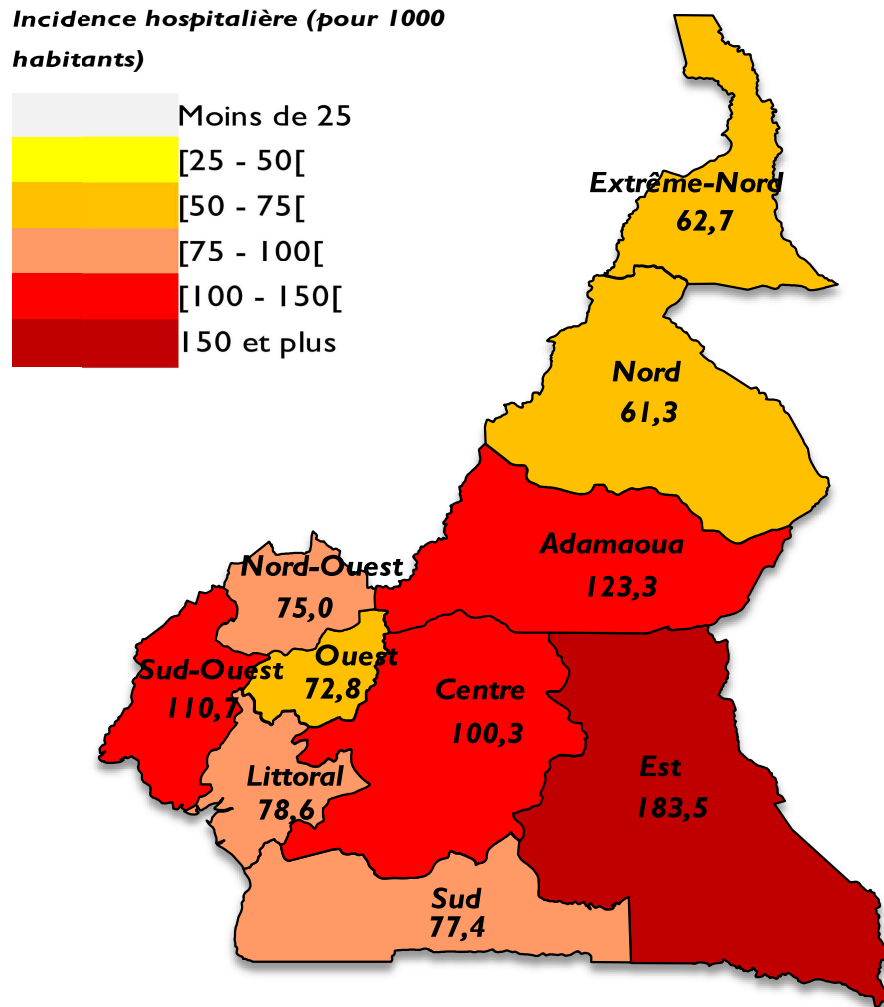


Figure 3 : Variation de l'incidence hospitalière du paludisme dans les dix régions du Cameroun

Source : PNLN, 2018.

I.2. AGENT PATHOGENE DU PALUDISME

I.2.1. Systématique

L'agent causal du paludisme est un protozoaire hématozoaire de l'embranchement des Apicomplexa, classe des sporozoaires, appartenant à l'ordre des Haemosporida, au sous-ordre des Haemosporidae, famille des Plasmodiidae, et au genre *Plasmodium*, Marchiafava et Celli, 1895. Ce genre a été distingué des autres du fait qu'il soit capable d'infecter d'autres types cellulaires que les érythrocytes, et par sa capacité à être transmis par des vecteurs diptères

(Gilles, 1993). Il comprend plus de 140 espèces (ANOFEL, 2014) réparties en dix sous-genres, dont trois sont spécifiques de mammifères (primates et rongeurs), quatre des oiseaux et trois des reptiles. Des trois sous-genres de mammifères, seuls *Plasmodium* et *Laverania* sont ceux retrouvés chez les primates (**Figure 4**).

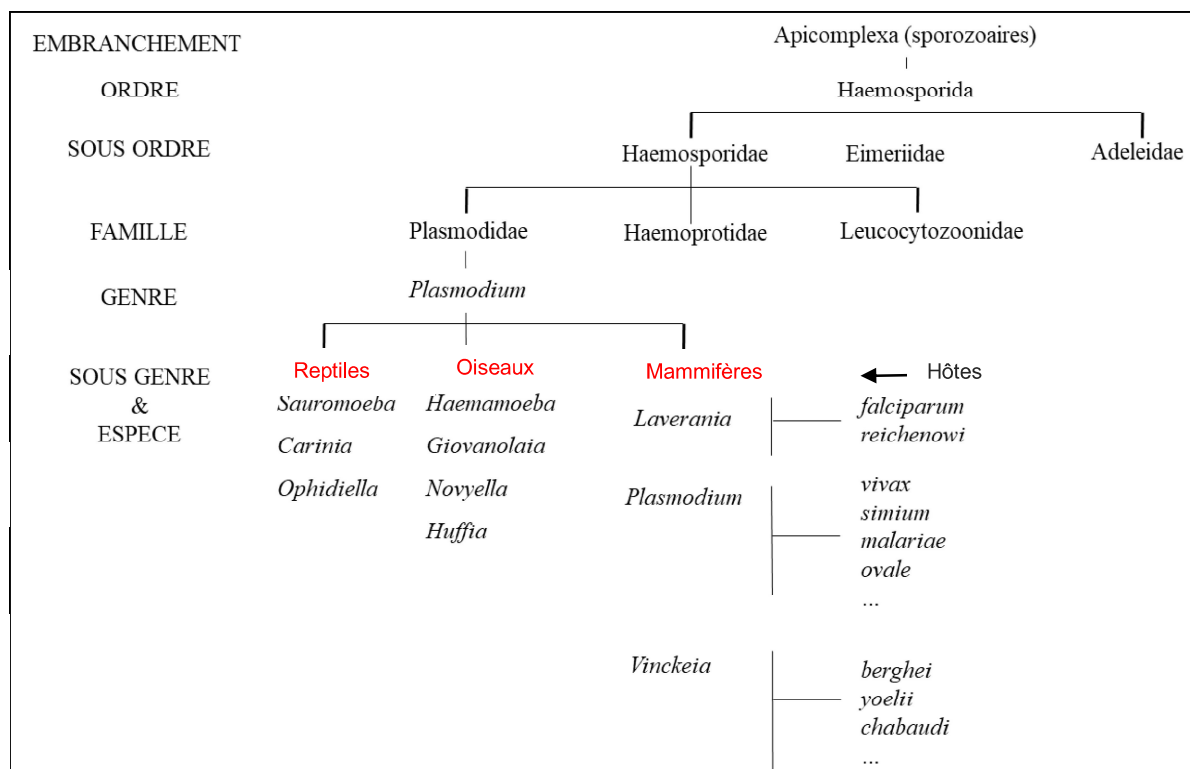


Figure 4 : Classification partielle des Plasmodiums d'après Bruce-Chwatt.

Source : Bruce-Chwatt, 1980.

I.2.2. Répartition géographique du genre *plasmodium*

De toutes les espèces de *Plasmodium* recensées, seules cinq (05) sont retrouvées en pathologie humaine (ANOFEL, 2014). Ce sont : *P. falciparum* Welsh, 1897, *P. ovale* Stephens, 1892, *P. vivax* Grassi & Feletti, 1890, *P. malariae* Laveran, 1881 et *P. knowlesi* Sinton et Mulligan, 1933 récemment reconnu comme la cinquième espèce du genre *Plasmodium* causant le paludisme dans les populations humaines en Asie du Sud-Est. Ces plasmodies humaines sont très distantes phylogénétiquement l'une de l'autre, leur divergence évolutive étant antérieure à l'origine des hominidés (Annan, 2007).

• ***Plasmodium falciparum* Welch, 1897** est l'espèce la plus répandue. Cette espèce est fortement implantée en Afrique tropicale et y sévit de façon permanente. Sa durée d'incubation est de 7 à 15 jours et sa longévité est inférieure à un an. Elle est à l'origine de la fièvre tierce maligne, la plus meurtrière. C'est un parasite d'hématies de tous les âges, la schizogonie érythrocytaire se faisant dans les organes profonds. En cas de complications, le parasite peut passer dans le système nerveux central ; on parle alors de neuropaludisme (Mouchet, 2004).

• ***Plasmodium malariae* Laveran, 1881** se rencontre dans toute la région afro-tropicale à des fréquences très variables de 2 à 45%. Elle est généralement plus fréquente dans les zones forestières. Elle est à l'origine de la fièvre quarte bénigne à recrudescence tardive. Sa longévité est d'environ 21 jours et elle s'attaque principalement aux hématies vieilles. Sa recrudescence peut aller jusqu'à 10 ou 20 ans, par réactivation de formes érythrocytaires latentes malgré l'absence d'hypnozoïtes (Baudon *et al.*, 1987).

• ***Plasmodium vivax* Grassi et Feletti, 1890** présente une vaste aire de distribution mais est absente chez les populations portant l'antigène Duffy (Duffy+). Cette espèce est responsable de la fièvre tierce bénigne, la plus répandue. Son incubation dure environ 15 jours et peut s'étendre jusqu'à 7 mois. C'est un parasite d'hématies jeunes qui cause des fièvres rémittentes pendant une période de deux ans dues à la présence d'hypnozoïtes (Baudon *et al.*, 1987).

• ***Plasmodium ovale* Stephens, 1922** a une localisation essentiellement africaine. Longtemps confondue à la précédente, elle a été décrite comme remplaçant *P. vivax* chez les sujets Duffy négatifs (Molineaux *et al.*, 1980). Elle cause une fièvre tierce bénigne. Sa longévité est de 15 jours et on note des rechutes pouvant durer 5 ans, dues à la présence d'hypnozoïtes hépatiques (Mouchet *et al.*, 2004).

- ***Plasmodium knowlesi* Knowles, 1932** est génétiquement proche de *Plasmodium vivax* et morphologiquement de *Plasmodium malariae*. Elle était connue antérieurement comme parasite de singes mais a été découverte récemment chez l'homme dans plusieurs pays d'Asie du sud (Lee *et al.*, 2009).

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

I.2.3. Cycle biologique du plasmodium

Le cycle du *plasmodium* est hétéroxène à deux hôtes : il comporte obligatoirement un passage alterné par un vertébré (hôte intermédiaire) et un moustique hématophage femelle du genre *Anopheles* (hôte définitif) (**Figure 5**).

• Phase asexuée chez l'Homme

Il s'agit de la phase asexuée du cycle du parasite. La transmission du parasite d'un Homme à un autre se fait par l'intermédiaire de l'anophèle femelle infectée, au moment de la prise du repas sanguin. Chez l'homme le cycle est lui-même divisé en 2 phases intracellulaires : une phase hépatique et une phase sanguine.

- Phase hépatique ou pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire

L'anophèle femelle sonde la peau avec son proboscis à la recherche des vaisseaux sanguins, puis inocule une salive anticoagulante et agglutinante. Les sporozoïtes sont alors inoculés dans les tissus intra-cutanés et dans les capillaires sanguins de l'hôte vertébré. Les sporozoïtes, mobiles, circulent dans la peau, la lymphe et le sang pendant moins d'une heure puis, gagnent les hépatocytes. Dans l'hépatocyte, le noyau du sporozoïte devient un schizonte (hé-

patique) à la suite d'un certain nombre de divisions et chaque noyau fils s'entoure d'une portion de cytoplasme pour devenir un mérozoïte.

La phase sanguine ou érythrocytaire

Après 7 à 15 jours de maturation, les schizontes éclatent et libèrent les mérozoïtes qui gagnent la circulation sanguine. Une fois dans la circulation sanguine, les mérozoïtes pénètrent très rapidement les hématies, augmentent de volume pour devenir des trophozoïtes et divisent leurs noyaux plusieurs fois pour devenir des schizontes (érythrocytaires). Les schizontes devenus matures, ou corps en rosace éclatent et libèrent les mérozoïtes dont certains vont pénétrer de nouveaux globules rouges et débiter un nouveau cycle schizogonique. La durée de ce cycle de répliation varie de 24 heures pour *P. knowlesi* à 48 heures pour *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. ovale*, et à 72 heures pour *P. malariae*. Cependant, certains stades pré-mérozoïtes encore appelés hypnozoïtes demeurent dormants dans le foie puis, à un moment donné, prédéterminé selon l'espèce et la souche (Bray et Garnham, 1982), commencent à se développer et à entreprendre leur schizogonie exoérythrocytaire. Ceci sera à l'origine de nouveaux mérozoïtes qui vont envahir le sang et se multiplier dans les globules pour déclencher de véritables rechutes. Après plusieurs cycles, certains mérozoïtes vont subir une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée et se transformer en gamétocytes à potentiel mâle ou femelle dont les stades matures, bloqués, restent dans le sang périphérique de l'Homme. C'est la première étape de la phase asexuée.

• Phase sexuée proprement dite chez le moustique vecteur

Lors de son repas sanguin sur un Homme impaludé, l'anophèle femelle prélève les gamétocytes qui vont être digérés et se transformer en gamètes mâles et femelles. Ces gamètes vont par la suite fusionner pour donner un œuf mobile appelé ookinète. Ce dernier quitte la lumière du tube digestif du moustique et va se loger sous l'assise basale de la paroi externe de l'estomac où il s'enkyste et se transforme en oocyste dans lequel s'individualisent les sporo-

zoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère les sporozoïtes qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique, prêts à être inoculés à un nouvel hôte vertébré lors du prochain repas sanguin. Ainsi débutera un nouveau cycle de vie du parasite.

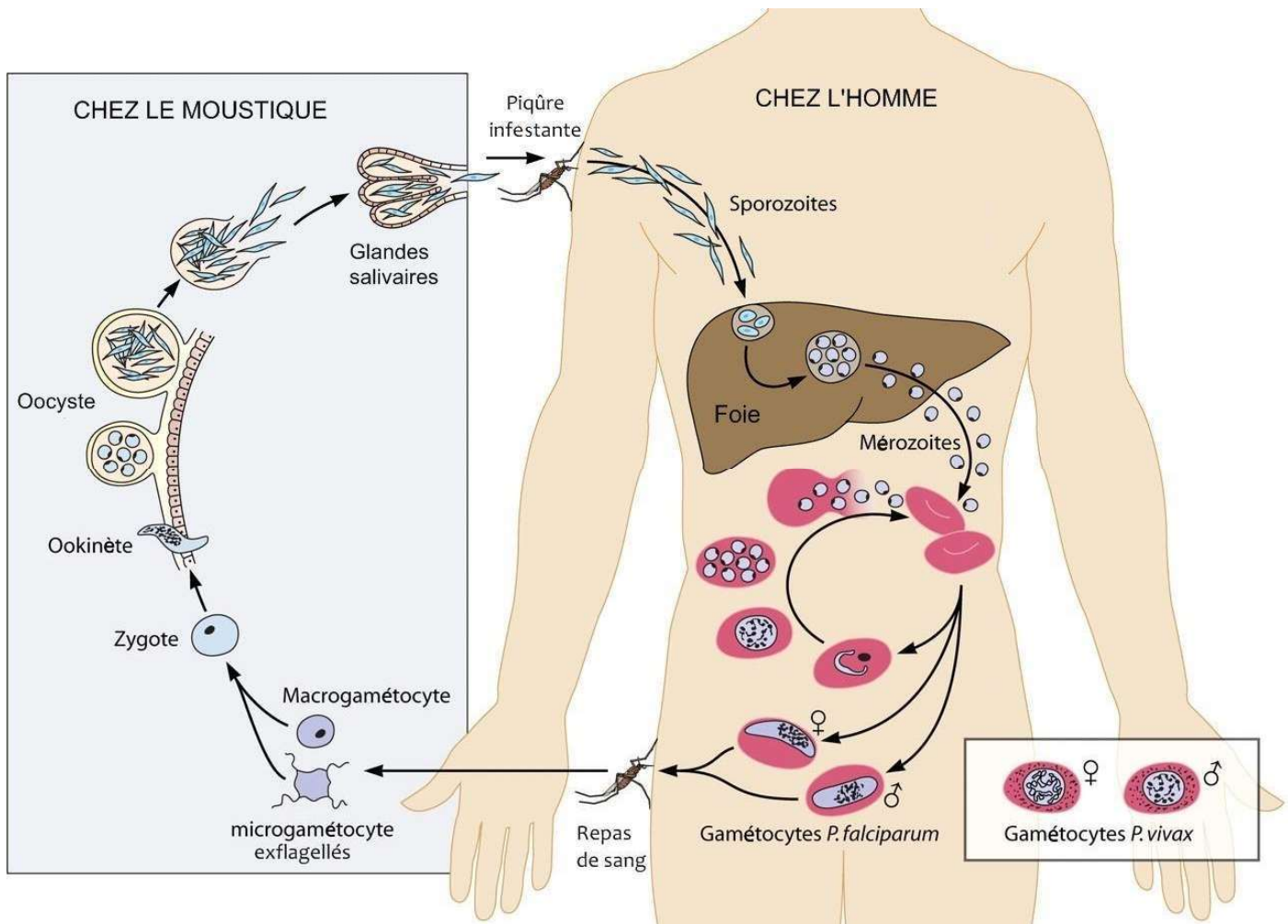


Figure 5 : Cycle biologique de développement du plasmodium.

Source : modifié de Bousema & Drakeley, 2011.

1.2.4. Lutte contre les agents du paludisme

L'une des stratégies visant à réduire l'intensité de transmission du parasite est la limitation de la taille du réservoir humain de celui-ci. C'est ainsi que le diagnostic,

le développement d'un vaccin et le traitement de l'infection constituent les principaux moyens de réduction du nombre de porteurs de parasites susceptibles (RBM, 2008).

Le diagnostic : il est préalable au traitement et doit se faire de façon précoce et fiable afin de limiter le plus tôt possible les dommages causés par la maladie (morbidité et mortalité) et l'apparition d'une résistance aux médicaments utilisés pour le traitement. Il se fait par différents moyens dont le TDR (test de diagnostic rapide). Les techniques de goutte épaisse et de frottis mince constituent depuis plusieurs années l'examen de référence («*gold standard*») pour la détection de l'infection à *Plasmodium* (A-Elgayoum *et al.*, 2009, Parajuli *et al.*, 2009).

Le vaccin antipaludique : depuis plusieurs années, les recherches pour le développement d'un vaccin constituent une voie majeure vue l'augmentation inquiétante de la résistance des parasites à la plupart des antipaludéens. Ces recherches reposent sur l'identification et la production de divers antigènes issus, soit du moustique, soit de différents stades du cycle évolutif du parasite chez l'Homme, qui déclenche une réponse immunitaire protectrice chez l'homme.

Un premier vaccin avait été testé en 2009 dans sept pays sur plus de 15 000 enfants. Ce test de 2009 avait montré assez clairement que le vaccin est efficace pour prévenir les épisodes de paludisme clinique et de paludisme grave. Cependant, cette efficacité n'était pas suffisante pour qu'une stratégie vaccinale opérationnelle puisse être envisagée (Saul, 2007, Greenwood et Targett, 2009).

Suite aux progrès de la recherche, un nouveau vaccin baptisé "Mosquirix" ou "RTS,S", a été développé par le géant pharmaceutique britannique GlaxoSmithKline en Avril 2019. Ce vaccin a été conçu en 1987 et développé en partenariat avec l'organisation humanitaire PATH, qui a lancé l'initiative vaccin contre le paludisme. Le Mosquirix est destiné aux enfants âgés de 5 mois à 24 mois et permet de lutter contre le paludisme dû au parasite *P. falciparum*, la forme la plus fréquente et la plus sévère de la maladie. Ce vaccin recombinant avec

adjuvant associe en effet une protéine du *P. falciparum* fusionnée et combinée à des antigènes de surface du virus de l'hépatite B sous forme de particules analogues à un virus mais dénuées de propriétés infectieuses. Cette composition explique que le Mosquirix, qui nécessite quatre doses pour être opérant, immunise également contre l'hépatite B. Des essais de moindre envergure ont montré que près de 40 % des enfants de 5 à 17 mois, qui l'avaient reçu, étaient protégés. Le Malawi a été le premier des trois pays choisis pour la phase pilote de déploiement de ce vaccin, les deux autres étant le Ghana et le Kenya. L'OMS cherche à vacciner 120 000 enfants âgés de deux ans ou moins dans chacun des trois pays ciblés, d'ici à 2020. Les trois pays ont été choisis parce qu'ils mettent en œuvre de vastes programmes de lutte contre le paludisme, avec l'utilisation de la moustiquaire et aussi parce qu'ils comptent encore un grand nombre de cas de paludisme.

Le traitement : l'augmentation de plus en plus croissante de la résistance des parasites aux médicaments antipaludiques les plus usuels comme la chloroquine, l'amodiaquine ou la sulfadoxine-pyriméthamine, est à l'origine de nouvelles stratégies de traitement basées essentiellement sur des combinaisons de différentes molécules dérivées de l'artémisinine. L'utilisation de l'artémisinine dans la prise en charge du paludisme simple offre un gain sur la mortalité car permettant la destruction des formes jeunes (Dondorp, 2008). Les combinaisons qui sont le plus couramment utilisées sont : artéméther + lumefantrine, artésunate + amodiaquine, artésunate + méfloquine, artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine. Outre leur efficacité démontrée dans le traitement des cas de paludisme simples, ces combinaisons ont également un effet direct sur la viabilité des gamétocytes et donc sur la transmission et la propagation de l'infection palustre.

I.3. VECTEURS DU PALUDISME

I.3.1. Systématique

I.3.1.1. Position systématique

Le genre *Anopheles* fut décrit pour la première fois en 1818 par l'entomologiste allemand Johann Wilhelm Meigen. Ce sont des membres de l'embranchement des Arthropoda, classe des Insecta, sous-classe des Pterygota, ordre des Diptera, sous-ordre des Nematocera, famille des Culicidae, sous-famille des Anophelinae (Knight et Stone, 1977). La classification des anophèles est présentée au tableau I.

Tableau I : Position systématique du genre *Anopheles*.

Classification	Caractéristiques
Embranchement des Arthropodes	Présence d'une symétrie bilatérale, présence d'appendices articulés.
Sous-embranchement des Hexapodes	Corps divisé en 3 tagmes (tête-thorax-abdomen), présence de 3 paires de pattes thoraciques.
Classe des Ectognathes	pièces buccales visibles à l'extérieur, présence de l'organe de Johnston sur le scape antennaire.
Sous-classe des Ptérygotes	Présence d'ailes au moins à un stade de leur développement post-embryonnaire.
Section des Néoptères, Oligonéoptères	Champ jugal présent, avec une seule nervure longitudinale simple.
Ordre des Diptères	Présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers ; pièces buccales de type piqueur-suceur.
Sous-ordre des Nématocères	Antennes longues et multiarticulées, pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse.
Famille des Culicidae	Corps recouvert d'écailles filiformes, bord postérieur des ailes frangées d'écailles.
Sous-famille des Anophelinae	Trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête, scutellum régulièrement courbé au bord postérieur.
Genre <i>Anopheles</i> Meigen, 1818	Taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa.

I.3.1.2. Vecteurs majeures du paludisme en Afrique

Parmi environ 528 espèces d'anophèles décrites actuellement dans le monde, seuls 68 transmettent efficacement le paludisme (Harbach, 2011, Sinka *et al.*, 2012). Leur distribution et leur capacité vectorielle varient selon les régions géographiques. La faune anophélienne d'Afrique est estimée à 160 espèces, mais seules 20 sont de bons vecteurs (Mouchet *et al.*, 2004). Trois espèces à savoir *Anopheles gambiae sensu stricto*, Giles 1902, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus* s.s. sont considérées comme vecteurs majeurs et appartiennent à des complexes ou groupes d'espèces (Fontenille *et al.*, 2003, Fontenille et Simard, 2004). Toutefois, certaines espèces telles qu'*Anopheles nili* s.s. Theobald, 1904, *Anopheles moucheti* s.s Evans, 1925, *Anopheles carnevalei* Brunhes *et al.*, 1999, *Anopheles coustani* Laveran, 1900, *Anopheles flavicosta* Edwards, 1911, *Anopheles hancocki* Edwards, 1929, *Anopheles melas* Theobald, 1903, *Anopheles merus* Doenitz, 1902, *Anopheles ovengensis* Awono-Ambene *et al.*, 2004, *Anopheles paludis* Theobald, 1900, *Anopheles pharoensis* Theobald, 1901, *Anopheles rufipes* Gough, 1910 et *Anopheles ziemanni* Grünberg, 1902 sont considérées comme des vecteurs secondaires ou d'importance locale. Ces derniers ont un faible rôle dans l'épidémiologie de la transmission (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006, Kerah *et al.*, 2009, Antonio-Nkondjio et Simard, 2013, Tabue *et al.*, 2014).

I.3.2. Biologie et cycle de développement des anophèles

Les culicidés ont un mode de développement de type holométabole (à métamorphose complète), les larves ayant une morphologie et un mode de vie très différents de ceux des adultes ; Les stades pré-imaginaux sont aquatiques alors que les adultes sont aériens. Le cycle de vie présente quatre stades évolutifs : l'œuf, les larves, la nymphe et l'adulte (**Figure 6**).

La phase aquatique : les femelles pondent dans des points d'eau qui varient en fonction des espèces. Les œufs restent en surface grâce à leurs flotteurs latéraux. Leur nombre

peut aller jusqu'à 300 pour un seul cycle gonotrophique. L'œuf éclot au bout de 36 à 48h mais il arrive que sur la boue humide ou en eau très froide l'éclosion soit différée de quelques jours (Danis et Mouchet, 1991). Il donnera une larve de stade 1 (L1) qui après trois mues aboutira à une larve de stade 4 (L4). Les larves sont détritivores, se nourrissent d'éléments planctoniques comme les levures, les bactéries, les protozoaires... La durée totale de la vie larvaire est de 8 à 12 jours (Danis et Mouchet, 1991). La nymphose (dernière mue) transforme la L4 en une nymphe qui ne se nourrira plus mais subira des transformations morphologiques et physiologiques importantes pour devenir un adulte.

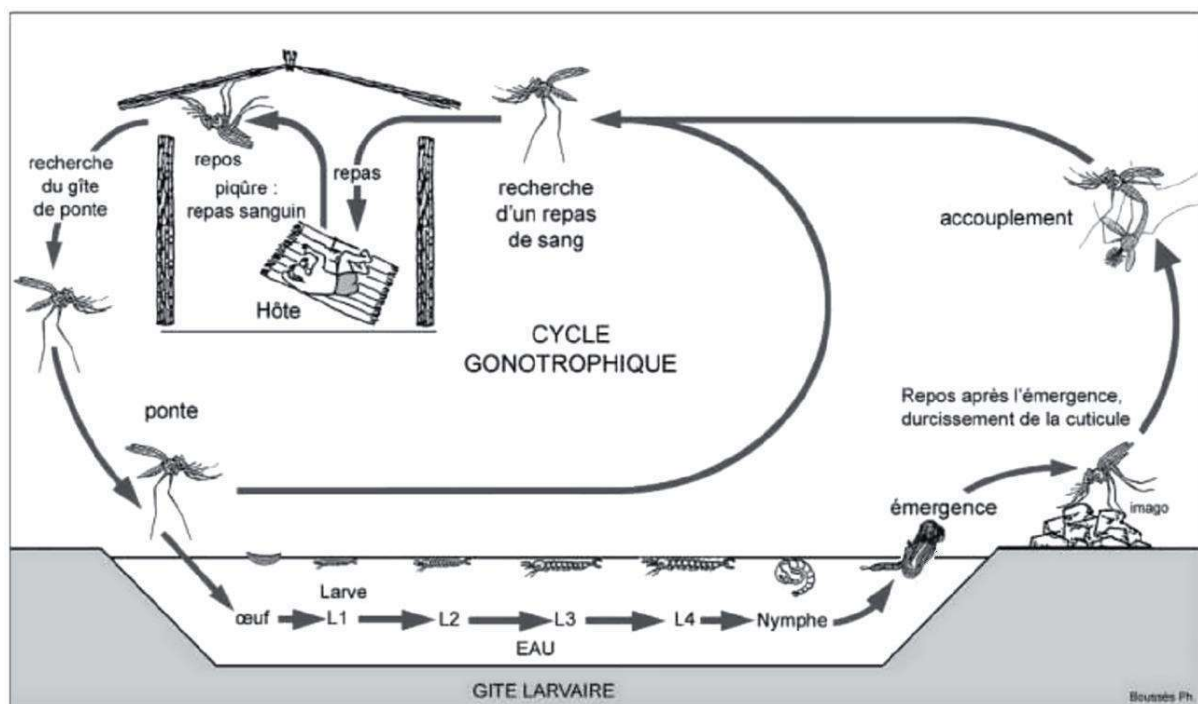


Figure 6 : Cycle biologique des anophèles.

Source : Carnevale *et al.*, 2009.

La phase aérienne : après l'émergence, ces insectes se reposent pendant environ 24 heures pour que leur exosquelette se durcisse et que les organes internes se mettent en place. On peut distinguer le cas des mâles de celui des femelles quant à leur éthologie et leur éco-physiologie :

- Les moustiques mâles ont les antennes plumeuses qui ont un rôle olfactif, intervenant dans la recherche des femelles. Ce caractère permet de distinguer à l'œil nu les deux sexes. Ils ne sont pas hématophages et de ce fait, ils ne se déplacent pas très loin de leurs gîtes. Leur vie est principalement axée sur leur fonction reproductrice et ils ont une longévité relativement faible : une semaine à 10 jours (Rodhain et Perez, 1985). Après le troisième jour, ils essaient au crépuscule puis s'accouplent (Danis et Mouchet, 1991).

- Les anophèles femelles ont des antennes glabres et ne s'accouplent le plus souvent qu'une seule fois dans la vie et elles conservent les spermatozoïdes fonctionnels dans une spermathèque. La femelle les utilisera tout au long de sa vie (Detinova *et al.*, 1962). Contrairement aux individus mâles, les femelles sont hématophages, se nourrissant en plus du jus de plantes, de sang d'animaux vertébrés ou d'humains qu'elles prélèvent par piqûres (**Figure 6**). Les substances alimentaires résultant de la digestion du sang absorbé sont utilisées en partie pour la nutrition, la régulation thermique, mais surtout pour la maturation des œufs.

L'ensemble du processus qui débute par la recherche d'un hôte, se poursuit par la piqûre avec prise de sang, la phase de repos avec digestion, le développement des ovocytes et s'achève par la ponte est appelé cycle gonotrophique. Les femelles ont une durée de vie de trois semaines à trois mois, parfois beaucoup plus car variant avec les espèces et les conditions environnementales (Rodhain, 1999). Les bons vecteurs du paludisme se caractérisent par une longévité supérieure à deux semaines, durée nécessaire à leur développement et à l'exécution du cycle extrinsèque du parasite.

I.3.3. Quelques vecteurs majeurs du paludisme

Avant les années 1950, la description puis l'identification des espèces vectrices majeures de *Plasmodium* se faisait uniquement sur la base des critères morphologiques mais à partir du XXème siècle, la classification a évolué sur la base de critères comportementaux, de niveaux variables de transmission plasmodiale ou alors de petites différences morphologiques

à un stade donné du cycle des anophèles (Carnevale *et al.*, 2009). Dès lors plusieurs espèces étaient rattachées à la même entité morphologique et regroupées sous le même nom créant ainsi une nuance sémantique qui veut que l'on appelle :

- **Complexe d'espèces** : des espèces morphologiquement identiques à tous les stades, mais différentes sur le plan génétique
- **Groupe d'espèces** : des espèces très proches morphologiquement mais qui présentent de petites différences à un stade au moins de leur développement. Cependant, une partie d'un groupe peut être constituée d'un complexe (Harbach, 1994, Harbach, 2004)

Presque tous les vecteurs majeurs de *Plasmodium* (une vingtaine) appartiennent à des groupes (Harbach, 1994) ou complexes d'espèces (Reid et Knight, 1961) regroupant en leur sein des espèces dites jumelles c'est-à-dire des « espèces qui présentent des caractéristiques morphologiques identiques mais isolées du point de vue reproductif » (Mayr, 1942).

I.3.3.1. Complexe *Anopheles gambiae*

Le complexe *Anopheles gambiae* est le plus étudié au monde, grâce aux travaux pionniers de DAVIDSON (Davidson, 1962), WHITE (White, 1974) et COLUZZI et collaborateurs (Coluzzi *et al.*, 1979), ceci pour deux raisons principales : ce complexe d'espèces comprend les deux vecteurs majeurs du paludisme en Afrique, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*; et l'on sait que plus de 80% des cas de paludisme dans le monde surviennent en Afrique tropicale qui n'héberge pourtant que 17% de la population du globe (<https://www.worldometers.info/world-population/>). Ce complexe est composé de neuf espèces jumelles différenciables d'abord grâce à des techniques de cytogénétique (Coluzzi *et al.*, 1979) puis sur la base de l'étude du polymorphisme génétique interspécifique des régions de l'ADN ribosomique et sur une insertion SINE200 irréversible (Scott *et al.*, 1993, Santolamazza *et al.*, 2008). Il s'agit de : *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902 ; *Anopheles Me-*

rus Dönitz, 1902 ; *Anopheles Melas* Theobald, 1903; *Anopheles arabiensis* Patton, 1904 ; *Anopheles quadriannulatus A* Theobald, 1911; *Anopheles Quadriannulatus B* Hunt *et al.*, 1998; *Anopheles bwambae* White, 1985; *Anopheles comorensis* Brunhes le Goff et Geoffroy, 1997 enfin *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson et Coetzee, 2013.

De plus, l'espèce *An. gambiae* s.s. se subdivise elle-même en cinq formes dont la répartition géographique dépend essentiellement des conditions environnementales, telles que le climat et la nature des gîtes larvaires (Touré *et al.*, 1994) ; ce sont : Forêt, Bissau, Bamako, Savane et Mopti (Coluzzi *et al.*, 1985) ; identifiables par PCR (Favia *et al.*, 2001), et correspondant à des inversions chromosomiques formant des cytotypes adaptés à un environnement particulier (Bryan *et al.*, 1982). Des marqueurs microsatellites, préalablement utilisés pour cartographier le génome des espèces du complexe *An. gambiae* (Zheng *et al.*, 1996) , ont fourni un outil remarquable pour l'étude de la structuration génétique des populations (Lanzaro *et al.*, 1998) . Ces marqueurs ont montré que, dans une même région, des différences importantes dans la structure des populations peuvent être observées entre plusieurs cytotypes, surtout si les marqueurs microsatellites utilisés sont localisés sur le chromosome 2 sur lequel se trouvent la plupart des inversions discriminantes (Lanzaro *et al.*, 1998).

An. arabiensis, une autre espèce du complexe et aussi excellent vecteur, a indirectement bénéficié de ces recherches puisque la majorité des séquences microsatellites identifiées sur *An. gambiae* s.s sont également présentes chez *An. arabiensis* (Simard *et al.*, 1999). Depuis le début 2000s, *An. gambiae* s.s a été subdivisée en deux formes moléculaires distinctes, M et S, basées sur une variation nucléotidique au niveau de la séquence IGS de l'ADN ribosomal (Torre *et al.*, 2001). Une étude menée au Sud-Cameroun au sein d'une population d'*An. gambiae* de la forme chromosomique « Forêt », où les deux formes moléculaires M et S étaient présentes en sympatrie, a montré une différenciation génétique significative entre ces deux formes (Wondji *et al.*, 2002). Ceci a été confirmé par les travaux antérieurs (Coetzee *et al.*,

2013) permettant ainsi d'élever récemment ces formes M et S au rang d'espèces à savoir *Anopheles coluzzii* et *An. gambiae* respectivement et augmentant également le nombre d'espèces à 10.

I.3.3.2. Groupe *Anopheles funestus*

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

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

An. parensis, *An. fuscivenosus*, *An. confusus* et *An. aruni* ne sont présentes qu'en Afrique de l'Est, *An. vaneedeni* est localisée en Afrique du Sud, et *An. brucei* est rapportée au Nigeria, alors qu'*An. funestus* s.s., *An. leesoni* et *An. rivulorum* s.s. sont largement présentes sur l'ensemble de l'Afrique subsaharienne (Coetzee et Fontenille, 2004).

Toutes les espèces du groupe sont très similaires morphologiquement et difficilement différenciables au stade adulte. Pour les espèces rares ou à distribution limitée, les stades pré

imaginaires sont souvent inconnus. Ce manque de caractères diagnostiques est à l'origine de mauvaises identifications. Face à ces difficultés, il a été mis sur pied un outil d'identification moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* : PCR) de type multiplexe permettant d'identifier les espèces *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. leesoni*, *An. rivulorum*, *An. rivulorum-like* et *An. parensis*. Ce test a été initialement développé sur des populations d'Afrique du Sud (Koekemoer *et al.*, 2002) puis validé pour toute l'Afrique (Spillings *et al.*, 2009). Le test d'identification PCR pour *An. rivulorum-like* a été mis au point par Cohuet et Collaborateurs (Cohuet *et al.* 2003). La biologie et la capacité vectorielle des espèces du groupe *An. funestus* sont très différentes. Seule *An. funestus* s.s. qui est extrêmement anthropophile joue un rôle important dans la transmission du paludisme, à la différence des autres membres du groupe qui sont le plus souvent zoophiles et donc de moindre importance médicale (Coetzee et Fontenille, 2004).

I.3.3.3. Diversité et répartition géographique des anophèles

La répartition du paludisme dans le monde dépend en partie des caractéristiques intrinsèques du vecteur dont la présence dépend de conditions locales. Ceci explique l'hétérogénéité de la distribution du paludisme. Dans le monde, on distingue :

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

La distribution des anophèles peut être locale ou régionale (**Figure 7**), comme *An. funestus*, un des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique sub-saharienne. Toutefois, contrairement à certaines espèces d'*Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, vecteurs des virus de la

dengue, du Chikungunya) ou de *Culex* (*Culex quinquefasciatus*, vecteur des virus du West Nile, de l'Encéphalite de St. Louis) qui ont colonisé plusieurs continents, aucune espèce d'anophèles n'a de distribution cosmopolite (Manguin *et al.*, 2008).

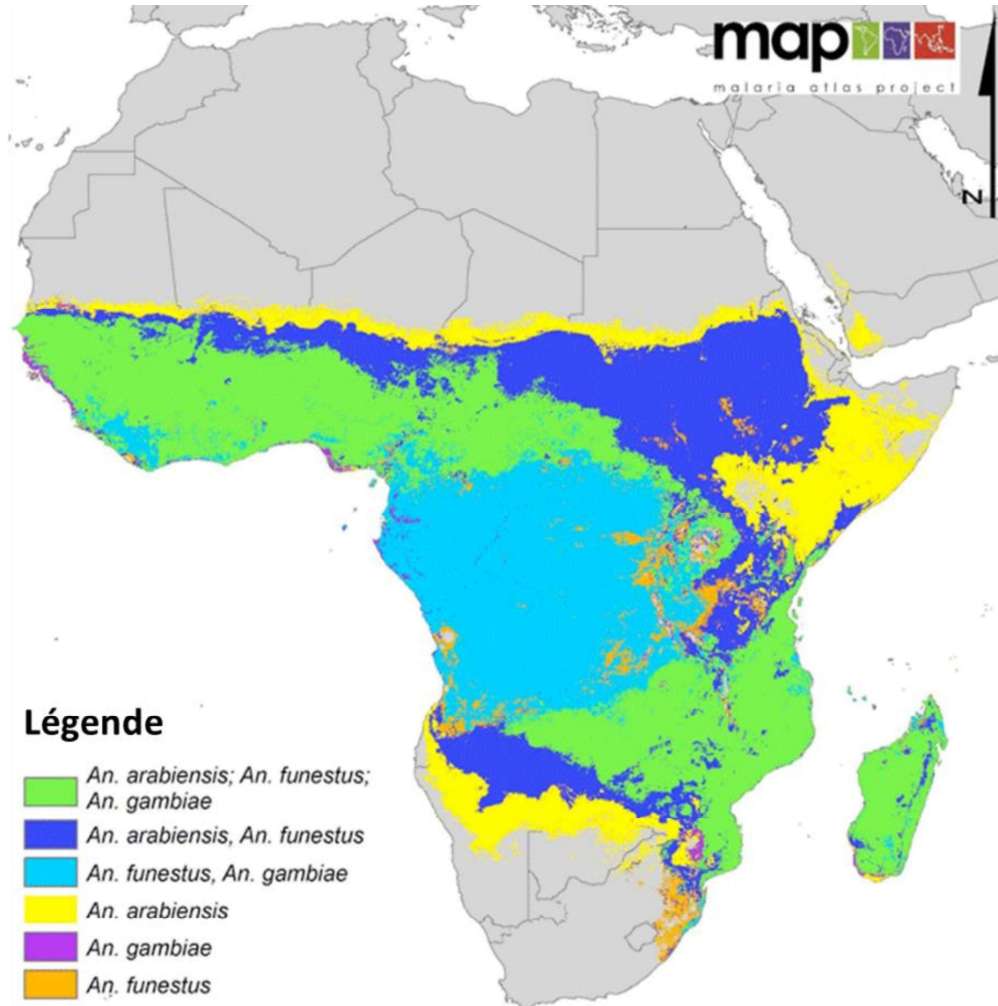


Figure 7 : Distribution des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique.

Source : Sinka *et al.*, 2012.

I.3.4. Lutte contre les vecteurs du paludisme

Vu la grande diversité et la répartition globale des moustiques, leur rôle dans la transmission du plasmodium et la non disponibilité des vaccins antiparasitaires qui pourraient être dirigés contre ce parasite, il en ressort que l'efficacité de la lutte contre le paludisme passe par l'élimination de ces vecteurs. La réduction significative du paludisme obtenue ces 15 der-

nières années a été associée à plus de 70% à la lutte anti-vectorielle utilisant les moustiquaires MILDA et PID (Bhatt *et al.*, 2015).

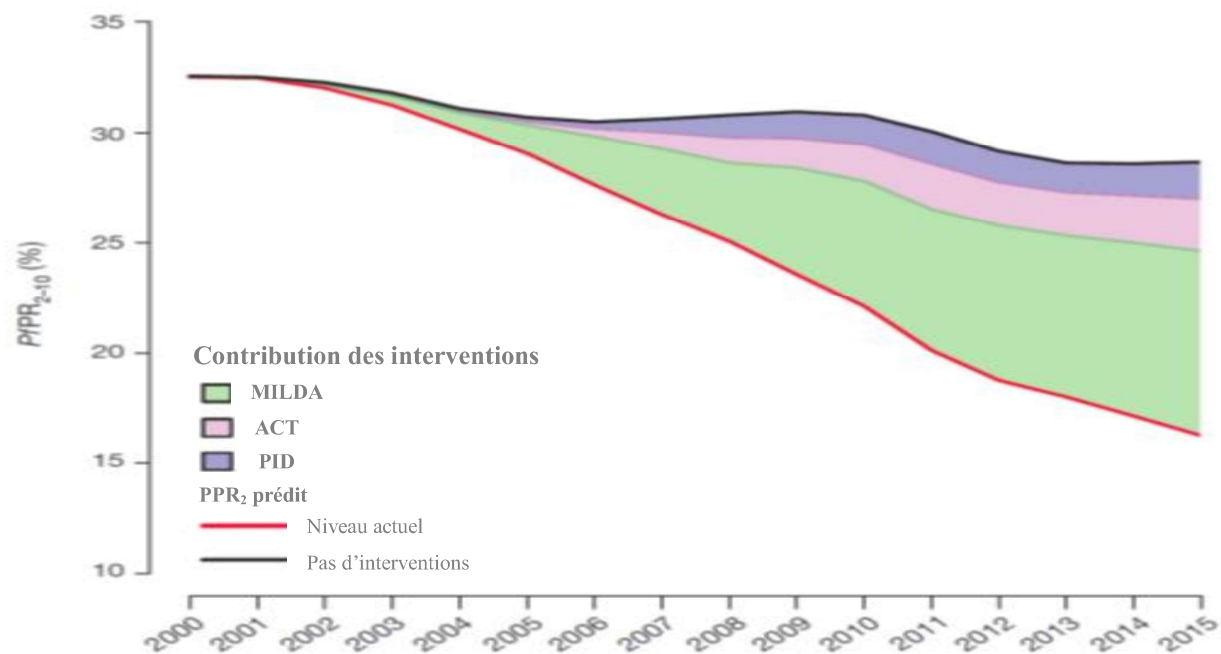


Figure 8 : Contribution de différentes interventions dans la lutte contre le paludisme de 2000 -2015.

Source : Bhatt *et al.*, 2015.

I.3.4.1. Insecticides utilisés dans la lutte anti vectorielle

La plupart des insecticides utilisés dans le cadre de la lutte anti vectorielle agissent au niveau du système nerveux et des muscles de l'insecte par contact, ingestion et par inhalation. Leur classification tient compte de la composition chimique, du mode d'application, de la formulation et du mode d'action. Les composés communément utilisés pour la lutte anti vectorielle appartiennent à quatre classes d'insecticides : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthri-noïdes (WHO, 2011) dont l'action est principalement dirigée sur les récepteurs du système nerveux des insectes (Enayati et Hemingway, 2010). Nous avons entre autres :

I.3.4.1.1. Pyréthri-noïdes

Les pyréthri-noïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthri-nes, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysantème. Ils se divisent en deux groupes : Le premier composé de produits à base d'alcool phénoxybenzyl et qui regroupent essentiellement la perméthrine et la bifenthrine. Le second groupe résulte du greffage d'un radical cyano sur la position alpha de l'alcool, donnant ainsi naissance aux pyréthri-noïdes alpha-cyanés et comprenant entre autres la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et l'alpha-cyperméthrine. Cette classe d'insecticides est la principale recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur efficacité élevée, de leur persistance, de leur vitesse de neutralisation rapide sur les insectes (effet knock-down = KD), de leurs propriétés anti-moustiques fortes, et de leur faible toxicité pour les mammifère (Zaim *et al.*, 2000, Hemingway *et al.*, 2004, WHO, 2016); ils sont également utilisées en pulvérisation intradomiciliaire (Diabate *et al.*, 2002). Les pyréthri-noïdes agissent sur le canal sodium (Na^+) en augmentant la fréquence des décharges nerveuses ou le temps d'ouverture des canaux (Salgado *et al.*, 1983). Cette action neurotoxique provoque une transmission répétée ou continue de l'influx nerveux qui aboutit à des convulsions puis à la tétanie de l'insecte (effet KD). L'action de ces insecticides se manifeste également par une perturbation des échanges en ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}) qui, normalement, circulent au travers des membranes cellulaires. L'atteinte de la circulation de ces ions entraîne la libération massive de neuro-hormones qui déséquilibrent l'organisme tout entier. L'insecte physiologiquement désorienté passe par des phases d'incoordination, de convulsion et de tétanisation. La mort survient plus ou moins rapidement suivant la dose et la puissance de l'insecticide. L'effet neurotoxique de la plupart des pyréthri-noïdes est lié à une action sur le canal sodium qui est maintenu en position ouverte.

I.3.4.1.2. Organophosphorés

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique. Ce sont : le parathion, le diazinon, le déméthon, le malathion, le fénitrothion, et le pirimiphos-méthyl. Ces trois derniers sont les plus utilisés en santé publique pour les aspersions intradomiciliaires ; leur cible principale chez le moustique étant l'acétylcholinestérase dont ils inhibent l'activité (Thabet *et al.*, 2009). En effet, au cours de la transmission de l'influx nerveux, l'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine qui agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques situées dans le système nerveux central de l'insecte. Cependant, les organophosphorés prennent la place de l'acétylcholine en se fixant sur son site d'interaction avec l'acétylcholinestérase ; il en résulte un blocage des sites d'action, suivi d'un accroissement rapide de l'acétylcholine qui peut s'accumuler jusqu'à 260 % de la normale dans l'espace synaptique (Champ, 1985). La propagation de l'influx nerveux ainsi bloquée, entraîne la paralysie et la mort de l'insecte.

I.3.4.1.3. Carbamates

Les carbamates, dérivés de l'acide carbamique comprennent un grand nombre de produits, parmi lesquels les plus utilisés en santé publique ont été le propoxur et le bendiocarbe (Carnevale et Mouchet, 1990) . Tout comme les organophosphorés avec lesquels ils ont le même mode d'action, ces insecticides sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.

I.3.4.1.4. Organochlorés

Les insecticides organochlorés se divisent en trois groupes selon la structure chimique de leurs composés : le DDT, le lindane et les cyclodiènes (dièldrine). Les organochlorés ont pour cible principale les canaux sodiques de l'insecte dont ils bloquent périodiquement la fermeture entraînant un déséquilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Il en résulte une perturbation de la transmission de l'influx nerveux à travers le nerf, provoquant ainsi un effet de choc ou «knockdown» suivi d'une paralysie qui entraîne la mort de l'insecte

(Carle, 1985). Toutefois la dièldrine, bien qu'appartenant à cette même famille d'insecticides, possède un mécanisme d'action bien particulier qui affecte le bon fonctionnement des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). L'insecticide se fixe sur les sites GABA en inhibant la dynamique du canal chlore qui reste alors en position ouverte. Ce dysfonctionnement entraîne une inactivation de la membrane nerveuse qui, lorsqu'elle se prolonge, se traduit par une paralysie du système nerveux. Le DDT a été l'insecticide le plus utilisé notamment pour les pulvérisations intra-domiciliaires à grandes échelles pendant les campagnes d'éradication du paludisme dans les années 1950. Cet insecticide agit sur l'insecte par contact et ingestion, induisant une incoordination motrice puis une paralysie générale.

I.3.4.2. Méthodes de lutte anti vectorielle

Différentes méthodes sont utilisées pour lutter contre les vecteurs du paludisme. Ce sont :

- **Méthodes chimiques** : elles utilisent les propriétés de nombreuses molécules à effet insecticide (substances synthétiques ou végétales) qui tuent les vecteurs par contact ou par ingestion. Il existe de nombreuses familles d'insecticides. Néanmoins, seules quatre d'entre elles sont classiquement utilisées dans la lutte anti vectorielle : (i) les organochlorés (DDT, dièldrine), (ii) les organophosphorés (malathion, fenitrothion, téméphos, chlorpyrifos), (iii) les carbamates (propoxur) et (iv) les pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, alpha-cyperméthrine, bifenthrine). Ces produits peuvent être appliqués directement dans l'environnement sous forme de suspension, poudre mouillable ou émulsion. Les pyréthrinoïdes conçus à partir des « ancestrales » pyrétrines naturelles, constituent la principale famille d'insecticide recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires compte tenu de leur effet « *knock down* », et de leur faible toxicité sur les vertébrés supérieurs (Zaim et Guillet, 2002, Hemingway *et al.*, 2004). Un autre type de substance dite synergiste, peut être

employé en même temps qu'un insecticide dans le but d'augmenter l'efficacité ou de potentialiser l'action de ce dernier. C'est le cas du pyperonyl butoxide (PBO) qui, bien que n'ayant aucune propriété insecticide propre, permet d'augmenter l'efficacité des pyréthrinoïdes en inhibant les enzymes de détoxification des insectes (Moore *et al.*, 2005).

- **Méthodes biologiques** : elles utilisent des organismes vivants et des virus capables d'affecter les populations d'arthropodes visés et ne doivent être envisagées qu'après une étude précise des conditions et de la biodiversité locales. Les principaux organismes utilisés dans la lutte biologique opérationnelle contre les stades larvaires de *Culicidae* sont les bactéries *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis*, dont la variété *Bt. israelensis (Bti)* (Becker, 1988). Des organismes pathogènes peuvent également permettre de lutter contre les populations de moustiques adultes. Les champignons *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* ont montré de bons résultats sur plusieurs espèces de *Culicidae*, dont le principal vecteur du paludisme en Afrique sub-Saharienne, *Anopheles gambiae* s.s. (Fahrenhorst *et al.*, 2009, Lovett *et al.*, 2019). Les adultes infectés présentent des taux de survie et de fécondité réduits, ainsi qu'une moindre propension à prendre un repas sanguin ; ce qui affecte les paramètres clés définissant l'intensité de transmission du paludisme. Une méthode de lutte biologique prometteuse consiste à utiliser des moustiques mâles porteurs de bactéries du genre *Wolbachia*, naturellement présentes chez 60% des insectes courants, dont les papillons et les mouches des fruits. Ces bactéries n'infectent ni l'être humain ni les autres mammifères. Lorsque les femelles s'accouplent avec des mâles porteurs de ces bactéries, les œufs n'éclosent pas, ce qui entraîne l'extinction des populations de moustiques. Une autre souche de *Wolbachia*, en cours d'étude, permet d'introduire cette bactérie dans une population de moustiques afin de réduire la capacité des moustiques à transmettre la maladie (Naciri, 2019).

- **Méthodes écologiques** : elles visent à aménager l'environnement de manière à le rendre défavorable au développement ou à la survie des vecteurs. Le principal moyen de lutte

écologique contre les anophèles vecteurs se réfère à toutes les mesures visant à éliminer les gîtes larvaires potentiels ou les gîtes de repos en effectuant des grands travaux de drainage et d'assèchement des zones marécageuses, le curage des canaux pour que l'eau n'y soit pas stagnante et la protection ou couverture étanche des réserves d'eau domestique. Toutefois, ce type d'opération s'avère souvent difficile à réaliser en raison de la présence de nombreux gîtes naturels disséminés et temporaires (Bomblies *et al.*, 2008).

- **Méthodes génétiques** : elles sont en cours de développement et sont basées sur la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement (Tabachnick, 2003, Fontenille *et al.*, 2005). Cependant, des recherches ont été menées à partir des années 1950 afin d'envisager le contrôle de culicidés d'importance médicale par cette technique, mais elles sont confrontées à plusieurs contraintes éthiques dans leur mise en œuvre opérationnelle (Dame *et al.*, 2009). Ainsi, le succès de l'emploi de moustiques génétiquement modifiés n'est qu'hypothétique et de nombreuses recherches sont nécessaires afin d'évaluer sa faisabilité.

La méthode de **forçage génétique** (*gene drive* en anglais) est de plus en plus convoitée comme méthode de lutte génétique contre les vecteurs. C'est une technique du génie génétique qui permet à un gène d'être transmis avec quasi-certitude par reproduction sexuée, même si cela va à l'encontre des lois de Mendel. Cette technique, apparue au début du XXI^e siècle, utilise la technique CRISPR/Cas9. Le forçage génétique permet de favoriser l'héritage d'un gène particulier et d'augmenter sa prévalence dans une population. Le forçage génétique peut être utilisé pour la prévention de la propagation d'insectes porteurs de maladies pour contrôler les espèces envahissantes ou pour éliminer la résistance aux insecticides ou aux pesticides de certaines espèces. La technique peut être utilisée pour ajouter, interrompre ou modifier des gènes d'une population entière de manière à provoquer une réduction drastique de cette popu-

lation en réduisant ses capacités de reproduction. Le forçage génétique fonctionne uniquement pour les espèces ayant une reproduction sexuée active, elles ne peuvent pas être employées pour modifier des populations de virus ou de bactéries. Ces exemples restent à l'heure actuelle des promesses.

I.3.4.3. Lutte anti vectorielle au Cameroun

Pendant la période coloniale (Dans les années 40), le contrôle des vecteurs du paludisme était assuré par les services d'hygiène et d'assainissement dans les grandes métropoles du Cameroun (Nzoguè, 2013). Ces interventions reposaient principalement sur la politique stricte d'inspection et de destruction régulière de tous les habitats larvaires temporaires à proximité des maisons, l'élimination des ordures à proximité des maisons et le nettoyage des buissons.

De nos jours, la prévention du paludisme au Cameroun repose principalement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée (MILDA) (de différentes marques, par exemple PermaNet, Olyset, Interceptor) (PLNP, 2007 ; 2014 ; 2015). Depuis 2004, quatre importantes campagnes de distributions gratuites de moustiquaires ont été effectuées à travers le pays (2004-2005, 2011, 2015 et 2019-2020). Depuis l'introduction de ces MILDA, une réduction significative des indicateurs entomologiques et épidémiologiques du paludisme a été documentée à travers le pays par différentes études (Antonio-Nkondjio et Simard, 2013, Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019) soulignant ainsi l'importance de cet outil pour la lutte antipaludique dans le pays.

I.3.5. Résistance des vecteurs aux insecticides

I.3.5.1. Définition de la résistance aux insecticides

L'utilisation des insecticides dans la LAV a contribué à réduire considérablement les populations de moustiques. Cependant, l'usage intensif de ces insecticides a contribué significativement à la sélection de la résistance à ces composés dans plusieurs pays d'Afrique (Fi-

gure 9). Selon L’OMS, «La résistance d’une souche ou (race) d’un insecte vis-à-vis d’un insecticide correspond au développement d’une capacité de tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d’une population normale de la même espèce» (OMS, 2012).

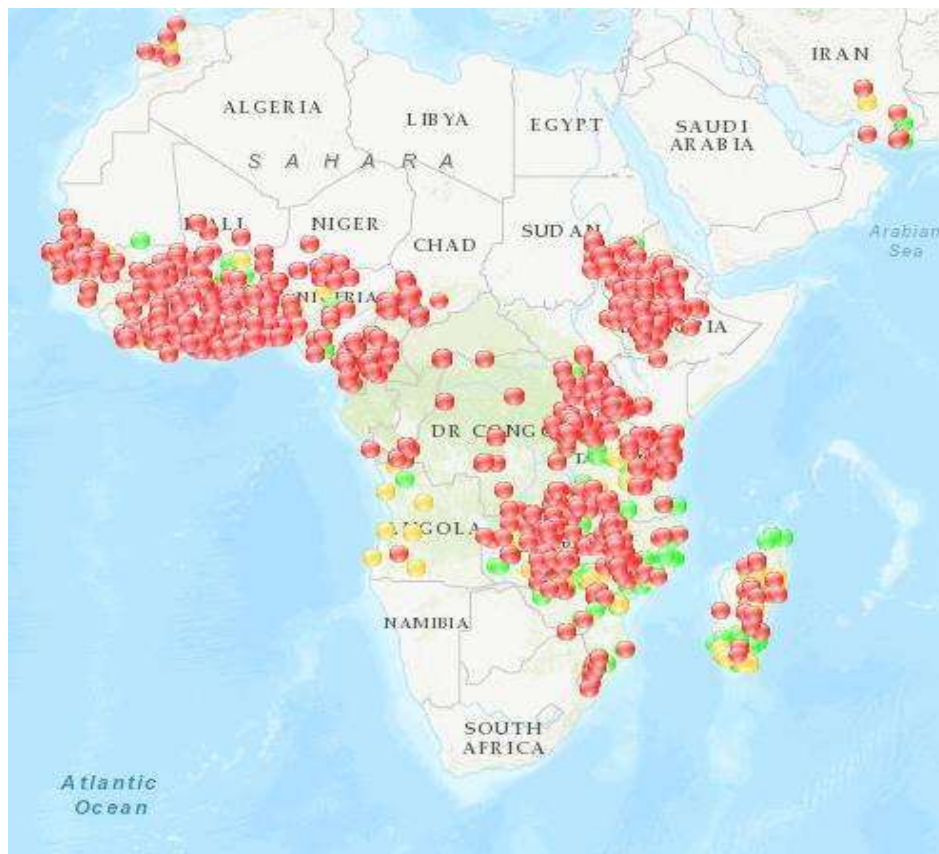


Figure 9 : Répartition de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les principaux vecteurs du paludisme (complexe *An. gambiae* et groupe *An. funestus*) en Afrique de 2005 à 2019.

Les points verts représentent une sensibilité totale, l’orange pour une résistance suspectée et le rouge pour la résistance confirmée.

La résistance à un insecticide peut s’étendre aux produits de la même famille, voire de familles voisines ayant le même mode d’action ou les mêmes cibles : c’est la résistance croisée. Il existe également des multi-résistances, résultant de l’accumulation, chez certaines populations d’insectes, de résistances à plusieurs familles d’insecticides (Hemingway et Ranson, 2000).

I.3.5.2. Mécanismes de résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme

Presque tous les insecticides chimiques sont neurotoxiques car perturbent le système nerveux de l'insecte en entraînant sa paralysie puis sa mort. Mais, pour agir, le poison doit pénétrer puis circuler dans l'organisme pour atteindre les cellules cibles. Les résistances sont contrôlées par un ou plusieurs gènes qui peut (peuvent) présenter différents allèles apparus par mutation (Poirié et Pasteur, 1991) et qui permettent à l'insecte, d'éviter le contact avec le composé toxique (résistance comportementale) (Lines *et al.*, 1987, Mathenge *et al.*, 2001), de diminuer sa pénétration ou d'augmenter son excrétion (résistance cuticulaire) (Apperson et Georghiou, 1975) ou encore sa détoxification (résistance métabolique), et même de modifier la structure des cibles ; de sorte que l'affinité avec l'insecticide est diminuée. Les résistances, comportementale et cuticulaire sont des mécanismes de résistance relativement rares mais surtout mal élucidés alors que l'augmentation de la détoxification des insecticides et les modifications des cibles sont connus comme à l'origine des niveaux de résistance très élevés chez les insectes.

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

I.4.3.2.1. Résistance par modification de la cible

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

résistance aux organophosphates et aux carbamates, et la modification de l'acide gamma-aminobutyrique responsable de la résistance à la dieldrine (RDL) (Hemingway et Ranson, 2000, Enayati et Hemingway, 2010).

- **Résistance *knock-down* (*kdr*)**

Cette résistance se caractérise par une diminution de l'affinité entre les protéines membranaires des neurones et les insecticides, ce qui au niveau moléculaire se traduit par une mutation du gène dit *Kdr* au niveau du canal sodique (Hemingway *et al.*, 2004). Cette mutation, fréquente chez les populations d'*An. gambiae*, se trouve dans plusieurs domaines du gène du canal sodique voltage-dépendant (Chandre *et al.*, 1999). Le canal sodique est le site cible des insecticides DDT et pyréthrinoïdes et des substitutions d'acides aminés à ce locus sont associées à une résistance aux insecticides. Chez *An. gambiae*, une substitution de la leucine par la phénylalanine due à la mutation à la position de nucléotide 1014 (L1014F) du gène *Kdr* est liée à une résistance croisée à la perméthrine et au DDT (résistance de type knockdown) en Afrique de l'Ouest (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Une autre mutation N1575Y très proche à L1014F a été récemment détectée et accroîtrait le rôle de cette dernière dans la résistance aux insecticides en Afrique de l'Ouest (Edi *et al.*, 2017). Cependant une autre mutation L1014S, se traduisant par une substitution de la leucine par la sérine à la même position est prédominante en Afrique de l'Est (Ranson *et al.*, 2000). Cette autre mutation confère une moindre résistance à la perméthrine, mais en revanche une plus forte résistance au DDT. Ces allèles *kdr-w* et *kdr-e* respectivement, ne sont plus restreints géographiquement de nos jours. Récemment, ils ont été trouvés dans les mêmes localités au Cameroun (Etang *et al.*, 2006) et au Gabon (Pinto *et al.*, 2006). Toutefois, aucune étude réalisée jusqu'à présent ne révèle la présence du gène *kdr* chez *An. funestus* (Amenya *et al.*, 2008, Okoye *et al.*, 2008, Irving et Wondji, 2017).

- **Acétylcholinestérase (Ace) insensible**

La mutation de cette enzyme (mutation Ace-1^R), impliquée dans le métabolisme de l'acétylcholine (Pitman, 1971), est à l'origine d'une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés. Elle provient d'une substitution de la glycine par la sérine due à une mutation à la position 119 du gène Ace-1 (G119S) et affecte la structure de l'enzyme, de telle sorte que le site catalytique est moins accessible à l'insecticide. Cette mutation a été observée chez plusieurs espèces de moustiques tels *An. gambiae* (Weill *et al.*, 2003), *An. arabiensis* (Casimiro *et al.*, 2006), *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1986, Bonning *et al.*, 1991) mais jamais chez *Ae. aegypti* (Vontas *et al.*, 2012), ni chez *An. funestus* (Cuamba *et al.*, 2010) chez qui une autre mutation N485I a été associée à la résistance aux carbamates (Ibrahim *et al.* 2016).

- **Récepteur de l'acide δ-aminobutyrique (GABA)**

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

I.3.5.2.2. Résistance métabolique

Certaines enzymes à large spectre sont aptes à désintoxiquer l'organisme des insectes en augmentant le métabolisme des molécules insecticides. Cette augmentation peut être due soit à une importante production d'enzymes de détoxification, soit à un meilleur métabolisme suite à une mutation suivie d'une modification de la structure de l'enzyme (Li *et al.*, 2007). Ces enzymes sont principalement de trois grandes familles chez les moustiques : les car-

boxylestérases (COEs), les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYPs) et les glutathion S-transférases (GSTs) auxquelles on peut ajouter les transporteurs extra-membranaires (ABCs) et les protéines cuticulaires (UDP-GT) (Hemingway *et al.*, 2004).

- **Monoxygénases à cytochrome P450**

Les cytochromes P450s sont une superfamille d'enzymes que l'on rencontre chez tous les organismes (Scott *et al.*, 1998). Ces enzymes qui se caractérisent par une grande diversité génétique et une faible spécificité de substrats sont impliquées dans la détoxification de nombreuses substances endogènes (hormones, stéroïdes, acides gras) ainsi que des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxines, polluants...) (Scott *et al.*, 1998). Elles sont appelées mono-oxygénases car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Les CYPs présentent un large spectre d'activités catalytiques. Chez l'homme, *CYP1A1* peut métaboliser plus de 90 substrats (Rendic, 2002), *CYP2D6* plus de 30 médicaments (Guengerich *et al.*, 1995) alors que *CYP7A1* n'a qu'un substrat connu. Aussi, plusieurs CYPs peuvent métaboliser le même substrat témoignant d'une redondance fonctionnelle. L'étude du rôle des CYPs dans la biodégradation des xénobiotiques est ainsi d'autant plus difficile, surtout que le changement d'un acide-aminé dans leur séquence peut modifier la spécificité de substrat (Lindberg et Negishi, 1989). Ce phénomène est aussi observé chez *An. funestus* chez qui une variation allélique des gènes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* impacte grandement le métabolisme des pyréthrinoides (Ibrahim *et al.*, 2015).

À cause du grand nombre de CYPs répertoriés, une classification claire et fonctionnelle a été faite. Les gènes codant pour des CYPs sont désignés par le préfixe CYP suivi d'un numéro pour la famille, d'une lettre pour la sous-famille et enfin d'un numéro pour le gène. Les différentes versions alléliques d'un même gène sont différenciées par un indice v1, v2... (ex : *CYP6B1v2*) (Feyereisen, 1999). Les CYPs sont classés en fonction de leur séquence protéique. Plus précisément, le pourcentage d'acides aminés identiques ainsi que les relations

phylogénétiques sont utilisés. Chez *An. funestus*, deux gènes du cytochrome P450 dupliqués *CYP6P9* et *CYP6P4* sont associés à la résistance aux pyréthriinoïdes principalement au Mozambique et au Malawi (Wondji *et al.*, 2009, Riveron *et al.*, 2013) tandis que les gènes *CYP6P3* et *CYP6M2* sont les plus impliqués à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* (Djouaka *et al.*, 2008, Mitchell *et al.*, 2012). Les analyses génomiques chez *An. gambiae* ont révélé un total de 111 monoxygénases à cytochrome P450 (Ranson *et al.*, 2002).

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

- **Glutathion S-transférases**

Les glutathion S-transférases catalysent la détoxification d'un grand nombre de xénobiotiques avec le groupement thiol du glutathion sous forme réduite. Ceci aboutit à la formation de métabolites moins toxiques, plus hydrophiles et donc facilement excrétables (Enayati *et al.*, 2005). Les GSTs sont groupés en deux formes : cytosolique et microsomale. Seulement quatre GSTs microsomales ont été répertoriés chez les insectes : une chez *Drosophila melanogaster* et trois chez *An. gambiae*. Les GSTs cytosoliques sont les plus importants car impliqués dans la résistance aux insecticides (Hemingway *et al.*, 2004). On distingue actuellement six classes : Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta et Zeta (Enayati *et al.*, 2005). Les GSTs sont naturellement présentes chez les insectes, jouant différents rôles tels la détoxification de xénobiotiques, le transport intracellulaire de composés lipophiles, la biosynthèse des hormones, etc. (Enayati *et al.*, 2005). Une augmentation du niveau d'expression des GSTs peut être responsable de la résistance aux organophosphorés (Huang *et al.*, 1998), aux organochlorés (Riveron *et al.*, 2014) et aux pyréthrinoïdes (Vontas *et al.*, 2001; Riveron *et al.*, 2014). La détoxification peut aussi se faire indirectement, comme avec les pyréthrinoïdes où les GSTs contribuent à la résistance en séquestrant les métabolites secondaires issus des réactions d'oxydation par les cytochromes P450 (Kostaropoulos *et al.*, 2001). Les mesures d'activités globales des GSTs ont montré des variations importantes à différents stades de développement des moustiques. Leurs concentrations augmentent avec l'évolution des stades larvaires, atteignent un maximum au stade nymphal et déclinent durant le stade adulte. De plus, l'expression tissulaire est également fortement variable. Certaines GSTs sont surexprimées dans les corps gras et l'intestin des insectes, tissus connus pour leurs rôles importants dans la détoxification des xénobiotiques (Enayati *et al.*, 2005).

Chez *An. funestus*, une importante découverte a été faite en 2014 où une mutation (C/T) sur le gène *GSTe2* a été retrouvée impliquée dans la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes

chez ce vecteur du paludisme (Riveron *et al.*, 2014). Cette découverte a permis de concevoir le premier marqueur de la résistance métabolique basé sur l'ADN chez les moustiques. En effet, l'étude avait démontré que le changement d'un seul codon (L119F) sur le gène *GSTe2* (enzyme de détoxification) chez *An. funestus* confère une résistance croisée au DDT et à la perméthrine.

L'évaluation de la distribution de ce marqueur de la résistance métabolique à travers le continent a montré que l'allèle résistant 119 F corrélait au profil de résistance au DDT en Afrique (Riveron *et al.*, 2014). Autrement dit, l'allèle résistant 119 F a été fixé chez les moustiques collectés au Bénin qui sont hautement résistants au DDT mais totalement absent chez les populations d'Afrique australe entièrement sensibles à cet insecticide. Cet allèle de résistance a été également détecté dans d'autres populations d'*An. funestus* d'Afrique de l'Ouest résistantes au DDT avec une fréquence de 48,2%, 44,2% et 25% au Cameroun, au Ghana et au Burkina Faso respectivement, et corrélait avec les niveaux de résistance au DDT précédemment rapportés dans ces pays. Par ailleurs, l'allèle résistant 119F a été détecté en Ouganda aussi (20,4%) et au Kenya (7,8%) mais à de très faibles fréquences conformément au niveau de résistance modéré au DDT antérieurement signalé dans ces pays.

- **Estérases**

Les estérases sont des molécules qui hydrolysent les liaisons ester et de ce fait, jouent un rôle important dans le métabolisme des organophosphorés, des carbamates et des pyréthri-noïdes. Les estérases confèrent une résistance en se liant rapidement aux insecticides et en ralentissant leur turnover, les empêchant d'atteindre leur site d'action. Pour une action effective, la quantité d'enzymes doit de loin dépasser celle des molécules insecticides. Cette surproduction enzymatique peut être due soit à une amplification génique (modification génomique spontanée pouvant augmenter le nombre de copies d'un ou plusieurs gènes), une altération de l'expression des gènes ou une sur-régulation (augmentation de la production d'une

enzyme sans augmentation du nombre de copies du gène) ou de certaines mutations ponctuelles (Haubruge et Amichot, 1998). Par exemple, la surexpression des estérases *esta21* et *estβ21* est responsable de 90% des résistances aux organophosphorés chez *Culex quinquefasciatus* (Huang *et al.*, 1998).

I.3.5.2.3. Résistance comportementale (éthologique)

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

I.3.5.2.4. Résistance cuticulaire (physiologique)

Le taux de pénétration des insecticides est un important paramètre de toxicité. La réduction de ce taux peut se faire par modification de la composition chimique de l'exosquelette (cuticule) des moustiques. La cuticule est un milieu biologique complexe ayant des propriétés physico-chimiques particulières, notamment une très forte lipophilie. Ces caractéristiques en font un acteur potentiellement important de la résistance aux insecticides chimiques, car les molécules utilisées sont souvent très hydrophobes et agissent par contact. Ce faible taux de pénétration donne plus de temps aux enzymes de détoxification pour métaboliser les molécules insecticides, aboutissant à une meilleure survie des moustiques comme observé chez *An. gambiae*, (Awolola *et al.*, 2009). Seul, ce mécanisme offre une résistance moindre comparé aux autres mécanismes physiologiques, mais combiné à des mécanismes de détoxification, ils

peuvent ensemble générer des niveaux bien plus importants de résistance (résistance multiplicative) tel qu'observé pour la résistance aux pyréthrinoides chez *An. gambiae* (Djouaka *et al.*, 2008).

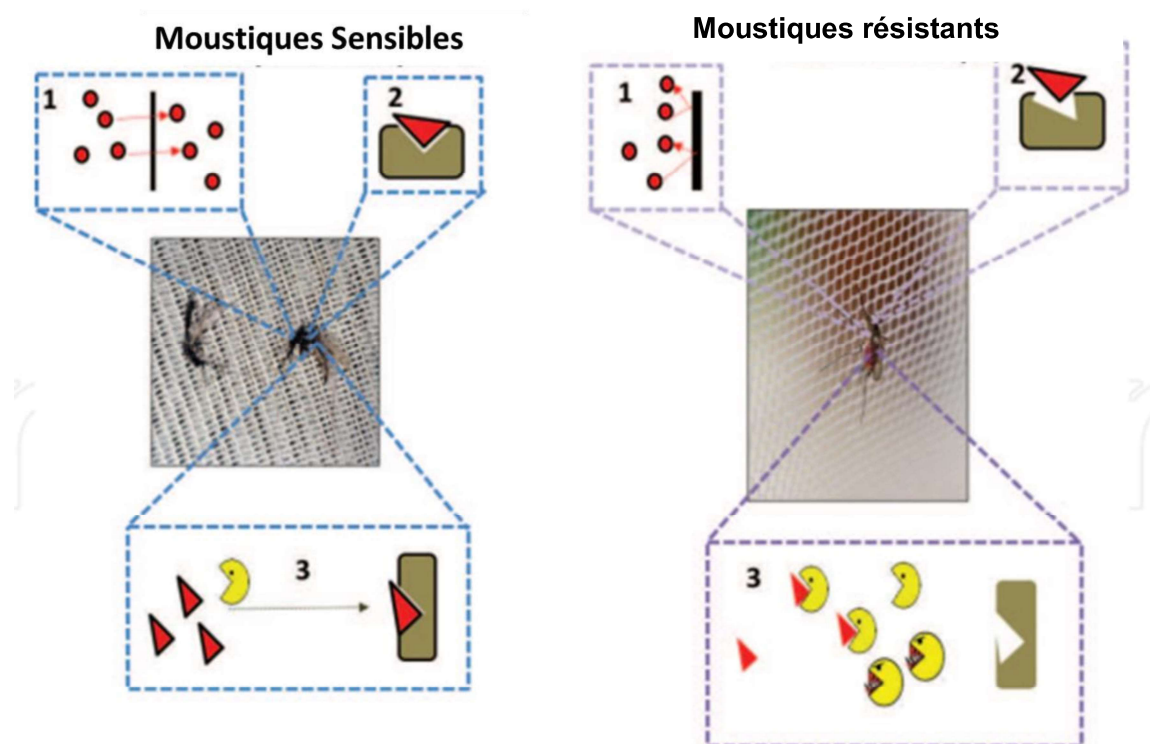


Figure 10 : Illustration des mécanismes physiologiques de résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme.

- (1) **Résistance cuticulaire** : les modifications physiologiques de la cuticule des moustiques empêchent l'absorption ou la pénétration d'insecticide. (2) **Résistance du site cible** : les insecticides ont un site cible à l'intérieur du moustique. Ce site peut être modifié afin que l'insecticide ne s'y lie plus. (3) **Résistance métabolique** : les systèmes enzymatiques améliorés décomposent les insecticides avant qu'ils ne produisent l'effet toxique sur le moustique. Les petits cercles et triangles rouges représentent l'insecticide, la barre verticale noire quant à elle représente la cuticule tandis que les demi-cercles jaunes représentent les enzymes de détoxification.

I.3.5.3. Types de résistances

Les trois termes ci-dessous sont souvent employés pour décrire les modèles de la résistance des insectes aux insecticides à savoir la résistance croisée, résistance multiple et résistance multiplicative.

On parle de **résistance croisée** lorsqu'un seul mécanisme est responsable d'une résistance simultanée à plusieurs familles d'insecticides. Un tel phénomène s'observe généralement dans le cas des molécules ayant le même site d'action ou lorsqu'elles sont métabolisées par les mêmes enzymes. C'est le cas avec les organochlorés et les pyréthriinoïdes qui ont des cibles et des modes d'actions relativement similaires (Lepoivre, 2003).

La résistance est dite **multiple** lorsqu'elle est conférée par plusieurs mécanismes chez un insecte. Par exemple, un insecte possédant deux mutations distinctes qui le rendent résistant à deux familles d'insecticides avec des modes d'action différents (Perera *et al.*, 2008).

On parle de **résistance multiplicative** lorsque le niveau de résistance conférés par plusieurs mécanismes chez un insecte sera plus élevé que la somme des niveaux de résistance conféré par ces mêmes mécanismes présents seul chez cet insecte (Hardstone *et al.*, 2009). Autrement dit, les mécanismes de résistances peuvent agir en synergie.

I.3.6. Coût biologique de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme

I.3.6.1. Définition

L'utilisation d'insecticide sélectionne une faible proportion d'individus possédant des allèles de résistance leur permettant de résister aux effets de l'insecticide et de survivre. Ces moustiques résistants ont la capacité de transférer ces modifications génétiques associées à la résistance à leur progéniture. Cela devrait probablement augmenter la proportion d'individus résistants dans la population. Cependant, les mutations conférant la résistance aux insecticides sont généralement associés à un coût biologique en absence de pression de sélection et peuvent modifier les fonctions physiologiques du moustique (Rowland, 1991). Le coût biologique signifie que les moustiques sensibles seront avantagés en termes de reproduction et de survie en absence d'insecticide comparés aux moustiques résistants. Par exemple, les moustiques résistants auraient une faible compétitivité pour l'accouplement (Berticat *et al.*, 2002, Platt *et al.*, 2015), une faible fécondité, un temps de développement plus long et une longévité

réduite (Rowland, 1991, Brito *et al.*, 2013, Martins *et al.*, 2012). Un tel coût biologique pouvant empêcher la propagation et la persistance des allèles de résistance au sein des populations de vecteur est le principe de la plupart des stratégies de gestion de la résistance tel que la rotation d'insecticides (WHO, 2012). Il serait donc crucial d'évaluer le coût de la résistance chez les principaux vecteurs du paludisme.

I.3.6.2. Méthodes d'étude du coût biologique de la résistance aux insecticides

Deux méthodes principales sont utilisées pour étudier le coût biologique des allèles de résistance aux insecticides (Crow, 1957). Elle se fait le plus souvent par comparaison des paramètres physiologiques, de reproduction ainsi que de la survie entre individus homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles au sein d'une même population. La deuxième méthode consiste à évaluer la fréquence des gènes de résistance au fil des générations discrètes ou chevauchantes en absence de pression d'insecticides (Roush et McKenzie, 1987).

I.3.6.3. Historique des études sur le coût biologique de la résistance aux insecticides

Crow (1957) a été le premier à prédire que les allèles de résistance seraient désavantageux pour les moustiques résistants en absence de traitement insecticide. Depuis lors, cette prédiction a été vérifiée chez les plantes pour les herbicides, les agents pathogènes et les herbivores (Simms et Rausher, 1987 ; Simms et Triplett, 1994 ; Bergelson et Purrington, 1996) chez les bactéries pour la résistance aux antibiotiques (Anderson et Levin, 1999) et chez de nombreuses autres espèces nuisibles pour la résistance aux pesticides (Roush et McKenzie, 1987 ; Coustau *et al.*, 2000). Ces études sur le coût biologique de la résistance aux insecticides en absence de traitement chimique ont été négligées jusque dans les années 1970 (Roush et McKenzie, 1987) et insuffisantes jusqu'en 2000 (Taylor et Feyereisen, 1996 ; Coustau *et al.*, 2000).

Des avancées ont été réalisées en ce qui concerne le coût biologique de la résistance du site cible chez les vecteurs du paludisme et d'arboviroses du fait de l'existence des marqueurs génétiques de ce mécanisme tel que pour le gène *kdr*. En effet, plusieurs études ont montré que dans certains cas, la résistance aux insecticides, notamment la résistance du site cible entraîne une diminution de la longévité des vecteurs, une diminution de l'infectiosité et un changement de comportement, ce qui réduirait la capacité vectorielle de l'insecte (Rivero *et al.*, 2010). D'autres études ont montré par ailleurs que cette résistance du site cible entraînerait une baisse de la fécondité, de la fertilité et même de la compétitivité d'accouplement des mâles (Rowland, 1991, Rowland, 1991, Berticat *et al.*, 2002, Brito *et al.*, 2013, Platt *et al.*, 2015). Cependant, peu d'informations existent sur le coût biologique de la résistance métabolique du fait de l'absence des marqueurs moléculaires pour détecter ce mécanisme.

En ce qui concerne le vecteur *An. funestus*, la seule étude menée sur le coût biologique de la résistance a été réalisée en 2007 (Okoye *et al.*, 2007). Due à l'absence de marqueur de la résistance, cette étude a été réalisée en comparant le temps de développement larvaire, la fécondité et la survie entre FUMOZ (une souche résistante aux pyréthriinoïdes originaire du Mozambique) et Fang (une souche entièrement sensible aux insecticides originaire d'Angola). L'étude avait montré que la résistance chez FUMOZ n'entraînait aucun coût sur les traits de vie de cette souche en condition de laboratoire. La principale limite de cette étude était liée au fait que ces souches aient été maintenues en laboratoire pendant plusieurs années avant l'étude et de ce fait les observations reflètent très peu la situation sur le terrain. De plus ces souches provenaient de deux localités géographiques distinctes donc de patrimoines génétiques différents. D'énormes progrès ont été réalisés récemment, notamment chez cette espèce, avec la découverte de marqueurs moléculaires pour la résistance à base de glutathion S-transférase (L119F-GSTe2) (Riveron *et al.*, 2014) et à base de cytochrome P450

(*CYP6P9a*) (Weedall et al 2019). Ces nouveaux marqueurs offrent une grande opportunité pour évaluer l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie ainsi que la transmission du paludisme. Cette étude est donc la première à évaluer le coût biologique de la résistance métabolique chez les vecteurs du paludisme.

I.4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉES À L'ETUDE DU PALUDISME

I.4.1. Extraction d'ADN

En biologie moléculaire le matériel biologique de base est l'ADN. L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler le matériel génétique des cellules ou des tissus d'organismes vivants ou morts. Différentes variantes sont employées, suivant que l'on cherche à extraire de l'ADN génomique (issu du ou des chromosomes des cellules analysées) ou de l'ADN plasmidique (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*). Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi. Toutefois le schéma est le même pour tous les protocoles à savoir :

- La lyse des cellules par broyage dans un tampon fait des détergents ayant pour rôle d'émulsifier les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines, particulièrement celles liées à l'ADN dans la chromatine.
- L'élimination des protéines du broyat au moyen de solvants organiques (en général du phénol/chloroforme) et récupération de l'ADN en solution dans la phase aqueuse supérieure par décantation ou par centrifugation.
- L'élimination des autres acides nucléiques (ARN...) par addition des ribonucléases qui vont hydrolyser sélectivement l'ARN en laissant l'ADN intact.

- La concentration de l'ADN par précipitation suite à un ajout d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse.

L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches telles que le séquençage, la PCR ou le clonage.

I.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chain reaction*)

La réaction de polymérisation en chaîne ou en anglais "polymerase chain reaction" (PCR) est une méthode d'amplification génique *in vitro* permettant de multiplier en grand nombre une séquence ciblée d'ADN ou d'ARN. Cette technique a connu plusieurs améliorations depuis sa mise au point par kary Mullis en 1985. De nos jours, l'on distingue la PCR classique et la PCR en temps réel avec plusieurs variantes.

I.4.2.1. PCR classique

La PCR permet l'amplification d'une séquence d'ADN particulière (l'amplicon). La limitation de cette séquence se fait grâce à des couples d'amorces spécifiques : une amorce "sens" qui se fixe sur l'un des brins d'ADN et une amorce "antisens" qui se fixe sur l'autre brin. Cette amplification se fait par réplifications successives grâce à l'enzyme spécifique appelé "Taq polymérase" et en présence de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) et d'ions magnésium qui sert de cofacteur. Elle se déroule en trois étapes (**Figure 11**) à savoir :

- ✓ la dénaturation consiste à déshybrider l'ADN double brins à haute température et à casser la structure secondaire de la molécule ;
- ✓ l'hybridation est la fixation des amorces spécifiques sur l'ADN matrice à des températures qui leurs sont thermodynamiquement favorables ;
- ✓ l'élongation est la phase de synthèse des brins d'ADN complémentaires des brins matrices par l'enzyme de polymérisation à partir des dNTPs libres.

Les températures sont spécifiques pour chaque étape et varient en fonction de l'enzyme utilisée. Les transitions de températures sont assurées par un thermocycleur. À la fin d'un

cycle, on obtient le double de la quantité initiale d'ADN, soit 2^n fois plus d'ADN après n cycles car chaque nouveau brin formé sert de matrice à la synthèse d'un autre brin.

Cette technique est utilisée en lutte antivectorielle pour le génotypage des marqueurs de la résistance aux insecticides et il existe plusieurs variantes mais nous nous attarderons uniquement sur celles utilisées dans cette étude :

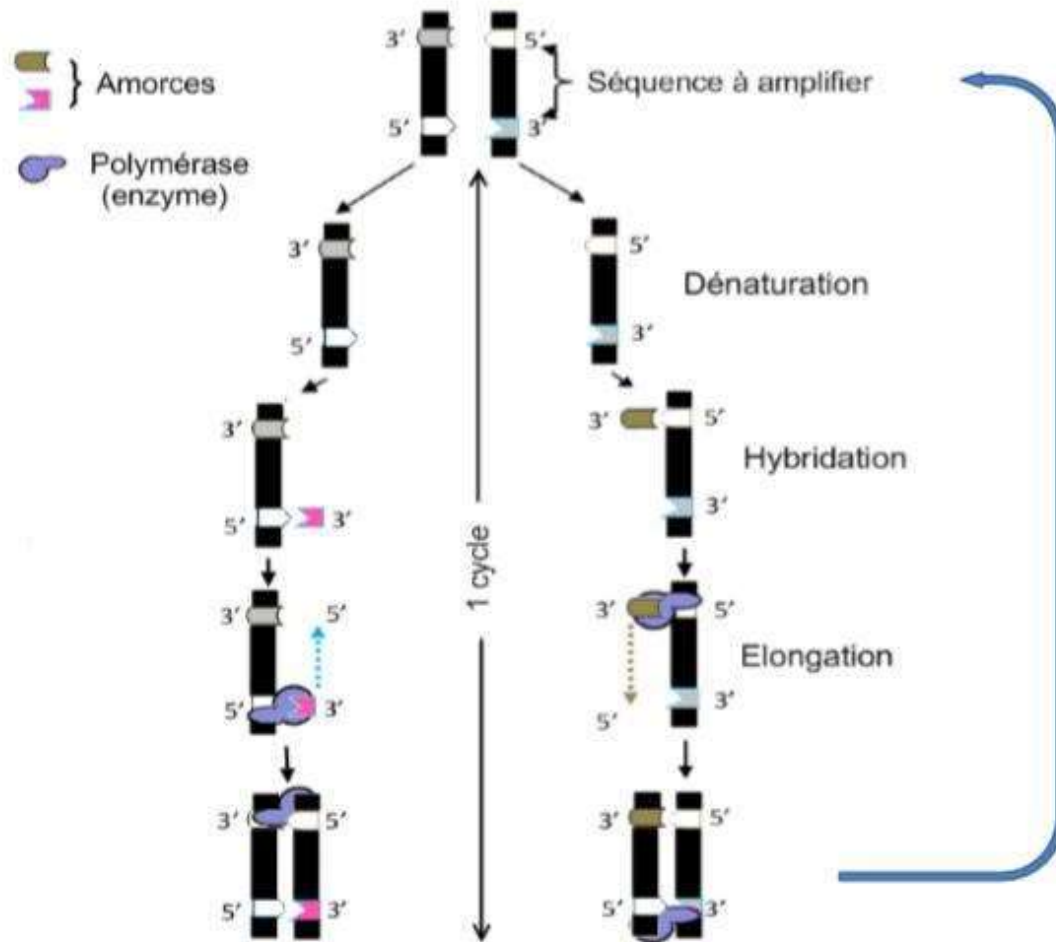


Figure 11 : Illustration des différentes étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

- **Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP, de l'anglais *restriction fragment length polymorphism*)**

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un

point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce et permet également l'étude des mutations géniques. Il est important de noter qu'une enzyme peut évidemment couper à plusieurs endroits le long de la séquence. La digestion enzymatique de la séquence d'ADN générera plusieurs fragments de longueurs différentes qui pourront ensuite être séparés par électrophorèse chaque fragment correspondant à un génotype dans le cadre d'une mutation.

- **PCR allele spécifique (AS-PCR, de l'anglais *Allele Specific-PCR*)**

L'AS-PCR est à rapprocher de la PCR spécifique standard. Elle permet la détection directe de toute mutation ponctuelle dans l'ADN humain ou animal après visualisation des produits de PCR sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. C'est une PCR multiplexe où plusieurs amorces spécifiques sont introduites en même temps. Dans cette technique, une amorce oligonucléotidique qui forme une non-hybridation (*mismatch*) du côté 3' avec la matrice d'ADN et donc réfractaire à l'extension de l'amorce par l'ADN polymérase est nécessaire pour la discrimination allélique. Par conséquent, des amorces oligonucléotidiques spécifiques de tous les allèles connus peuvent être synthétisées et utilisées pour détecter les allèles sur des séquences d'ADN de génotype inconnu. L'AS-PCR a déjà été utilisé dans le diagnostic des maladies génétiques et infectieuses mais aussi dans le génotypage à l'aide de marqueurs génétiques.

1.4.2.2. PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR)

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique) avec pour différence une amplification mesurée de la quantité d'ADN cible synthétisé non pas à la fin mais tout au long de la réaction. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un

marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN de départ. Il existe plusieurs techniques pour la réalisation des qPCR : SybrGreen, TaqMan, Beakon, HybProbes...

Nous allons expliquer ici la technique TaqMan qui est celle utilisée dans ce travail pour la détection de l'infection plasmodiale et le génotypage à l'aide de marqueurs de résistance. Pour la PCR en temps réel, un oligonucléotide est ajouté en même temps que les amorces. Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier située entre les deux amorces (appariement de l'oligonucléotide et des deux amorces au cours de l'étape d'hybridation). Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non (**Figure 12**).

Lorsque le reporter et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée par le quencher. Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y a séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable. Il y a alors émission de la fluorescence car le fluorochrome s'éloigne du groupement quencher. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR. On peut suivre ainsi l'amplification de la séquence cible après chaque cycle (**Figure 12**), d'où le terme de "PCR en temps réel". Les sondes fluorescentes se fixent soit sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon), soit sur l'ADN double brin (technologie SybrGreen). Pour des échantillons de bonne qualité, on s'attend à avoir des débuts d'amplification aux environs du 20ème cycle. Plus faible sera la concentration et/ou la qualité de l'ADN, plus le signal d'amplification sera tardif.

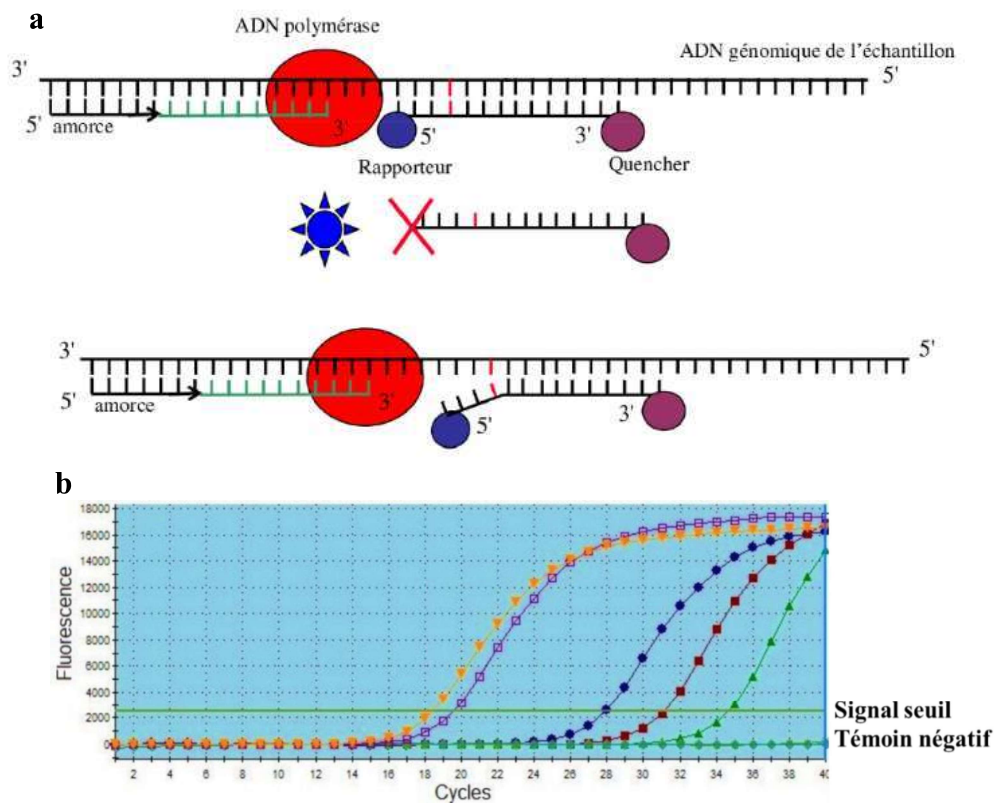


Figure 12 : Principe du génotypage par TaqMan (a) et courbes sigmoïdes représentant l'amplification des échantillons d'ADN obtenues après une PCR quantitative (qPCR) (b).

Chaque courbe correspond à un échantillon et représente la mesure de la fluorescence de cet échantillon lors de chaque cycle de la PCR. Le signal seuil calculé automatiquement est matérialisé sur le graphe par une ligne horizontale.

I.4.3. Électrophorèse et révélation des produits d'amplification par PCR

L'électrophorèse est une technique permettant la séparation des molécules porteuses de charges électriques à l'instar des 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 qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge électrique totale, masse moléculaire, nature du support, conditions physico-chimiques), la vitesse de migration varie permettant la séparation des différentes molécules.

Le gel est préparé à une concentration précise à l'aide de la micro-onde et après refroidissement, un intercalant (Bromure d'Ethidium ou *Midori Green*) est ajouté et la solution est coulée dans un moule d'électrophorèse muni d'un peigne qui formera des puits après refroidissement. La migration se déroule le plus souvent sous une tension d'environ 150 volts à 300 mA pendant environ une trentaine de minutes. A la fin de l'électrophorèse, les bandes sont révélées par un Trans-illuminateur à lumière ultraviolette pour la détection des différentes bandes témoins d'amplification.

I.4.4. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Actuellement, la plupart des séquençages d'ADN sont réalisés par la méthode développée par Sanger et al. (1977). Celle-ci est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire suite à une incorporation aléatoire par l'ADN polymérase des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) dépourvus de groupements 3' hydroxyles lors de l'élongation. L'incorporation de ces ddNTP bloque la synthèse de l'ADN en empêchant la formation de la liaison phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5'phosphate du dNTP suivant.

Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une enzyme, la séquenase (une ADN polymérase I dépourvue d'activités exonucléasiques 5'→3' et 3'→5'). Les quatre désoxynucléosides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoxy nucléosides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxy nucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont

ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. On obtient ainsi l'ordre de succession des nucléotides constitutifs de la séquence d'ADN

CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES

II.1. CADRE GEOGRAPHIQUE

L'étude a été menée dans trois localités du Cameroun où *Anopheles funestus* avait été répertorié par le passé et où la résistance aux insecticides a été signalée. Les moustiques utilisés pour cette étude ont été collectés à Mibellon (6°46'N, 11°70'E) et Tibati (6°28' N, 12°37'E) (Adamaoua, Cameroun) et Obout (3°7'0"N, 11°65'0"E) (Centre, Cameroun). Des moustiques de laboratoire issus des croisements entre la souche FUMOZ (résistante) et la souche FANG (sensible) ont été également utilisés.

II.1.1. Site d'étude d'Obout

Obout est un petit village de la région du Centre, situé dans le département de la Mefou et Afamba, à 3km du chef-lieu Mfou (**Figure 13**). C'est une zone rurale d'environ 200 habitants et les activités des habitants sont essentiellement une agriculture de subsistance.

Le climat est de type équatorial guinéen, marqué par quatre saisons : une grande saison pluvieuse de mi-août à mi-novembre, une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars, une petite saison pluvieuse de mi-mars à mi-juin et une petite saison sèche de mi-juin à mi-août. Les températures mensuelles varient entre 19° et 29°C (Suchel, 1988). L'hydrographie est dominée par le fleuve Mefou et ses affluents. Mais on y trouve aussi plusieurs autres milieux aquatiques liés ou non aux activités Anthropiques (lacs, étangs, marécages, mares d'eau quasiment permanentes dans les zones de fortes activités agro-pastorales.) bordés de végétation qui constituent des gîtes potentiels d'*An. funestus* s.l. et d'*An. gambiae* s.l. La plupart des maisons sont faites en matériaux provisoires, terre battue, planches sur pilotis, sans plafond avec de nombreuses ouvertures facilitant l'accès aux moustiques. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides distribuées à grande échelle par le gouvernement sont utilisées par les populations.

Le choix du site d'étude s'est fait sur la base des résultats des enquêtes entomologiques antérieures effectuées dans la localité d'Obout qui avait montré une forte abondance d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. funestus* s.l. (C. Ndo ; données non publiées).

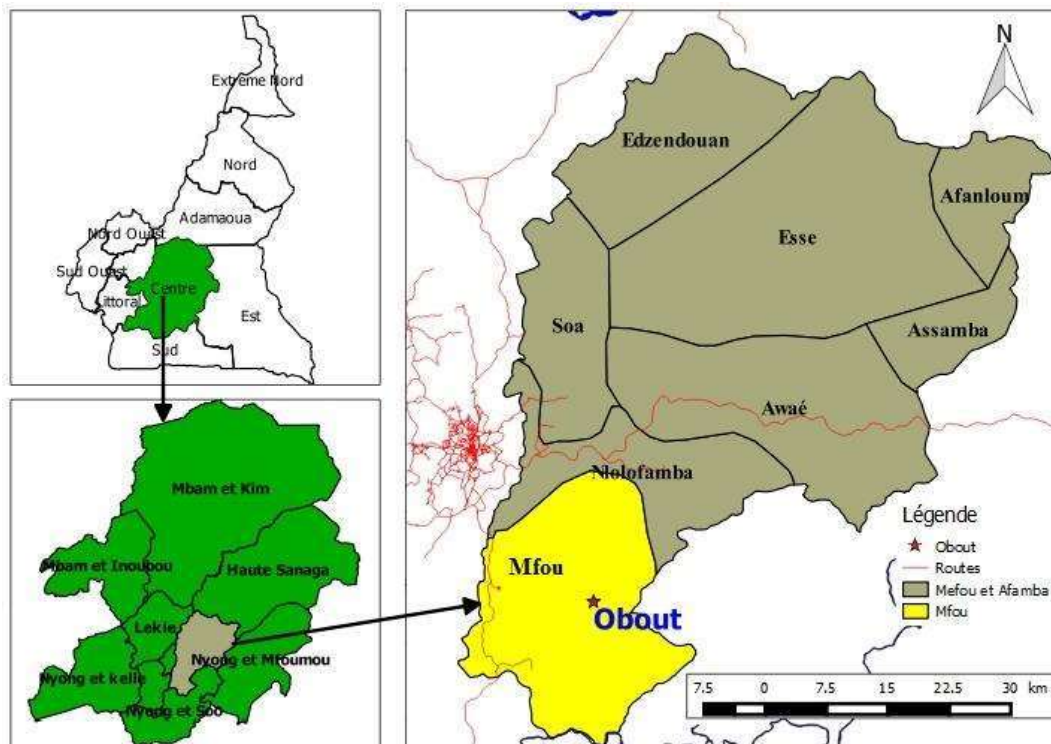


Figure 13 : Localisation du site de collecte d'Obout.

Source : INC 2017 révisée.

II.1.2. Site d'étude de Mibellon

Mibellon est situé dans la région de l'Adamaoua, département du Mayo-Banyo, arrondissement de Bankim. Mibellon est situé au milieu d'une savane arbustive (**Figure 14**) à environ 75Km de Foumban. C'est un village d'environ 200 habitants qui pour la plupart sont des cultivateurs. Les maisons y sont en grande majorité construites en terre battue et recouvertes de paille ou de tôle. On note entre les murs et le toit la présence de nombreux interstices servant de voie d'entrée et de sortie aux moustiques. Dans ce village, la principale méthode de lutte antivectorielle mise sur pied est l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (utilisée par plus de 70% de la population). Aux abords du village, on note la présence d'un

lac bordé d'une végétation émergente. Ce site a été choisi car l'espèce *An. funestus* y a précédemment été reporté (Ndo, communication personnelle).

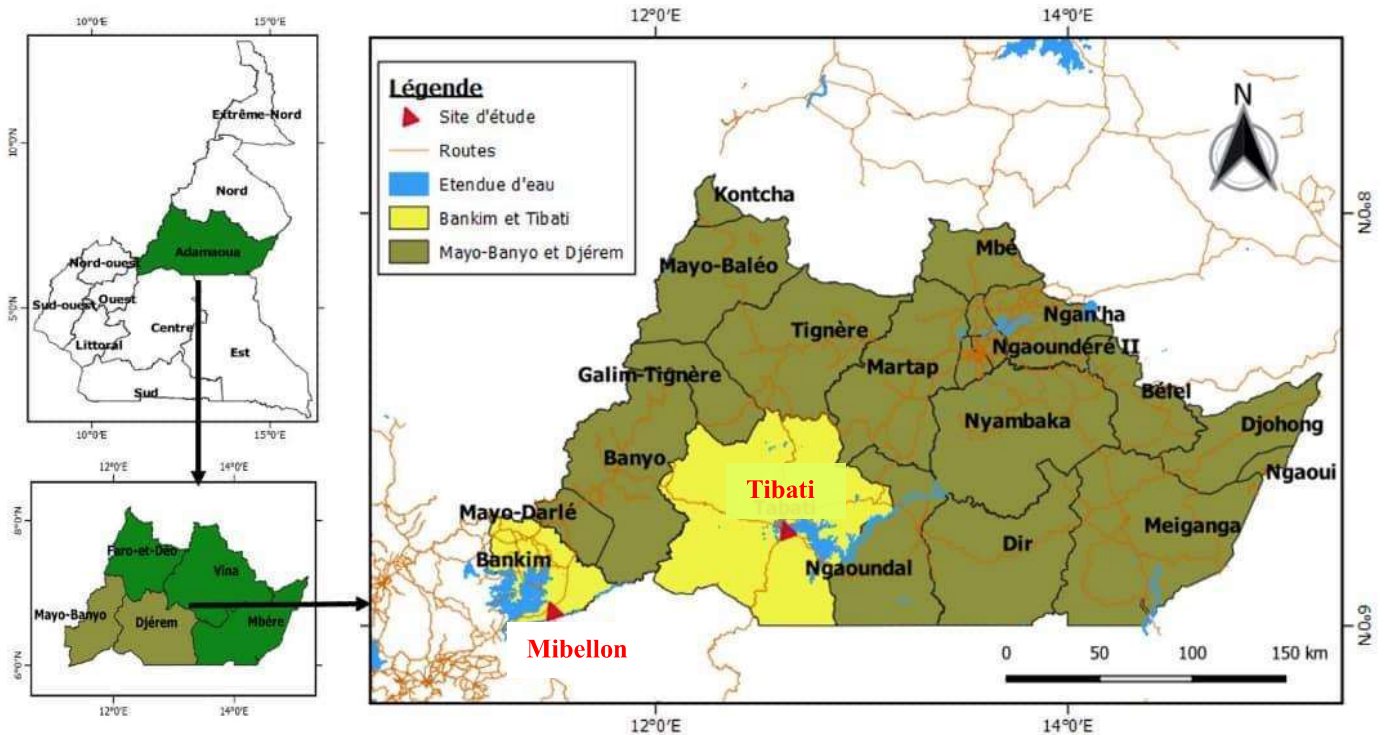


Figure 14 : Localisation des sites de collecte de Mibellon et Tibati.

Source : INC 2018 révisée.

II.1.3. Site d'étude de Tibati

Tibati est une commune du Cameroun située dans la région de l'Adamaoua et dans le département du Djérem (**Figure 14**). Le village est entouré d'une forêt d'eucalyptus et bordée par le lac de Mbakaou. L'arrondissement de Tibati est limité au Nord, par les arrondissements de Galim-Tignère et de Tignère (département de Faro et Déo) et l'arrondissement de Martap (département de la Vina). À l'Est, il est limité par l'arrondissement de Ngaoundal, au Sud par l'arrondissement de Yoko (département du Mbam et Kim) et à l'Ouest, par l'arrondissement de Banyo (département du Mayo-Banyo), sur le pont de Mbanti-Katarko.

Le lac Mbakaou est très poissonnier et offre également des conditions favorables au développement des moustiques. Il est caractérisé par un climat de type tropical humide avec deux saisons, une saison pluvieuse de huit mois (mars à octobre) et une saison sèche qui dure quatre mois (novembre à février). La température moyenne annuelle est de 23,6°C (Suchel, 1988). Les sols ici sont ferrallitiques et souffrent d'érosions pluviales. L'hydrographie est dominée par le fleuve Djérem et ses affluents, et la végétation est constituée de la savane soudano – guinéenne.

La commune de Tibati compte environ 108 502 habitants (recensement de 2005) de plusieurs groupes ethniques vivant principalement de l'élevage, de l'agriculture, du petit commerce, de la pêche, de l'apiculture et de l'artisanat.

Tous ces villages inclus dans cette étude ont bénéficié de la distribution universelle des MILDA en 2011 et 2016. En raison de la pression de sélection élevée d'insecticide contenu dans les MILDA, les principaux vecteurs du paludisme auraient développé une résistance aux pyréthrinoïdes utilisés dans les moustiquaires.

II.2. MATERIEL ET METHODES

II.2.1. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique aux insecticides médiée par le glutathion S-transférase

II.2.1.1. Échantillonnage et identification morphologique des moustiques

La collecte des femelles sauvages d'*An. funestus* s'est faite à l'aide de l'aspirateur électrique (**Figure 15**). La technique consiste à collecter les moustiques endophiles en se servant d'un aspirateur électrique et d'une lampe torche comme source d'éclairage. L'aspirateur est constitué d'un ventilateur qui crée un flux d'air attirant les moustiques dans une boîte dont le fond est muni d'un grillage à mailles fines. Une fois en marche, il est baladé en direction de

tous les coins de l'habitation où peuvent se reposer les moustiques (angle du mur, sous le lit, sous la moustiquaire, vêtements etc ...). Après 30 à 45 secondes d'aspiration dans chacun de ces points, la boîte est refermée à l'aide d'un couvercle et une fois le ventilateur à l'arrêt, les moustiques sont transférés dans une cage prévue à cet effet. Les moustiques collectés sont identifiés morphologiquement à l'aide des clés spécifiques d'identification (Gillies et De Meillon, 1968, Gillies et Coetzee, 1987). Chaque femelle d'*An. funestus* s.l. a été ensuite placée dans un tube Eppendorf de 1,5ml pour pontes individuelles après un séjour de quatre à cinq jours à l'insectarium (temps au bout duquel ces femelles deviennent gravides) suivant le protocole précédemment décrit (Morgan *et al.*, 2010). Les pontes individuelles ainsi recueillies sont mises dans des gobelets en carton contenant de l'eau minérale pour éclosion. Les femelles sauvages ont été utilisées pour l'évaluation de l'impact de la mutation L119F sur la fécondité. En outre, l'influence de cette mutation sur le temps de développement larvaire ainsi que la longévité des adultes a été évaluée sur les individus de première génération (G1) issus de ces femelles sauvages.



Figure 15 : Dispositif de collecte des moustiques adultes à l'intérieur des maisons.

II.2.1.2. Identification moléculaire des espèces du groupe *Anopheles funestus*

Les moustiques utilisés dans cette étude ont d'abord été confirmés au niveau moléculaire comme étant *An. funestus* s.s car *An funestus* est un groupe d'espèces morphologiquement identiques à l'état adulte. Après extraction d'ADN par la technique de Livak, (Livak, 1984), l'identification des espèces du groupe *An. funestus* a été faite sur la base d'une PCR multiplexe ciblant la région ITS2 (*Internal Transcribed Spacer Region two*) de l'ADN ribosomal (Koekemoer *et al.*, 2002, Cohuet *et al.*, 2003). Le milieu réactionnel était composé de 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10×, 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0.04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume finale de 15 µL. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 45°C, 40 secondes à 72°C) suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Les produits de PCR ont été révélés sur gel d'agarose 1.5% sous une tension de 150 volts à 300 mA pendant environ 35 minutes. A la fin de l'électrophorèse, le gel a été porté dans un Trans-illuminateur à lumière ultraviolette pour la révélation des différents fragments d'amplification.

II.2.1.3. Évaluation du profil de résistance aux insecticides et de la bio-efficacité des moustiquaires imprégnées sur les populations naturelles d'*Anopheles funestus*

Dans cette étude, avant d'évaluer le coût biologique de la mutation L119F-GSTe2 sur les différents traits de vie d'*An. funestus*, le profil de résistance aux insecticides a tout d'abord été établi par la méthode de tests en tube et en cône de l'OMS.

II.2.1.3.1. Méthode de tests en tube

Ces tests ont été effectués sur des moustiques adultes (G1) âgés de 2 à 5 jours suivant le protocole de l'OMS (OMS, 2016) (Figure 16).

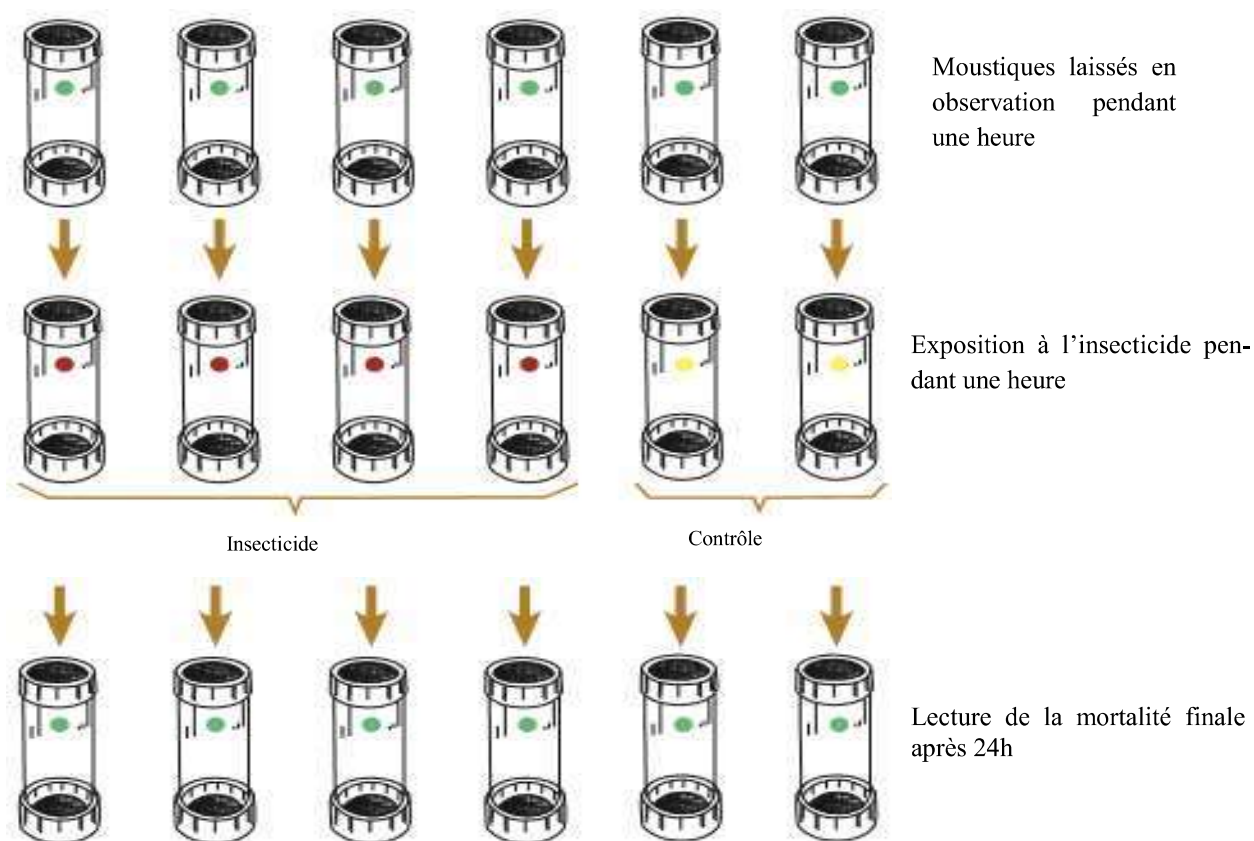


Figure 16 : Procédure du test de sensibilité aux insecticides à l'aide des tubes de l'OMS.

Les insecticides utilisés appartenait à quatre classes : trois Pyréthri-noïdes (Permé-thrine 0,75%, Deltaméthrine 0,05%, Etofenprox 0.5%) et un organochloré (DDT 4%), deux carbamates (Bendiocarbe 0,1% et Propoxur 0,1%) et deux organophosphorés (Fénitrothion 1%, Pirimiphos-methyl 0.25%). En outre, en fonction du taux de mortalité, des tests associant les pyréthrinoides aux synergistes Piperonyl butoxyde (PBO) à 4% et diéthyl maléate (DEM) à 8% ont également été réalisés pour évaluer l'implication des enzymes de détoxification (P450 et GSTs) dans la résistance aux insecticides. Le PBO est un inhibiteur des enzymes de

la famille des cytochromes P450 tandis le DEM est un inhibiteur des glutathion S- transférases

A l'issue de ces tests, l'interprétation des résultats se fait comme décrit ci-dessous (OMS, 2016) :

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

Le test n'est valide qu'en cas d'une mortalité inférieure à 5% dans le groupe témoin. Néanmoins, si la mortalité du témoin est comprise entre 5% et 20%, la mortalité du test devra être corrigée par la formule d'Abott (1925) comme suit :

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

Par contre, si la mortalité chez les témoins dépasse 20%, l'expérience n'est pas valable, elle est annulée et doit être reprise. Lorsqu'après utilisation du PBO et du DEM l'on note une augmentation significative de la mortalité, alors la résistance serait principalement métabolique

II.2.1.3.2. Procédure de tests en cône

Le test en cône de l'OMS (WHO, 2013) a été utilisé pour évaluer l'efficacité des moustiquaires sur les individus de la première génération de laboratoire issus des populations naturelles d'*An. funestus*. Les moustiques de la souche de référence « souche FANG » sensibles aux insecticides ont été utilisés comme témoins pour ces tests. Les tests ont été réalisés avec des moustiquaires standard (PermaNet® 2.0 et Olyset) et des moustiquaires de seconde

génération qui contiennent en plus de l'insecticide, le synergiste PBO (Permanet 3.0 et Olyset plus).

À l'aide d'un aspirateur manuel, 10 moustiques femelles âgés de 3 à 5 jours non gorgées sont mises en contact de la moustiquaire pendant 3min sous les cônes en plastique standard de l'OMS (**Figure 17**). Après cette période d'exposition, les moustiques sont transférés dans les gobelets couverts de tuiles moustiquaires non imprégnées et à 60 min l'on dénombre ceux qui sont assommés (knock-down) et la mortalité finale est calculée après 24h d'observation. Pendant cette période d'observation les moustiques sont nourris avec une solution de sucrose à 10% en condition standard d'insectarium. Le test est fait en cinq répliquas de 10 moustiques chacun et l'interprétation se fait de la même façon que pour les tests en tube.

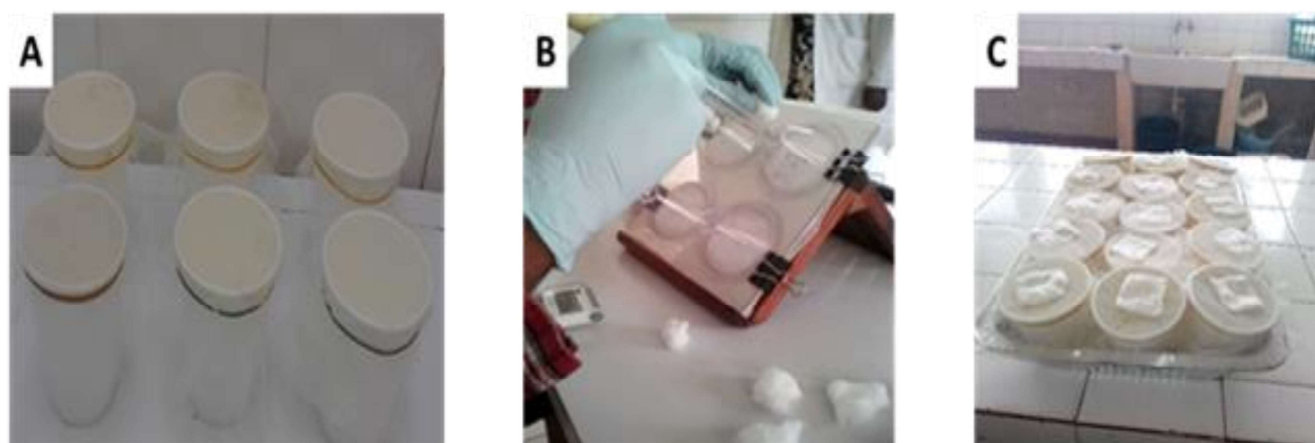


Figure 17 : Déroulement du test d'efficacité des moustiquaires à l'aide des cônes en plastique.

Conditionnement des moustiques (A), trois minutes d'exposition (B) et 24h d'observation (c).

II.2.1.4. Évaluation de l'effet de la mutation L119F au locus *GSTe2* sur les traits de vie d'*Anopheles funestus*

Le coût biologique de la mutation L119F a été évalué à l'aide des paramètres suivants : fécondité, fertilité, vitesse de développement et la survie des larves et des nymphes, longévité des adultes et compétitivité d'accouplement des mâles sauvages.

II.2.1.4.1. Évaluation de l'effet de la mutation L119F sur la fécondité et la fertilité des femelles

Les femelles sauvages gorgées collectées ont été maintenues pendant 4 jours à l'insectarium pour maturation des oeufs. Les femelles complètement gravides ont été placées individuellement dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml avec du papier filtre humide pour leur permettre de pondre des œufs comme décrit précédemment (Morgan *et al.*, 2010). Une fois que les femelles ont pondu, le nombre d'œufs pondus par femelle et le nombre de larves obtenues après éclosion ont été enregistrés. Le test de normalité de Shapiro-Wilk ayant révélé une distribution non normale des œufs, l'impact de la résistance sur la fécondité a été évalué en comparant le nombre médian d'œufs pondus entre femelles de différents génotypes à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. De plus, le rapport de côte pour le succès de ponte entre femelles homozygotes résistantes, hétérozygotes et homozygotes sensibles a également été évalué à l'aide du test probabiliste de Fisher. L'impact de la résistance sur la fertilité a été évalué en comparant le taux d'éclosion entre les génotypes à l'aide du test de Chi-carré.

II.2.1.4.2. Mesure de l'influence de la mutation L119F sur le temps de développement larvaire

Après avoir enregistré le nombre total de larves obtenues par femelle, toutes les larves des trois génotypes pour chacun des marqueurs ont été groupées et élevées dans les mêmes bols d'élevage, limitant donc de ce fait tout biais lié aux conditions environnementales. Cette expérience a été réalisée en trois réplicats de dix bacs par réplicat et tous les stades immatures ont été élevés dans des conditions standard de l'insectarium. Afin d'éviter l'effet de masse et la compétition pour la nourriture, les bols d'élevage utilisés étaient suffisamment grands. Le nombre de larves variait entre 200 et 300 par bac et l'eau était changée tous les deux jours dans chaque bac afin de minimiser les effets de la pollution provoquée par l'aliment.

Les fréquences alléliques et génotypiques ont été évaluées à chaque stade de développement après génotypage d'au moins 100 larves/nymphes. La dynamique de la formation des nymphes a été évaluée en comparant la fréquence génotypique et allélique à partir du début de la nymphose (nymphes J9), au troisième (nymphes J11) et au cinquième (nymphes J13) jour de la nymphose. Le test du chi carré et le test exact de Fisher ont été utilisés pour évaluer la différence dans la distribution des génotypes entre les stades larvaires et nymphaux obtenus à différents intervalles de temps.

II.2.1.4.3. Évaluation de l'influence de la mutation L119F sur la longévité des femelles sauvages d'*Anopheles funestus*

Pour évaluer l'influence de la mutation L119F sur la longévité des femelles, la durée de vie des moustiques adultes homozygotes résistants à ce locus a été comparée à celle des moustiques sensibles et hétérozygotes. Ceci a été fait de façon indirecte en comparant la fréquence des génotypes/allèles pour ces deux marqueurs de la résistance ainsi que le niveau d'expression (par la méthode RT-qPCR) à différents intervalles de temps (jours 1, 10, 20 et 30 après émergence des adultes). En effet, après émergence des adultes, un échantillon d'environ 150 moustiques a été retranché des cages à différents moments (J1, J10, J20 et J30). En moyenne, 100 moustiques ont été génotypés pour les différents marqueurs de la résistance tandis que 3 pools de 10 moustiques chacun ont été utilisés pour évaluer le niveau d'expression de ces gènes de résistance à chaque instant. Le test de Chi carré a été utilisé pour la comparaison des fréquences alléliques entre les différents intervalles de temps tandis que le test de Log-rank a été utilisé pour comparer les courbes de survie.

II.2.1.4.4. Évaluation de l'association entre de la mutation L119F et la compétitivité d'accouplement des mâles sauvages d'*Anopheles funestus*

La collecte d'essaims a été effectuée en février et mars 2018. La recherche d'essaims d'accouplement dans chaque village débutait au coucher du soleil vers 17h30, puis chaque essaim localisé a été caractérisé et/ou collecté pendant cette période de l'étude. Pour tous les essaims identifiés, différentes caractéristiques telles que ; i) la hauteur des essaims, ii) l'heure de début de l'essaimage, iii) le moment de la soirée où les essaims deviennent invisibles et iv) le comportement des moustiques dans les essaims ont été enregistrés. Des essaims ont été recherchés à divers endroits (autour des gîtes potentiels de reproduction, près des habitations, le long de la rue...) en recherchant également les marqueurs potentiels d'essaims. Les essaims ont ensuite été échantillonnés à l'aide de filets fauchoirs comme décrit précédemment (Dabire *et al.*, 2014, Diabate *et al.*, 2006, Platt *et al.*, 2015). Tous les couples d'*An. funestus* (mâles et femelles accouplés) ont été isolés des essaims et chaque couple a été transféré manuellement dans des gobelets en carton propres. Les mâles restants dans les essaims (qui ne se sont pas accouplés probablement) ont été collectés également. Tous les moustiques échantillonnés ont été séparés en mâles non accouplés, mâles accouplés et femelles accouplées, puis conservés dans le d'*ARN-later* pour analyses moléculaires ultérieures.

Une fois retourné au laboratoire, les génotypes au locus *GSTe2* ont été révélés et les fréquences génotypiques et alléliques pour la mutation L119F comparées entre mâles accouplés et mâles non accouplés récoltés dans les essaims. Ces fréquences ont été comparées à l'aide du test de Chi carré. Les rapports de côte ont également été estimés pour la chance d'accouplement en utilisant le test probabiliste de Fisher.

II.2.1.4.5. Technique de génotypage du locus *GSTe2* pour la recherche de la mutation L119F

Le locus *GSTe2* a été génotypé en utilisant le test diagnostique *Allele Specific-PCR* nouvellement que nous avons récemment conçu (Tchouakui *et al.*, 2018). Pour cette nouvelle technique, deux paires d'amorces ont été utilisées (deux amorces externes et deux amorces internes). Des amorces internes ont été conçues manuellement pour pouvoir discriminer les deux allèles de la mutation L119F et un changement a été fait sur le 3^e nucléotide à partir de l'extrémité 3' de chaque amorce interne pour renforcer la spécificité (Tableau II, Annexe 1).

Le milieu réactionnel contenait : 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10× (*Buffer A*, Qiagen), 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume finale de 15 µL. Après une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, 30 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C, 1 minute à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Les produits amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% contenant 1 µl de *Midori Green* (intercalant de l'ADN double brin) suivant la procédure précédemment décrite plus haut.

Tableau II : Séquences d'amorces utilisées pour révéler les génotypes au locus *GSTe2*.

Amorces	Séquence (5' - 3')
Ndel_Gste2F	GGAATTCATATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT
Xbal_Gste2 R	TCTACATCAAGCTTTAGCATTTCCTCCTT
L119F-Res	CGGGAATGTCCGATTTCCGTAGAAaTA
L119-F-Sus	CATTCTTATTCTCATTACAGGAGCGTAaTC

II.2.2. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique aux insecticides médiée par les cytochromes P450s

En raison de l'absence de l'insertion AA-CYP6P9a au sein des populations d'*An. funestus* du Cameroun, le coût biologique de la résistance métabolique médiée par les Cytochromes P450s a été évalué en utilisant la souche hybride issue du croisement entre les souches de laboratoire FUMOZ (entièrement résistante) et FANG (entièrement sensible). Le coût biologique a été évalué sur les différents traits de vie et ensuite la souche a été maintenue en condition de laboratoire (en absence de pression de sélection d'insecticide) pour plusieurs générations afin d'évaluer une potentielle restauration de la sensibilité.

II.2.2.1. Établissement de la souche hybride

FUMOZ-R est une souche entièrement résistante aux pyréthrinoïdes (perméthrine), originaire du sud du Mozambique (FUMOZ) (Hunt *et al.*, 2005) et établie comme souche de laboratoire depuis Juillet 2001. Cette souche présente de nos jours une mortalité de 0% après exposition à la perméthrine (0,75%). La souche FANG est originaire du sud de l'Angola et isolé comme colonie depuis Janvier 2003 et est entièrement sensible à tous les insecticides jusqu'à l'heure actuelle. Par ailleurs, des études antérieures ont montré que l'allèle résistant CYP6P9a-R conférant la résistance aux pyréthrinoïdes est fixé chez FUMOZ (100% homozygote résistant) alors qu'il est totalement absent chez FANG (100% homozygote sensible) (Weedall *et al.*, 2019). Afin de générer une souche hétérogène (ayant tous les génotypes) pour le locus *CYP6P9a*, des croisements réciproques ont été réalisés en janvier 2017 entre ces deux souches de laboratoire. Pour réaliser le croisement, les nymphes de chaque souche ont été collectées et placées individuellement dans des tubes Falcon de 15 ml pour émergence individuelle. Par la suite, les mâles de la souche résistante ont été mélangés dans la même cage avec

les femelles de la souche sensible (et réciproquement) pour accouplement et production de la première génération (F1).

II.2.2.2. Profil de résistance de la souche hybride.

Avant d'évaluer quel serait l'impact du gène *CYP6P9a* sur les différents traits de vie, des tests de sensibilité ont d'abord été réalisés pour établir le profil de résistance des deux souches hybrides. Ces moustiques ont été exposés aux pyréthrinoïdes (perméthrine 0,75% et deltaméthrine 0,05%), au DDT (4%) et au carbamate (bendiocarbe 0,1%) suivant le protocole de l'OMS (OMS, 2016). Dans le but d'évaluer la corrélation entre le marqueur *CYP6P9a* et la résistance aux pyréthrinoïdes, des tests supplémentaires ont été réalisés pour la perméthrine et la deltaméthrine pendant 30 et 90 minutes. Les moustiques survivants après 90 minutes d'exposition et ceux morts après 30 minutes d'exposition ont par la suite été génotypés et l'association entre l'allèle résistant *CYP6P9a-R* et la capacité des moustiques à survivre aux insecticides a été établie.

II.2.2.3. Évaluation de l'impact de l'insertion "AA" au locus *CYP6P9a* sur les traits de vie d'*Anopheles funestus*

L'impact de l'insertion AA-*CYP6P9a* sur les traits de vie d'*Anopheles funestus* a été évalué suivant le même protocole que pour le gène *GSTe2*. Le coût biologique a été estimé en termes de la fécondité et fertilité des femelles, taux de croissance et survie des larves et nymphes et enfin de la longévité des adultes.

II.2.2.4. Évaluation de la restauration de la sensibilité aux insecticides en absence de pression de sélection

Après obtention de la première génération F₁ issue des croisements ci-dessus, ces derniers ont été croisés entre eux jusqu'à la dixième génération. La dynamique de la fréquence de

l'allèle résistant CYP6P9a-R en l'absence de pression d'insecticide a été évaluée par des expériences en cage. À chaque génération, les moustiques des trois génotypes étaient élevés dans les mêmes cages pour générer la génération suivante. Chaque génération était composée d'environ 3 cages d'au moins 200 moustiques des trois génotypes par cage. A la première génération, la fréquence de l'allèle résistant CYP6P9a_R était de 50% et cette fréquence a été contrôlée à chaque génération par génotypage d'un échantillon d'environ 75 femelles âgées de 2 à 5 jours.

II.2.2.5. Protocole de génotypage du locus *CYP6P9a* pour détection de la double insertion "AA"

Le génotypage de l'allèle de résistance au CYP6P9a-R a été effectué à l'aide de la méthode PCR-RFLP décrite précédemment (Weedall *et al.*, 2019). L'amorce directe (*Forward*) et deux amorces inverses (*Reverse*) (5'-TCC CGA AAT ACA GCC TTT CAG-3 et 5'-ATT GGT GCC ATC GCT AGA AG-3) ont été utilisées pour la première étape d'amplification de la région située avant le gène *CYP6P9a* (*promoter region*). Les réactions PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique de moustiques individuels. Le mix de PCR de volume final 15 µl contenait 1,5 µl de tampon A KAPA Taq 10X (KAPA Biosystems), 0,12 µl de polymérase de KAPA Taq 5 U / µl, 0,12 µl de dNTP 25 µM, 0,75 µl de MgCl₂ 25 µM, 0,51 µl de chaque amorce, 10,49 µl de dH₂O et 1 µl d'ADN génomique. Les paramètres de la PCR étaient de 95 ° C pendant 5 minutes et 35 cycles à 94 ° C pendant 30 secondes, 58 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 45 secondes, suivis d'une étape d'extension finale de 72 ° C pendant 10 minutes. La taille (450 pb) des produits de PCR a été visualisée sur gel d'agarose 1,5% utilisant le Midori Green Advance (Nippon genetics Europe GmbH, Dueren, Allemagne) comme intercalant. Pour la deuxième étape, l'enzyme TaqI (site de restriction (5'-TCGA-3')) a été utilisée pour digérer le produit de PCR de la première étape pour détecter l'allèle résistant CYP6P9a_R comme décrit précédemment (Weedall *et al.*, 2019). Pour cette seconde étape,

10 µl du mix de digestion sont préparés à l'aide d'1 µl de tampon CutSmart, 0,2 µl de 2 unités d'enzyme de restriction TaqI (New England Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis), 5 µl de produit de PCR et 3,8 µl de dH₂O. Le mélange est incubé à 65° C pendant 2 heures et le produit est séparé sur du gel d'agarose à 2,0% avec toujours le Midori comme intercallant. Après cette deuxième étape, les homozygotes résistant (CYP6P9a-RR) présentent une bande à 350pb, les homozygotes sensibles (CYP6P9a-SS) ont une bande à 450pb alors que les individus hétérozygotes présentent les deux bandes.

II.2.2.4. Évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par la méthode de PCR en temps réel (RT-qPCR)

Les analyses PCR quantitatives par transcription inverse (qRT-PCR) ont été réalisées pour évaluer le niveau d'expression du *GSTe2* et *CYP6P9a* de J1 à J30 (après émergence) afin d'estimer l'influence de la résistance sur la longévité des femelles. Pour ce faire, L'ARN total provenant de trois réplicats biologiques des moustiques de J1, J10, J20 et J30 a été extrait à l'aide du kit d'isolation d'ARN Picopure (Arcturus) (Life Technologies, CA, USA). 1 mg d'ARN provenant de chacune des trois réplicats biologiques ainsi que de FANG (souche entièrement sensible) a été utilisé comme matrice pour la synthèse d'ADNc à l'aide du superscript III (Invitrogen, CA, USA) suivant les recommandations du fabricant. La RT- qPCR a été réalisée comme décrit précédemment (Kwiatkowska *et al.*, 2013, Riveron *et al.*, 2013) et le niveau d'expression relatif des gènes à chaque intervalle de temps calculés selon méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen et Livak, 2008) après normalisation avec les genes de ménage (*housekeeping genes*) (protéine ribosomale S7 (RSP7; AFUN007153) et actine 5C (AFUN006819)). Le milieu réactionnel a été composé comme décrit dans le tableau III et suivant les conditions du tableau IV. Le logiciel Mx Pro intégré à la machine TaqMan de marque Agilent a été utilisé.

Tableau III : Composition du milieu réactionnel pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR.

Réactifs	Volume (μ l)
SYbr green	10 μ l
10 mM amorce F	0,6 μ l
10 mM amorce R	0,6 μ l
ddH ₂ o	7,8 μ l
ADNc	1,0 μ l
Total	20 μ l

Tableau IV : Condition de PCR pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR.

Cycles	Durée	Température
1	03 min	95°
40	03 min	95°C
	10 s	60°C
1	1 min	95°C
	30 s	55°C
	30 s	95°C

II.2.3. Évaluation du coût biologique de la résistance métabolique sur la compétence et la capacité vectorielle des femelles sauvages d'*Anopheles funestus*

L'impact de la résistance sur l'infection plasmodiale dans cette étude a été évalué uniquement pour le gène *GSTe2* sur les moustiques collectés à Obout et à Mibellon. Ceci en raison de l'absence de l'insertion "AA" du gène *CYP6P9a* chez les moustiques de ces sites d'étude (Weedall *et al.*, 2019).

II.2.3.1. Détection de l'infection plasmodiale chez les moustiques sauvages

La détection des *Plasmodium* chez les moustiques collectés sur le terrain s'est faite par la méthode TaqMan (Bass *et al.*, 2008) du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (*ssrRNA*) de quatre espèces de *Plasmodium* humains (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. vivax*). La méthode utilise deux amorces (Plas-F : GCT-TAG-TTA-CGA-TTA-ATA-GGA-GTA-GCT-TG, Plas r : GAA-AAT-CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA) et deux sondes nucléotidiques (Falcip+ : TCT-GAA-TAC-GAA-TGT-C, OVM+ : CTG-AAT-ACA-AAT-GCC) pour l'amplification d'une séquence nucléotidique consensus entre les espèces plasmodiales concernées. Les deux et deux sondes marquées chacune d'un fluorochrome pour l'identification de *P. falciparum* (6-Carboxyfluorescein : 6-FAM_falcip+) et du groupe Ovale/Vivax/Malariae (hexachlorofluorescein : HEX_OVM+). Le milieu réactionnel contenait : 1 µl d'ADN génomique, 5 µl de Sensimix 1× (Quantace), 800 nM de chaque amorce, 300 nM de la sonde falcip+, 200 nM de OVM+ et 1,9 µl d'eau stérile pour un volume finale de 10 µl.

La plateforme MxPro-MX300P (Agilent®) a été utilisée pour la PCR en temps réel selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 10min à 95°C, suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation : 15 secondes à 92°C, hybridation-extension : 1min à 60°C). Au cours de cette réaction, une augmentation substantielle de la fluorescence 6-FAM indique la présence de *P. falciparum* (**Figure 18**) tandis qu'une augmentation substantielle de la fluorescence HEX indique la présence de *P.vivax*, *P.ovale* ou *P.malariae* (**Figure 18**). Par ailleurs, une augmentation substantielle des deux types de fluorescence indique une co-infection (**Figure 18**). La méthode TaqMan est très sensible mais ne permet pas de discriminer une infection à *P.vivax*, de l'infection à *P. ovale* ou *P. malariae*. La méthode Nested PCR (Snounou et Singh, 2002) qui est très spécifique a été utilisée pour déterminer les cas d'infection à *P.vivax*, *P.ovale* ou *P.malariae*.

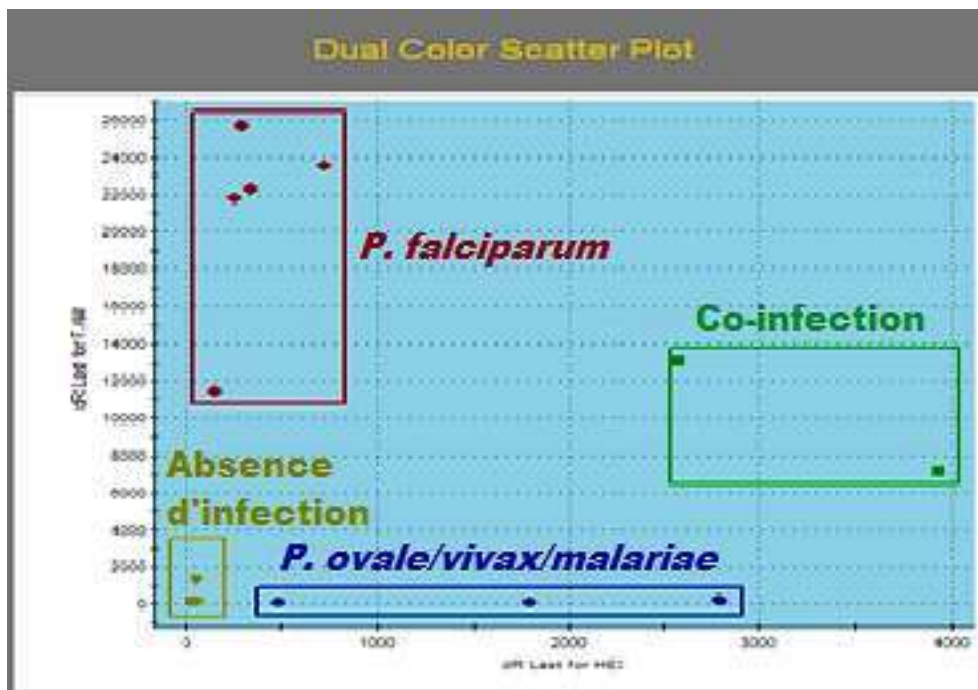


Figure 18 : Nuage de points montrant l'infection à *Plasmodium* spp par la méthode TaqMan. La couleur rouge : moustiques infectés par *P. falciparum*, bleue : moustiques infectés par *P. ovale/vivax/malariae*, vert : co-infection et marron : moustiques non- infectés.

II.2.3.2. Évaluation de l'effet de la mutation L119F au locus GSTe2 sur la compétence et la capacité vectorielle d'*Anopheles funestus*

Après collecte des moustiques sur le terrain, l'ADN génomique a tout d'abord été extrait sur les moustiques entiers pour évaluer la proportion globale d'*An. funestus* infecté par *Plasmodium* spp sur le terrain. Dans un second lot, les moustiques ont été disséqués en deux parties : l'abdomen utilisé pour la détection des oocystes, et la tête + thorax pour l'évaluation du taux d'infection par les sporozoïtes. L'association entre la mutation L119F du gène *GSTe2* et le développement du plasmodium a été évaluée en calculant le rapport de côtes (pour l'infection par les sporozoïtes) entre les individus homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles dans le groupe de moustiques infectés comparés aux non-infectés à l'aide du test de probabilité exacte de Fisher.

II.2.3.3. Étude de l'association entre la diversité génétique du locus *GSTe2* et l'infection à *Plasmodium* spp chez *An. funestus* s.s. après séquençage

L'approche de Sanger a été utilisée dans cette étude pour le séquençage du gène *GSTe2*. Les variations au niveau de la séquence nucléotidique du *GSTe2* ont été étudiées chez *An. funestus* s.s. pour établir une potentielle association entre la diversité génétique de ce gène et la susceptibilité d'*An. funestus* au Plasmodium. Pour ce faire, le gène entier (881 paires de bases) a été amplifié par PCR classique à l'aide des deux amorces suivantes : Gste2F, 5'GGA ATT CCA TAT GAC CAA GCT AGT TCT GTA CAC GCT 3' and Gste2R, 5' TCT AGA TCA AGC TTT AGC ATT TTC CTC CTT 3'. Le milieu réactionnel contenait : 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10× (*Buffer A*, Qiagen), 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume finale de 15 µL. L'amplification a été réalisée dans le thermocycleur de marque "GeneTouch Bioer" selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 1 minute à 72°C) et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5% contenant 1 µl de Midori Green, 10 µl de chaque produit d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit ExoSAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, New England Biolabs, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les amplicons ainsi purifiés ont été dilués à une concentration finale d'environ 150 ng/µl, et la séquence d'ADN de chaque échantillon a été déterminée par le séquenceur automatique en Angleterre (ABI 3130 XL Genetic Analyser, Applied Biosystems).

II.2.4. Exploitations et analyses des données

Toutes les données ont été saisies dans le logiciel Excel version 2013 et les analyses ont été menées à partir de ce logiciel, du logiciel « R » v. 3.4.0 for Windows et les graphes ont été

construits à l'aide du logiciel GrapPad V7.0. Le seuil de signification pour toutes les analyses était de $\alpha=0.05$.

➤ **Analyse de la fécondité et la fertilité**

Le test de normalité de Shapiro-Wilk ayant révélé une distribution non normale des œufs, l'impact de la résistance sur la fécondité a été évalué en comparant le nombre médian d'œufs pondus entre différents génotypes pour les marqueurs à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. De plus, le rapport de côte pour le succès de ponte entre homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles a également été évalué à l'aide du test probabiliste de Fisher. L'impact de la résistance sur la fertilité a été évalué en comparant le taux d'éclosion entre les génotypes à l'aide du test de Chi carré.

➤ **Évaluation du temps de développement larvaire**

Le test du chi carré et le test exact de Fisher ont été utilisés pour évaluer la différence dans la distribution des génotypes entre les stades larvaires et nymphales obtenues à différents intervalles de temps.

➤ **Évaluation de la longévité**

L'estimateur du Kaplan-Meier a été utilisé pour l'analyse de survie car des retraits ont été effectués à différents intervalles de temps (données censurées) suivant la formule :

$$\widehat{S}_{KM}(t) = \prod_{j=1}^k \left(\frac{n_j - d_j}{n_j} \right)$$

Où k est le nombre de durée non censurée distincte ; n_j le nombre de survivant moins le nombre de retrait à l'instant $t = j$; d_j le nombre de mort à l'instant $t = j$. La comparaison des courbes de survie s'est faite par le test de log rang.

➤ **Calcul et analyse des fréquences génotypiques et alléliques pour les deux marqueurs de la résistance**

La proportion génotypique a été calculée en faisant le rapport du nombre d'individus présentant le génotype concerné (susceptible : SS, résistant : RR et hétérozygote : RS) sur le nombre total d'individus testés, exprimée en pourcentage.

La fréquence des allèles a été calculée en utilisant la formule :

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

Où X est le nombre d'individus de génotype homozygote pour l'allèle concerné, Y le nombre d'individus hétérozygotes et N le nombre total d'individus examinés. Les fréquences alléliques et génotypiques ont été comparées à l'aide du test de Chi-Carré (χ^2).

➤ **Analyse des résultats du séquençage**

Analyse des séquences : La qualité de la séquence est vérifiée visuellement puis elles sont épurées à l'aide du logiciel BioEdit 4.8.9 (Hall, 1999) et l'alignement est effectué en utilisant le logiciel DNA Baser (Heracle BioSoft, 2012). Une analyse par correspondance des séquences dans le site NCBI permet de définir les régions codantes et non codantes de nos séquences. Les séquences d'introns et d'exons sont déterminées à l'aide de DNaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) pour définir la phase de l'haplotype (par l'intermédiaire de l'option de phase) et également d'évaluer les paramètres génétiques, tels que la diversité nucléotidique π , la diversité haplotypique d_h et l'estimation de sélection D et D*. Enfin, l'arbre généalogique est construit avec le logiciel TCS 1.21 (Clement et al., 2000).

Polymorphisme et diversité génétique : Le nombre d'haplotypes distincts par groupe de moustique, le nombre de sites polymorphes, la diversité haplotypique (d_h) et la diversité nucléotidique (π) ont été évalués à l'aide du logiciel DNASP 5.10. Ces indices sont utilisés pour estimer l'histoire démographique d'une population. Ainsi :

- une faible d_h et un faible π indiquent un goulot d'étranglement démographique sévère et prolongé ;
- une forte d_h et un fort π signalent une population stable avec grande taille effective ;
- une forte d_h et un faible π , signalent une croissance rapide de population à partir d'une population ancestrale à faible effectif et où le temps n'a pas été suffisant pour retrouver

une forte diversité entre haplotypes (bottleneck éphémère dans une large population ancestrale) ;

- une faible d_h et un fort π , signifient qu'il y a eu une chute drastique des effectifs ayant été à l'origine de l'élimination d'un grand nombre d'haplotypes sans nécessairement affecter la diversité nucléotidique.

En général on considère que les valeurs de ces indices sont faibles lorsqu'elles sont inférieures à 0,5.

Tests de neutralité : Différents tests statistiques : D de Tajima et F_s de Fu (Tajima, 1989; Fu & Li, 1993) ont été utilisés afin de tester l'écart à l'hypothèse de neutralité. Le test F_s de Fu compare le nombre moyen des différences nucléotidiques entre des spécimens pris deux à deux (Θ) avec le nombre d'haplotypes (k) dans la population. Le test de Tajima est quant à lui basé sur la différence entre le nombre moyen de différences deux à deux (Θ) et le nombre de sites polymorphes (S). Dans une population de taille constante, le D de Tajima et le F_s de Fu sont de 0. À l'inverse, une expansion démographique aboutit à des valeurs négatives de D et de F_s (Excoffier *et al.*, 2005). Ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel DNASP 5.10.

Les statistiques D et F de Fu et Li sont similaires au D de Tajima et s'intéressent au nombre de mutations observées uniquement sur un seul chromosome dans la population (singletons) :

- D de Tajima : un test positif signale un excès de variants intermédiaires, tandis qu'un test négatif signale un excès de variants rares.
- D^* de Fu et Li : un test positif montre un déficit de variants rares, tandis qu'un test négatif montre un excès de variants rares.
- F de Fu et Li : un test positif montre un excès de mutations anciennes, tandis qu'un test négatif montre un excès de mutations jeunes.

- F^* de F_u et L_i : un test positif montre un déficit de variants rares tandis qu'un test négatif montre un excès de variants rares.
- F_s de F_u : ce test est positif s'il existe un excès d'allèles intermédiaires et négatif s'il existe un excès d'allèles rares (récents). Si l'indice F_s est significatif et pas les indices D^* et F^* , un signal d'expansion de population est supposé. Si le signal contraire est observé, un phénomène de sélection du gène étudié existerait plutôt. Par ailleurs, si F_s est fortement négatif et de manière significative, cela indique une population en expansion.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Coût biologique de la résistance métabolique aux insecticides médiée par le glutathion S-transférase

III.1.1.1. Résultats de l'échantillonnage

Sur 3368 *An. funestus* s.l. collectés dans les trois d'études, 1021 provenaient d'Obout, 1 147 de Mibellon et 1200 de Tibati. Pendant cette période de collecte, un total de 320 *An. gambiae* s.l. et de 1106 culicinae (appartenant aux genres *Culex* et *Mansonia*) ont été collectés dans les trois sites d'étude. Le tableau V présente la répartition des espèces culicidiennes capturées dans les différents sites d'étude bien qu'*An. funestus* seul ait été utilisé dans la suite des analyses.

Tableau V : composition de la faune culicidienne capturée dans les différents sites d'étude par la technique d'aspiration électrique.

Espèces	<i>An. funestus</i> s.l.	<i>An. gambiae</i> s.l.	Culicinae	Total
Obout	1021 (66%)	223 (14%)	306 (20%)	1550
Mibellon	1 147 (74%)	57 (4%)	344 (22%)	1548
Tibati	1200 (71%)	40 (2%)	456 (27%)	1696
Total	3368 (70%)	320 (7%)	1106 (23%)	4794

L'identification moléculaire de 100 moustiques par localité (identifiés morphologiquement comme *An. funestus* s.l.) a révélé que ceux d'Obout et de Tibati étaient tous *An. funestus* s.s. tandis que à Mibellon, un *An. lesoni* a été détecté tel que révélé par le gel de la figure 19.



Figure 19 : Bandes révélées suite à la migration sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du gène *ITS2* permettant d'identifier les espèces du groupe *An. funestus* s.l.

M : marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases (pb) ; F : contrôle positif (*An. funestus* s.s.) ; N : contrôle négatif ; 8 : *An. lesoni* ; 1 –7 et 9 –17 : *An. funestus* s.s..

III.1.1.2. Profil de résistance d'*Anopheles funestus* aux insecticides

III.1.1.2.1. Profil de résistance d'*Anopheles funestus* collectés à Obout

➤ Tests en tube de l'OMS

Au total, 1800 *An. funestus* adultes F₁ issus des femelles collectées à Obout ont été exposés à divers insecticides appartenant à plusieurs classes. Les moustiques des deux sexes ont montré une sensibilité totale aux organophosphorés (malathion et fénitrothion) avec un taux de mortalité de 100% observé 24 heures après exposition. Différents niveaux de résistance aux insecticides ont été observés pour les trois autres classes d'insecticides. Il a été noté une très grande résistance à la dieldrine (mortalité = $4,35 \pm 2,5\%$) confère **Figure 20a**. La résistance a été observée pour les pyréthrinoïdes à savoir la perméthrine (mortalité : $51,4 \pm 7,8\%$), la deltaméthrine (mortalité : $41,8 \pm 5,3\%$), l'étofenprox (mortalité : $69,6 \pm 3,1\%$) et le DDT qui est un organochloré (mortalité : $70,5 \pm 6,8\%$). Un niveau de résistance modéré a été enregistré avec les carbamates : bendiocarbe ($93,9 \pm 1,1\%$) et le propoxur ($81,7 \pm 5,3\%$).

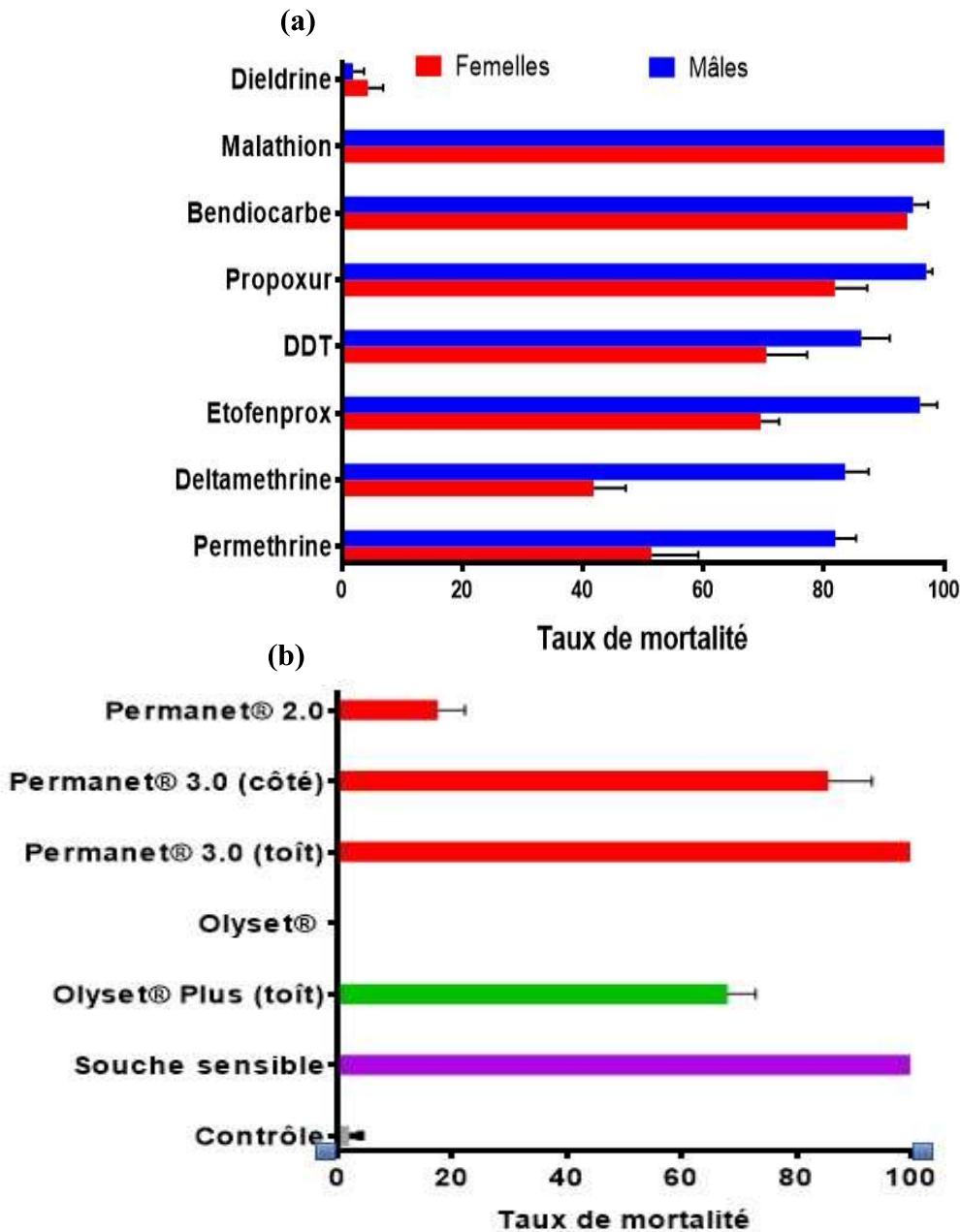


Figure 20 : Profil de résistance d'*An. funestus* s.s d'Obout après exposition aux tubes OMS (a) et tests en cône (b).

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, bréviations : DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane.

➤ **Résultat de l'efficacité des moustiquaires au moyen des tests en cône de l'OMS sur *An. funestus* collectés à Obout**

Un contraste d'efficacité significatif a été observé entre les moustiquaires imprégnées à base de pyréthrianoïde uniquement et celles à base de pyréthrianoïde + PBO. Une efficacité significativement faible a été observée pour les deux moustiquaires contenant uniquement des pyréthrianoïdes, avec une perte totale observée pour Olyset avec un taux de mortalité de 0%,

alors que le PermaNet 2.0 n'induisait que 17,5% de mortalité chez *An. funestus* collectés dans cette localité (**Figure 20b**).

Au contraire, les moustiquaires à base de PBO ont présentées une plus grande efficacité observée avec 100% de mortalité obtenue avec le PermaNet 3.0 et $68,0 \pm 4,9\%$ avec Olyset Plus (**Figure 20b**). La souche sensible FANG a montré une sensibilité totale à toutes les moustiquaires. Ceci montre que la résistance aux insecticides chez ces *An. funestus* sauvages réduit potentiellement l'efficacité des moustiquaires.

III.1.1.2.2. Profil de résistance d'*Anopheles funestus* collectés à Mibellon

➤ Tests en tube de l'OMS

Un total de 2700 moustiques G1 a été testé pour évaluer le profil de résistance à sept insecticides (**Figure 21**). *Anopheles funestus* s.s. (mâles et femelles) se sont révélés résistants aux pyréthrinoïdes de type I et de type II. Pour la perméthrine (type I), la mortalité a été de $48,88 \pm 5,76\%$ pour les femelles et de $90,72 \pm 3,77\%$ pour les mâles. Pour la deltaméthrine (type II), la mortalité a été de $38,34 \pm 5,79\%$ pour les femelles et de $53,96 \pm 11,37\%$ pour les mâles. Cependant, la mortalité a été plus élevée pour l'étofenprox pseudo-pyréthroïde, avec un taux de mortalité de $82,9 \pm 8,7\%$ pour les femelles et de $97,83 \pm 2,17\%$ pour les mâles (**Figure 21a**). Pour le DDT (organochloré), la résistance a été observée avec un taux de mortalité de $55,28 \pm 8,28\%$ pour les femelles et de $83,78 \pm 3,13\%$ pour les mâles (**Figure 21a**). Pour les carbamates, une résistance probable a été observée vis-à-vis du bendiocarbe avec une mortalité de $90,6 \pm 4,3\%$ chez les femelles et de $95,06 \pm 1,97\%$ chez les mâles (**Figure 21a**), tandis qu'une sensibilité a été observée vis-à-vis du propoxur avec une mortalité de $98,41 \pm 1,59\%$ pour les femelles et de 100% pour les mâles (**Figure 21a**). Par ailleurs, une sensibilité complète a été observée pour le malathion qui est un organophosphoré.

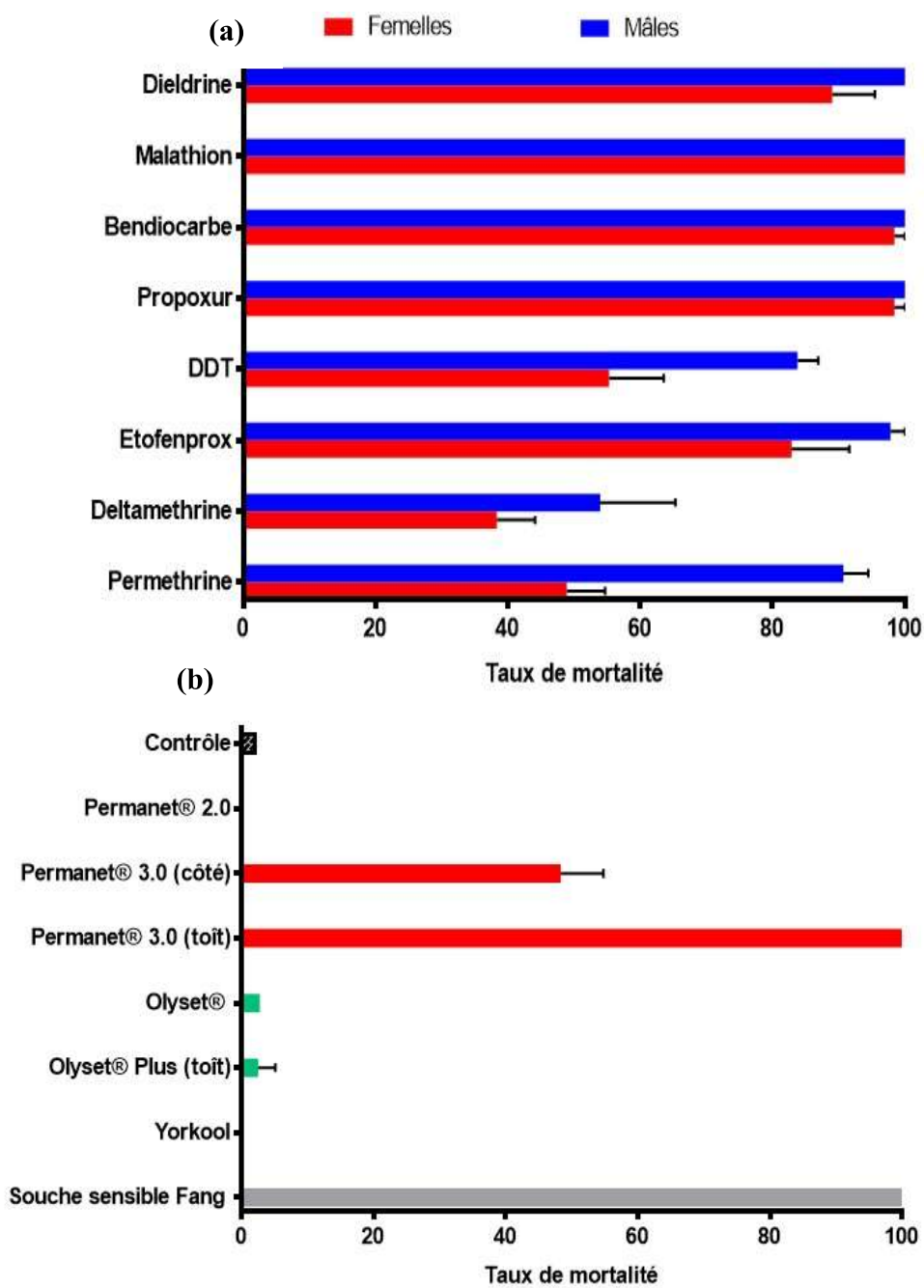


Figure 21 : Profil de sensibilité aux insecticides chez *An. funestus* de Mibellon

Résultats après exposition aux insecticides (a) et taux de mortalité en fonction des différents types de moustiquaires imprégnées (c). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, abréviations : DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; PBO, pipéronyl butoxide.

Une Pré-exposition d'*An. funestus* s.s. au PBO a permis de rétablir la sensibilité aux pyréthri-noïdes de types I et II avec une augmentation de la mortalité observée après exposition a ce synergiste (PBO). Les taux de mortalité ont variés de $48,88 \pm 5,76\%$ à $98,81 \pm 3,77\%$ pour la perméthrine et de $38,34 \pm 5,79\%$ à $96,54 \pm 1,16\%$ pour la deltaméthrine. La restauration partielle de la sensibilité a été observée au DDT avec une augmentation du taux de mortalité de $55,28 \pm 8,28\%$ à $84,16 \pm 5,37\%$ après exposition au PBO.

➤ **Résultats de l'efficacité des moustiquaires sur *An. funestus* collectés à Mibellon**

Des taux de mortalité faibles ont été enregistrés pour la plupart des moustiquaires testés. Les taux de mortalité ont été de $2,78 \pm 2,78\%$ et de $2,5 \pm 2,5\%$ pour Olyset et Olyset Plus respectivement, de $0 \pm 0\%$ et $48,33 \pm 6,49\%$ pour PermaNet 2.0 et PermaNet 3.0, respective-ment; et $0 \pm 0\%$ pour Yorkool (**Figure 21b**).

III.1.1.2.3. Profil de résistance d'*Anopheles funestus* collectés à Tibati

➤ **Tests en tube de l'OMS**

Anopheles funestus collecté à Tibati a montré une sensibilité totale aux organophos-phorés (malathion et fénitrothion) et à la dieldrine (organochloré) avec un taux de mortalité de 100% (**Figure 22a**). Cette population a montré un niveau élevé de résistance aux pyréthri-noïdes avec un faible taux de mortalité chez les femelles, notamment avec la perméthrine (type I ; $26,6\% \pm 2,6\%$ de mortalité) et la deltaméthrine (type II ; $12,0\% \pm 2,3\%$ de mortalité). La résistance a été observée contre le DDT qui est un organochloré (mortalité de $46,8\% \pm 5,9$). Une résistance modérée a été enregistrée contre les carbamates : bendiocarbe (mortalité de $86,1\% \pm 5,5\%$) et le propoxur (mortalité de $87,2\% \pm 0,8$) confère **Figure 22a**. Les mâles ont présenté également des profils de sensibilité similaires à ceux des femelles (**Figure 22a**).

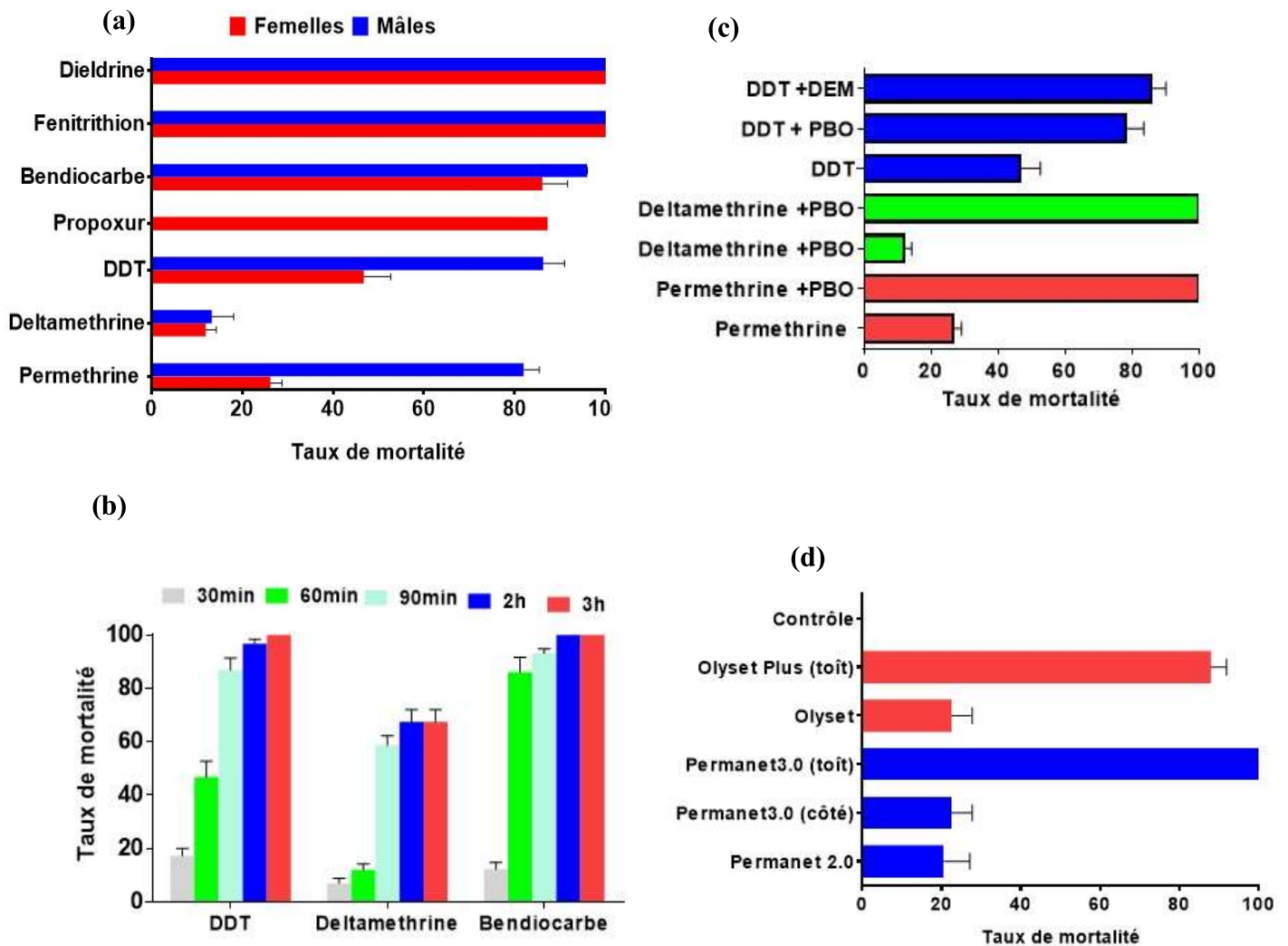


Figure 22 : Profil de susceptibilité aux insecticides chez *An. funestus* de Tibati

(a) exposition aux tubes OMS et (b) évaluation de l'intensité de la résistance (c) activités du PBO combinée à la perméthrine, à la deltaméthrine et au DDT ; et (d) Test d'efficacité à différents moustiquaires recommandées par l'OMS. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, abréviations : DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; PBO, pipéronyl butoxide ; DEM, Diethyl Maléate.

En raison de la résistance élevée observée pour les insecticides à base de pyréthri-noïdes et le DDT, l'intensité de cette résistance a été évaluée en effectuant des tests avec des temps d'exposition supérieurs ou égaux à 90 minutes, 120 minutes et 180 minutes pour la deltaméthrine et le DDT, mais également pour le bendiocarbe (**Figure 22b**). Après une exposition de 2 à 3 heures à la deltaméthrine, les moustiques ont présenté toujours un taux de morta-

lité inférieur à 80% (à 2 heures : 67,4% ± 4,5 ; à 3 heures : 76,4% ± 3,6). En revanche, des taux de mortalité proches de 100% ont été observés après exposition au DDT pendant 2h et 3h (2h : 96,7% ± 1,7 ; 3h : 100% ± 00) et pour le bendiocarbe (à 90 min : 93,1% ± 1,6 ; à 2 heures : 100 % ± 00).

Les tests avec les synergistes ont montré une restauration totale de la sensibilité des moustiques après pré-exposition au PBO pour les pyréthriinoïdes de types I et II. En effet, avec la perméthrine sans PBO la mortalité a été de 26,6% ± 2,6 comparée à celle obtenue pour cet insecticide adjoint du PBO qui a été de 100,0% ± 0,0 ($\chi^2 = 73,9$; $P < 0,0001$). Avec la deltaméthrine, la mortalité a été de 12,0 ± 2,3% en absence de PBO comparée à 100% ± 0,0 ($\chi^2 = 107,30$; $P < 0,0001$) en présence du PBO (**Figure 22c**). Ces observations suggèrent que les enzymes du cytochrome P450 joueraient un rôle majeur dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus* s.s. à Tibati. Une Préexposition au PBO a permis également de restaurer la sensibilité au DDT mais partiellement (DDT : sans PBO [46,78% ± 5,95%] avec PBO [78,1% ± 5,6%], $\chi^2 = 13,4$; $P = 0,0003$). Ceci montre que d'autres familles de gènes ou d'autres mécanismes contribueraient à la résistance au DDT dans cette localité. Pour cette raison, l'implication des enzymes de la famille des GSTs a été évaluée en effectuant le test avec une exposition préalable d'une heure au Diethyl-maleate (DEM) qui est un inhibiteur des GSTs. Cela a révélé une restauration partielle de la sensibilité [DDT : sans DEM (46,8% ± 5,9%) par rapport au DDT avec DEM (85,9% ± 4,3%), ($\chi^2 = 22,36$; $P < 0,0001$)], ce qui montre que les GSTs à l'instar du gène *GSTe2*, contribueraient de manière synergique avec les enzymes du cytochrome P450 à la résistance au DDT des moustiques.

➤ **Bio-efficacité des moustiquaires commercialisées sur *An. funestus* de Tibati**

Une faible efficacité des moustiquaires standards (à base de pyréthriinoïdes seulement) (Olyset et PermaNet 2.0) a été observée sur *An. funestus* s.s. Pour Olyset, la mortalité était de 22,6 ± 5,1% et pour le PermaNet 2.0 la mortalité était de 20,4 ± 6,7%. En revanche, les mous-

tiquaires à base de PBO (Olyset Plus et PermaNet 3.0) ont montré une meilleure efficacité (Olyset Plus : $87,9 \pm 3,9\%$ de mortalité ; PermaNet 3.0-côté : $64,2 \pm 6,9\%$, PermaNet 3.0-toît : $100,0 \pm 0,0\%$) (**Figure 22d**). Ces résultats montrent que les moustiquaires à base de PBO seraient les mieux indiquées pour les populations de cette localité.

III.1.1.3. Résultats du génotypage des marqueurs de la résistance chez les femelles sauvages d'*Anopheles funestus*

Afin de déterminer les bases moléculaires de la résistance observée aux insecticides chez les moustiques collectés dans les différents sites d'étude, la mutation L119F-GSTe2 associée à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides et la mutation A296S-RDL associée à la résistance à la dieldrine ont été génotypées chez les femelles sauvages d'*Anopheles funestus*.

➤ Tous les génotypes ont été révélés avec succès au locus *GSTe2* avec la nouvelle technique conçue à cet effet et le séquençage direct a permis de valider ces génotypes confirmant ainsi la robustesse du nouveau test diagnostique PCR-Allèle Spécifique (AS-PCR) confère **Figure 23a-b**. Après génotypage de 174 femelles collectées à l'intérieur des maisons à Obout, une fréquence de 63,2% a été obtenue pour l'allèle résistant 119F incluant 38,5% (35/91) homozygotes résistants, 49,4% (45/91) hétérozygotes et 12,1% homozygotes sensibles (**Figure 24**).

Le locus *RDL* a été génotypé chez 100 femelles sauvages pour la recherche de la mutation A296S par la méthode PCR TaqMan. Sur ces moustiques testés, 97 se sont révélés homozygotes résistants pour cette mutation et 3 des hétérozygotes correspondant à une fréquence de 98,5% pour l'allèle résistant 296S (**Figure 24**). Cette forte fréquence de l'allèle résistant 296S était en accord avec le niveau de la résistance très élevé observé à la dieldrine dans cette localité.

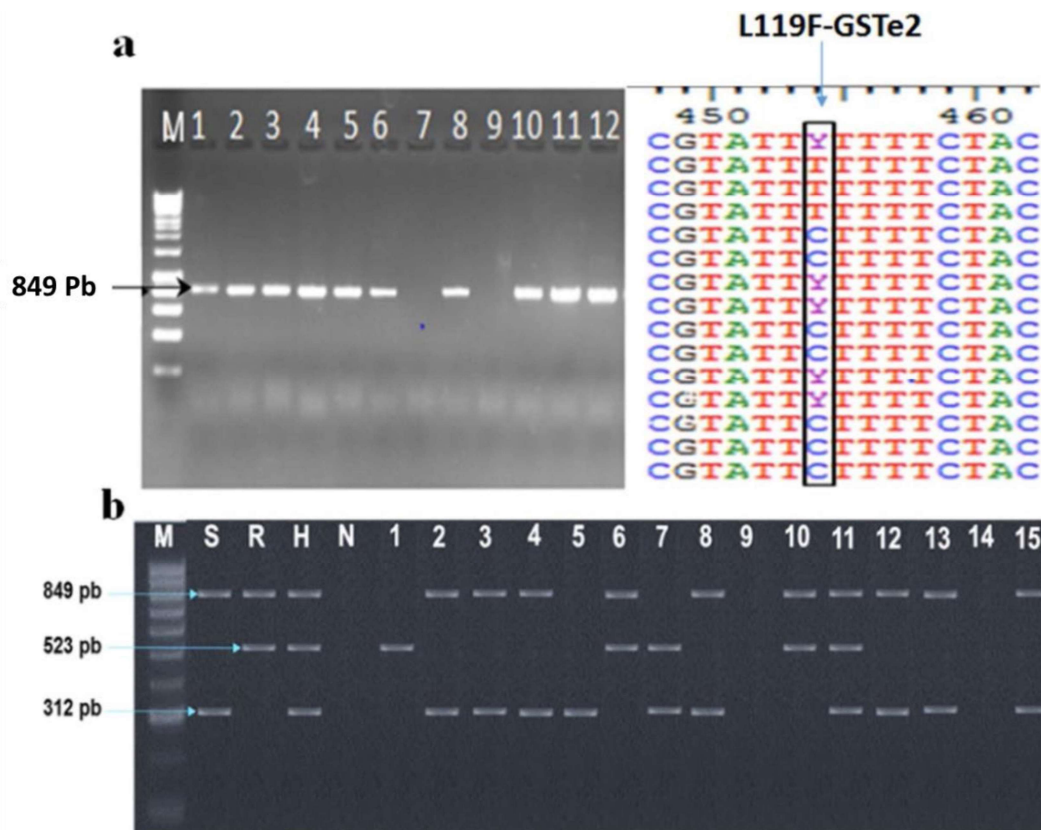


Figure 23 : Photographie obtenue après migration sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène *GSTe2* en utilisant le nouveau test diagnostique (AS-PCR) permettant de révéler les génotypes à la mutation L119F.

- a) Bandes obtenues après amplification par PCR du gène *GSTe2* chez *An. funestus* s.s. et un aperçu du polymorphisme de ce gène autour de la mutation ponctuelle L119F, où Y représente le génotype hétérozygote C / T. b) génotypes à la mutation L119F révélés après amplification par AS-PCR : La bande de 849 pb = bande commune à tous les génotypes ; la bande 523 pb représente le génotype homozygote résistant et celle du bas de 312 pb représente le génotype homozygote sensible ; les moustiques hétérozygotes ont les deux bandes. (S: homozygote sensible, R: homozygote résistant et H: hétérozygote); N: contrôle négatif; 1-15: échantillons génotypés (1, 6, 10: résistants homozygotes; 7,11: hétérozygotes; 2-5, 8, 12, 13, 15: homozygotes sensibles; 9, 14: pas d'amplification).

➤ A Mibellon cependant, le génotypage du locus *GSTe2* chez 260 femelles sauvages (G0) a révélé une faible fréquence de l'allèle résistant 119F (24,8%) chez *An. funestus* avec 6,1% (16/260) d'individus homozygotes résistants, 37,3% (97/260) hétérozygotes et 56,5% (147/260) homozygotes sensibles (**Figure 24**). Pour le gène *RDL*, seuls 22 (15,5%) moustiques examinés portaient la mutation A296S-RDL soit 4 (2,8%) homozygotes résistants

(296S/S), 18 (12,7%) hétérozygotes (A296S-RS) et 120 homozygotes sensibles (A/A296) (Figure 24).

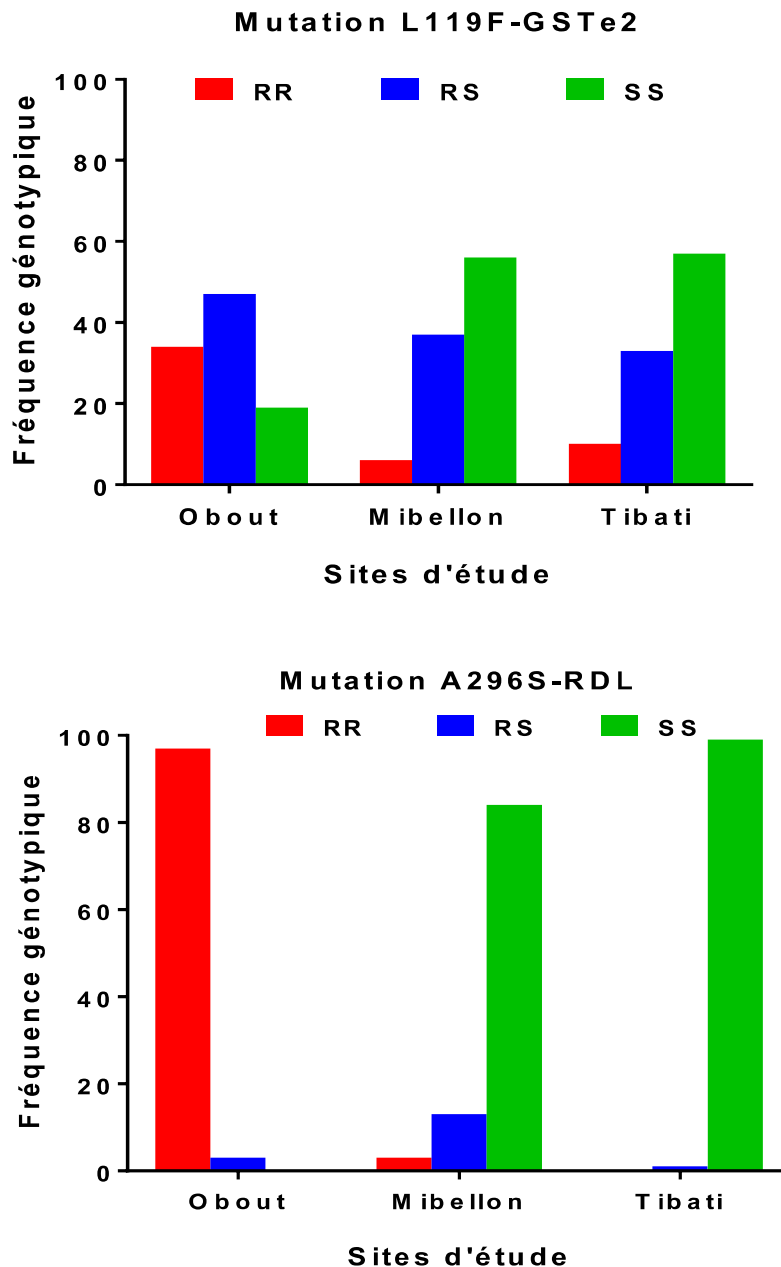


Figure 24 : Distribution des génotypes aux locus L119F-GSTe2 et A296S-RDL chez les femelles sauvages collectés dans les trois sites d'étude.

➤ A Tibati, sur 127 femelles sauvages examinées, une fréquence de 28,8% a été obtenue pour l'allèle résistant 119F du gène *GSTe2*. Parmi ces moustiques, 13(10,2%) ont été homozygotes résistants, 42(33,1%) hétérozygotes et 72(56,7%) homozygotes sensibles (Figure 24).

Quant au locus *RDL*, l'allèle résistant 296S associée à la résistance à la dieldrine a été presque absent dans cette localité et ces résultats ont été confirmés par la sensibilité totale observée à la dieldrine à la suite des tests de sensibilité.

III.1.1.4. Effet de la mutation L119F-GSTe2 sur les traits de vie d'*Anopheles funestus*

III.1.1.4.1. Effet de la mutation L119F-GSTe2 sur la fécondité et la fertilité des femelles sauvages

Afin d'évaluer l'influence de la mutation L119F sur la capacité d'*An. funestus* sauvage à pondre, la fréquence de l'allèle résistant a été comparée entre femelles ayant pondus et celles n'ayant pas pondus. Une fréquence plus élevée (31,5%) mais non significative ($\chi^2 = 1,6$; $P = 0,19$) de l'allèle 119F a été observée chez les femelles n'ayant pas pondu comparée à celles ayant pondu (24,8%). L'évaluation des rapports de côte (RC) a montré que la capacité des moustiques homozygotes sensibles à pondre des œufs était supérieure à celle des hétérozygotes (RC = 2,1 ; intervalle de confiance (IC) 95%: 1,4-2,9 ; $p < 0,0001$) et des homozygotes résistants (RC = 2,9 ; IC 95%: 1,7-5,18 ; $p < 0,0001$) suggérant une association entre la mutation L119F et une fécondité réduite. De plus, les moustiques hétérozygotes ont également montré une capacité à pondre supérieure à celle des homozygotes résistants (RC = 2,7 ; IC 95%: 1,5-4,8 ; $p = 0,0002$) confère **Tableau VI** montrant un effet supplémentaire de l'allèle 119F sur la fécondité des femelles.

Tableau VI : Niveau d'association entre les génotypes L119F-GSTe2 et la capacité des femelles à pondre des œufs.

Combinaison des génotypes au locus L119F-GSTe2	Niveau d'association	
	Rapport de côte	Valeur de P
SS vs. RR	2,93 (1,66–5,18)	0,0001 *
SS vs. RS	2,06 (1,45–2,92)	0,000001 *
RS vs. RR	2,68 (1,51–4,77)	0,0002 *

SS : homozygotes sensibles ; RR : homozygotes résistants ; RS : hétérozygotes ; * différence significative

De plus, le nombre moyen d'œufs pondus par les femelles de génotype L119F-RR était de 65,8 (min = 12 ; max = 125) contre 95,7 (min= 13 ; max= 156) pour les femelles de génotype L119F-RS ; tandis que les femelles de génotype L119F-SS ont pondus en moyenne 93,5 œufs (variant de 2 à 162) confère **Figure 25a**. La comparaison du nombre moyen d'œufs pondus par génotype a montré que les moustiques de génotype L119F-RR pondent un nombre d'œufs significativement plus petit que ceux des génotypes L119F-RS et L119F-SS ($P = 0,003$) tel que représenté à la **Figure 25c**. En ce qui concerne la viabilité des œufs pondus, le taux d'éclosion était de $65,8\% \pm 5,6\%$ pour L119F-RR, $66,0\% \pm 2,9\%$ pour L119F-RS et $62,9\% \pm 2,3\%$ pour les moustiques L119F-SS (**Figure 25b**). Le nombre moyen de larves n'était pas différent entre les génotypes ($P = 0,18$), ainsi que pour le taux d'éclosion ($0,000 < \chi^2 < 0,80$; $0,79 < P < 0,98$) (**Figure 25c**).

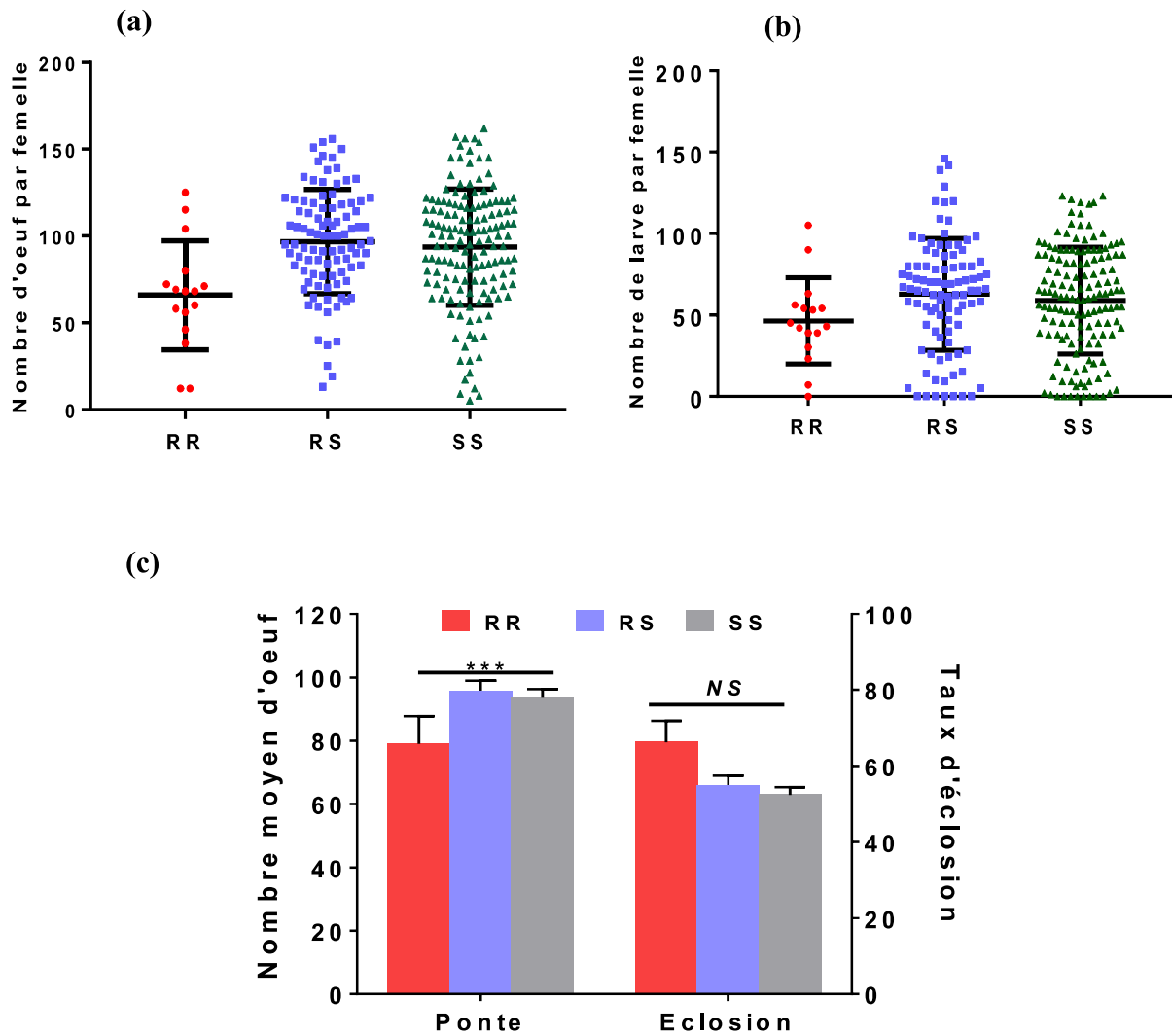


Figure 25 : Diagrammes présentant l'influence de la mutation L119F au locus *GSTe2* sur la fécondité et la fertilité des femelles sauvages d'*Anopheles funestus* collectées à Mibellon.

(a) : comparaison du nombre d'œufs pondus par les femelles d'*Anopheles funestus* de génotypes L119F-RR, L119F-RS et L119F-SS ; (b) nombre de larves obtenu chez les femelles de chaque génotype ; (c) comparaison du taux d'éclosion entre les trois génotypes. La valeur médiane avec l'intervalle interquartile sont indiquées pour chaque distribution. La ligne pointillée indique les femelles pour lesquelles au moins 50 œufs ou larves ont été obtenus. ** différence significative ($p < 0,01$) ; ***: différence significative à $p < 0,001$; NS : non significatif.

III.1.1.4.2. Influence de la mutation L119F au locus *GSTe2* sur la mortalité et la vitesse de développement larvaire

L'éclosion des œufs a eu lieu 1 à 3 jours post-ponte et le temps de développement du stade larvaire aux nymphes était globalement de $12,5 \pm 4,5$ jours. Le génotypage de 150 moustiques (50 par réplicat) à chaque stade larvaire a révélé : pour le génotype L119F-RR, une proportion de $4,9\% \pm 0,7\%$ au stade L1, $5,7\% \pm 0,02\%$ en L2, $6,3\% \pm 2,3\%$ en L3 et $5,6\% \pm 1,07\%$ au stade L4 ; pour les moustiques de génotype L119F-RS, une proportion de $34,8\% \pm 2,5\%$ au stade L1, $38,4\% \pm 1,2\%$ en L2, $33,8\% \pm 4,6\%$ en L3 et $35,6\% \pm 4,3\%$ en L4. Pour les moustiques de génotype L119-SS, une proportion de $58,8\% \pm 6,5\%$ a été notée au stade L1, $51,2\% \pm 5,9\%$ au stade L2, $59,3\% \pm 4,9\%$ à la L3 et $56,4\% \pm 5,4\%$ au stade L4. La comparaison des fréquences génotypiques du stade larvaire L1 au stade L4 n'a montré aucune différence significative pour les moustiques de génotype L119F-RR ($\chi^2 < 0,27$; $p > 0,60$), L119F-RS ($\chi^2 < 0,30$; $p > 0,57$) et L119-SS ($\chi^2 < 1,21$; $p > 0,27$) confère **Figure 26a et b**. De plus, aucun changement significatif de la fréquence des allèles ($\chi^2 < 0,81$; $P > 0,36$) n'a été observé indiquant que la possession de l'allèle résistant 119F n'a probablement pas d'impact sur le développement larvaire dans cette population d'*An. funestus*. Les nymphes ont été obtenues à partir du 9^e jour après éclosion des œufs (pupes J9) jusqu'au 17^e jour (pupes J17). Cependant la plupart des nymphes (plus de 75%) ont été obtenues au 11^e jour après éclosion (**Figure 26d**).

L'évaluation de la vitesse de formation des pupes en comparant les fréquences génotypique chez les pupes obtenues à J9, J11 et J13 a montré que les moustiques hétérozygotes (L119F-RS) se développaient significativement plus vite que les moustiques homozygotes résistants et homozygotes sensibles ($\chi^2 = 11.052$; ddl = 4 ; $P = 0,02$) indiquant un éventuel avantage des hétérozygotes pour le développement (**Figures 26c, d**). L'évaluation des RC pour la formation des pupes a également montré une tendance bien qu'elle n'était pas significative que les individus L119F-RS se développerait plus vite que ceux de génotype L119F-

RR ($RC > 1,04$; $P < 0,42$) et légèrement plus vite que ceux de génotype L119-SS ($RC > 1,38$; $P < 0,08$). Cependant, la vitesse de développement des L119-SS a été supérieure au 119F-RR ($OR > 1,40$; $P < 0,0001$), ce qui montre un impact de la mutation L119F-GSTe2 sur le temps de développement des larves (**Tableau VII, Figure 26d**).

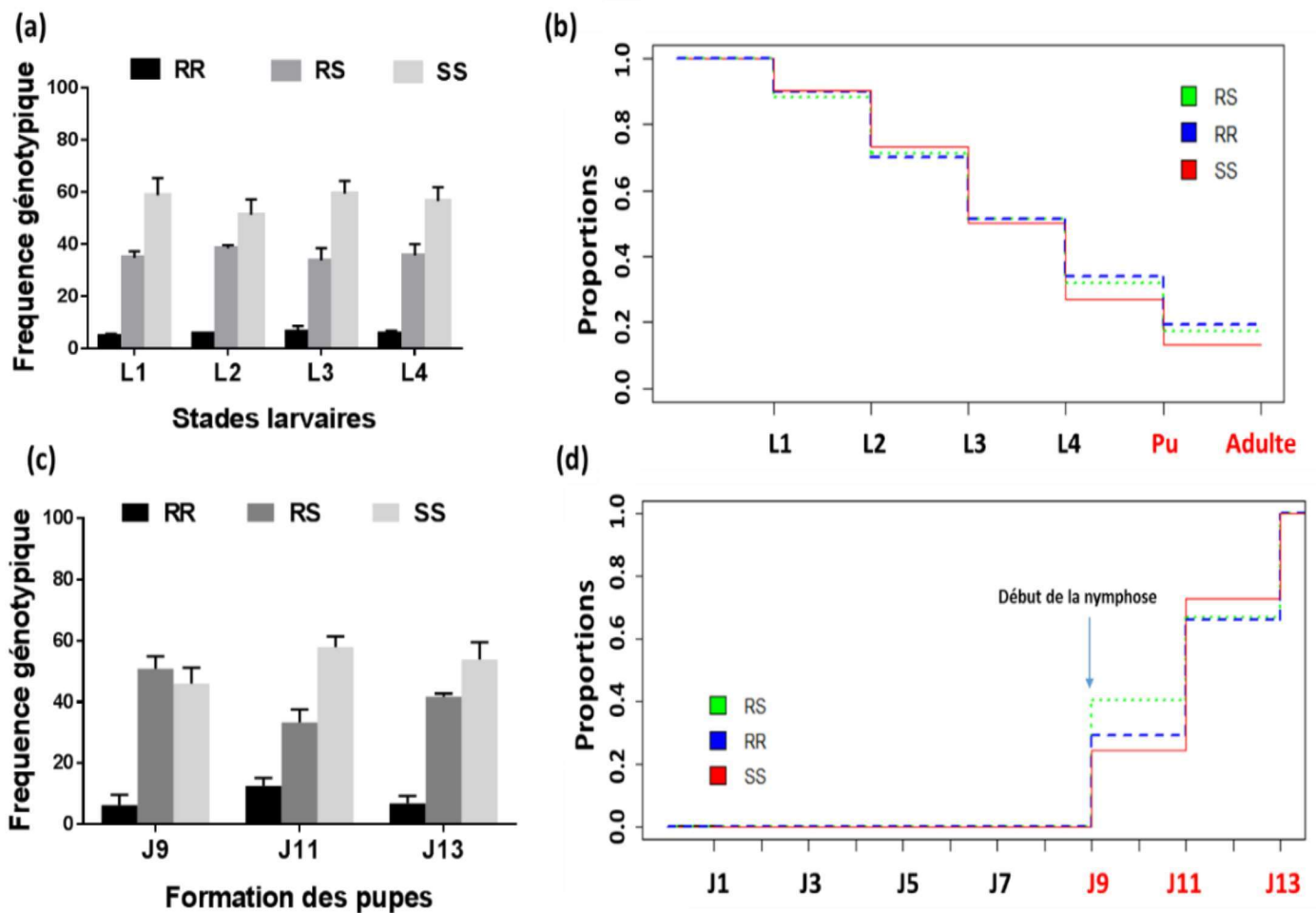


Figure 26 : Répartition des génotypes au locus *GSTe2* à différents étapes de développement des stades immatures d'*Anopheles funestus*.

(a) Histogramme de la variation des fréquences génotypiques au cours du développement des larves (L1, L2, L3 et L4 représentent différents stades larvaires) et la formation des nymphes (b) ; (c) la proportion de larves survivant à chaque stade de développement après éclosion (J1) jusqu'à la formation des nymphes (à partir de J9) ; d) la proportion de pupes obtenues aux J9, J11 et J13. Les barres et les lignes colorées indiquent respectivement les génotypes 119F/F-RR, L119F-RS et L/L119-SS. Les erreurs types ($n = 3$) sont également indiquées pour les histogrammes.

Tableau VII : Niveau d'association entre les génotypes au locus L119F-GSTe2 et la formation des pupes.

Génotypes	Pupe J9 vs. Pupe J11		Pupe J11 vs. Pupe D13	
	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P
RS vs. RR	5,26 (2,24–12,34)	<0,0001 *	1,04 (0,73–1,49)	0,42
RS vs. SS	1,39 (0,89–2,17)	0,08	1,38 (0,98–1,87)	0,03 *
SS vs. RR	9,66 (4,17–22,40)	<0,0001*	1,40 (1,01–1,95)	0,02 *

III.1.1.4.3. Effet de la mutation L119F au locus *GSTe2* sur la longévité des femelles sauvages maintenues au laboratoire

La durée de vie des moustiques femelles adultes F_1 variait de 12 à 36 jours pour les trois réplicats. La comparaison des courbes de survie à l'aide du test de Log-rank (Mantel – Cox) n'a révélé aucune différence pour les trois réplicats ($\chi^2 = 0,2$; $P = 0,9$) (**Figure 27a**). Cinquante moustiques vivants ont été génotypés à J1, J10, J20 et J30 après l'émergence des adultes pour évaluer l'association entre la mutation L119F et la longévité de l'adulte. La comparaison de la fréquence des génotypes a montré une diminution de J1 à J30 de la proportion de moustiques sensibles homozygotes L119F-SS ($\chi^2 = 21,2$; $P = 0,0017$) (**Figure 27b, d**). L'évaluation des rapports de côte a montré que les moustiques porteurs de l'allèle résistant 119F vivent plus longtemps que ceux ayant l'allèle sensible L119 (RC = 7,5 ; IC 95%: 1,04–21,3 ; $P < 0,001$) (**Tableau VIII**). Ceci est corroboré par la variation de la fréquence des allèles après le génotypage et le séquençage (**Figure 27e**).

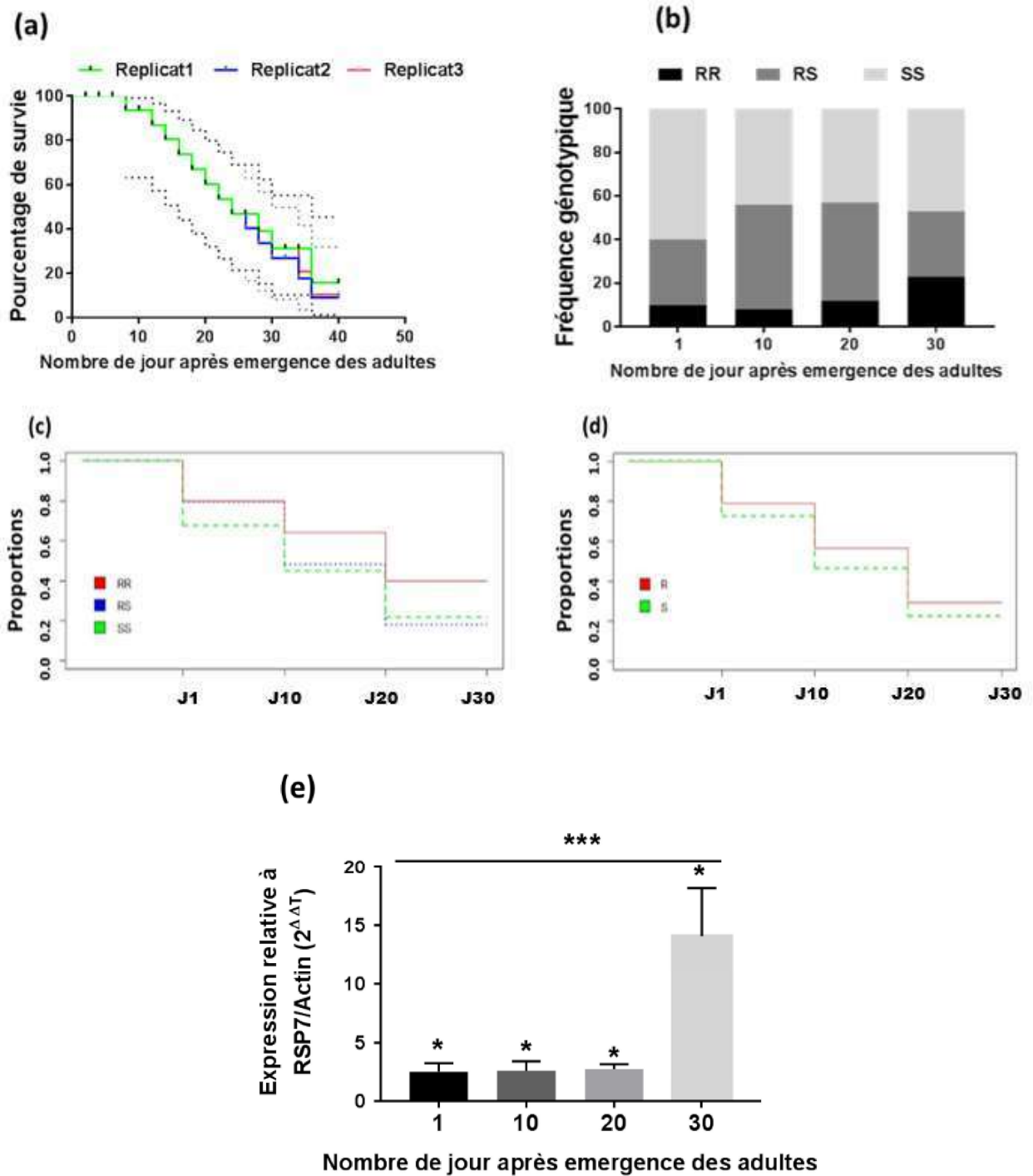


Figure 27 : Effet de la mutation L119F-GSTe2 sur la longévité des adultes (G1) d'*An. funestus* en condition de laboratoire.

(a) Courbe de survie des adultes G1 issus de la population naturelle et maintenue en laboratoire : le pourcentage moyen de mortalité et l'intervalle de confiance à 95% ont été représentés ; (b) la distribution des génotypes L119F-GSTe2 à différents intervalles de temps chez les moustiques vivants ; (c) expression différentielle par RT-qPCR du gène *GSTe2* chez les moustiques vivants à

différents intervalles de temps comparé à la souche sensible de laboratoire FANG. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne ; (d, e) variation de la proportion d'adultes survivant à différents intervalles de temps après leur émergence en fonction des génotypes et des allèles respectivement.

De plus, les moustiques avec le génotype RR ont montré plus de chances de survivre jusqu'à J30 comparés aux RS ($RC > 2,2$; $P < 0,05$) et aux SS ($OR > 2,1$; $P < 0,05$), mais aucune différence n'a été observée entre les RS et les SS. L'évaluation du niveau d'expression du gène *GSTe2* à J1, J10, J20 et J30 a également révélé un niveau d'expression de ce gène significativement plus élevé chez les moustiques de J30 ($FC = 4,4 \pm 2,7$) comparé à celui des moustiques de J1 ($FC = 2,5 \pm 0,7$), J10 ($FC = 2,7 \pm 0,8$) et de J20 ($FC = 2,8 \pm 0,4$) ($F = 8$ ddl = 3 $P = 0,008$). Un tel résultat indique que les moustiques exprimant ce gène vivent plus longtemps que ceux ayant une expression plus faible (**Figure 27e**).

Tableau VIII : Niveau d'association entre les génotypes au locus L119F-GSTe2 et la longévité des adultes sauvages d'*An. funestus* maintenus au laboratoire

Génotypes	J1 x J10		J10 x J20		J20 x J30	
	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P
RR vs. RS	3,75 (1,21–11,29)	0,019 *	3,83 (1,56–9,41)	0,0023 *	2,2 (1,04–4,64)	0,050 *
RR vs. SS	7,5 (2,64–21,28)	0,000006 *	3,83 (1,56–9,41)	0,0059 *	2,1 (0,98–4,45)	0,13
RS vs. SS	1,30 (0,75–2,24)	0,41	1,04 (0,57–1,90)	1	1,61 (0,80–3,22)	0,22

* indique une différence significative

III.1.1.4.4. Association entre le polymorphisme du gène *GSTe2* et la longévité des adultes

➤ **Diversité génétique du gène *GSTe2*** : le fragment de 809 pb du locus *GSTe2* a été séquencé avec succès chez 48 moustiques de Mibellon (12 moustiques à chaque intervalle de temps) et 44 séquences ont été analysées avec succès ($2n = 88$). Les paramètres de la diversité génétique de ce fragment du gène *GSTe2* sont donnés dans le tableau IX en fonction des jours. Au total, 12 sites polymorphes (11 dans les régions codantes et un dans les régions non codantes) définissant 33 haplotypes ont été détectés (**Figure 28**).

Tableau IX : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène *GSTe2* en fonction de l'âge des moustiques et des génotypes de la mutation L119F.

	2n	S	h	Hd	π	D	D*
J1	24	11	15	0,95	0,005	-0,11 ns	-0,96 ns
J10	24	10	11	0,79	0,003	-0,44 ns	0,97 ns
J20	16	11	14	0,98	0,006	0,21 ns	0,41 ns
J30	24	9	12	0,92	0,003	0,02 ns	0,28 ns
Total	88	12	33	0,94	0,004	0,44 ns	1,55 ns

2n, Nombre de séquences analysées ; D, indice de Tajima ; D*, indice de Fu and Li's ; h, Nombre d'haplotypes ; hd, diversité haplotypique ; ns, non significatif ; π, diversité nucléotidique ; S, Nombre de sites polymorphes.

➤ Les moustiques de J30 après l'émergence des adultes présentaient un nombre inférieur de sites polymorphiques (9) avec une diversité d'haplotypes de 0,92. La diversité nucléotique globale était de 0,004 avec un nombre moyen de différences entre les nucléotides estimé à 3,21 avec aucune différence significative entre les séquences examinées ($P > 0,10$). Cependant, à J30 l'allèle résistant 119F a été détectée à une haute fréquence comparée à J1, J10 et

J20 où l'allèle mutant était présent à basse fréquence (54% contre 29% à J1, 24 à J10 et 50 à J20) ($\chi^2 = 23,53$; $P < 0,0001$) (**Figure 28**). Cela confirme que l'allèle résistant 119F est plus associé à une grande longévité chez ces moustiques de terrain.

Haplotypes (Allèle)	Intervalle de temps	489911345566 382411720014 24874959	Fréquence
H_1 (S)	D1, D10, D20, D30	TGAACAGCCAAT	14
H_2 (S)	D1, D20C.C	1
H_3 (S)	D1T.A..C.C	3
H_4 (S)	D1T.A....C	2
H_5 (S)	D1T.A...C.	1
H_6 (S)	D1, D10, D20A.....	8
H_7 (R)	D1	.CG..G.TTG..	1
H_8 (S)	D1, D30A..C..	5
H_9 (R)	D1, D30T....	6
H_10 (R)	D1, D10, D20, D30	G.T....T....	11
H_11 (S)	D1, D30AC...C	2
H_12 (R)	D1, D20	G.T...AT....	2
H_13 (S)	D1,	..T.....	1
H_14 (S)	D1, D30	..T...A..C..	2
H_15 (S)	D1, D10	G.T.....	3
H_16 (S)	D10, D00	.CG..GA.T...	3
H_17 (S)	D10	.C....A.....	1
H_18 (S)	D10	...G.....	1
H_19 (S)	D10T.....	1
H_20 (S)	D10	.CG.CG.....	1
H_21 (S)	D10T.A.....	1
H_22 (R)	D10	G.TG..AT....	1
H_23 (R)	D20	.CG..GATTG..	1
H_24 (R)	D20, D30	..T....T....	2
H_25 (S)	D20, D30	.CG..GA...C.	1
H_26 (S)	D20	.CG..GA.....	2
H_27 (R)	D20	G.G...AT....	1
H_28 (S)	D20, D30	..T.T.A...C.	2
H_29 (R)	D20, D30AT....	4
H_30 (R)	D20T.AT....	1
H_31 (S)	D20A...C.	1
H_32 (S)	D30	...G.....C.	1
H_33 (R)	D30T.C.C	1

Figure 28 : Diversité nucléotidique du gène *GSTe2* chez *Anopheles funestus* de Mibellon en relation avec la longévité des moustiques adultes.

D1, D10, D20 et D30 représentent les jours 1, 10, 20 et 30 après émergence des adultes.

➤ Distribution des haplotypes et phylogénie

L'analyse du réseau d'haplotypes (permettant d'établir la relation entre différents haplotypes sur la base des différences d'étapes mutationnelles) du gène *GSTe2* en fonction des allèles de la mutation L119F et la longévité des adultes a révélé cinq haplotypes majeurs avec une fréquence $\geq 5\%$ (H1, H6, H8, H9 et H10) dans cette population d'*An. funestus* (**Figure 29a**). Parmi les cinq haplotypes majeurs, l'haplotype ancestral (H6) a été spécifique à l'allèle sensible L119 et a été partagé entre les moustiques de J1, J20 et J30 (**Figure 29a**). L'haplotype H1 quant à lui a présenté à une fréquence plus élevée (14) et été spécifique à l'allèle sensible également et partagé entre les moustiques de J1, J10 et J30 (**Figure 29a, 30a**). H10, second haplotype majeur a été partagé entre les moustiques de J1, J10, J20 et J30 et spécifique à l'allèle résistant 119F (**Figure 29a, 30a**). L'haplotype H8 a été spécifique à l'allèle sensible L119 et tandis que l'haplotype H9 a été spécifique de l'allèle résistant 119F (**Figure 29a, 30a**). L'analyse de l'arbre phylogénétique par la méthode de maximum de vraisemblance entre les haplotypes identifiés n'a révélé aucun regroupement en fonction des jours (**Figure 29b**). Cependant, il une tendance de regroupement a été noté en relation avec la mutation L119F du gène *GSTe2* (**Figure 30b**).

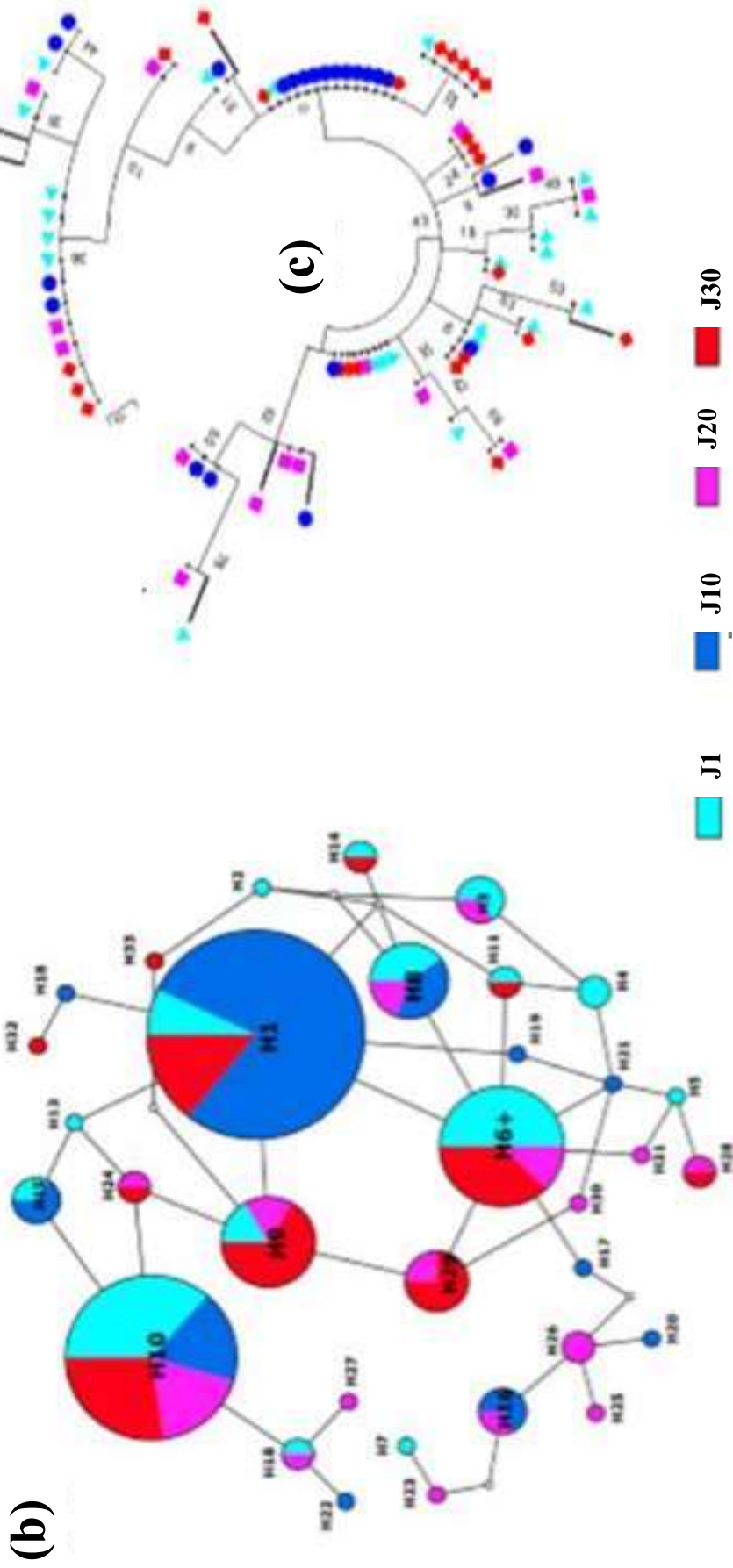


Figure 29 : Diversité haplotypique et arbre phylogénétique du gène *GSTe2* chez *Anopheles funestus* de Mibellon en relation avec la longévité des moustiques.

Diversité haplotypique en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (c) en fonction des jours après émergence adultes.

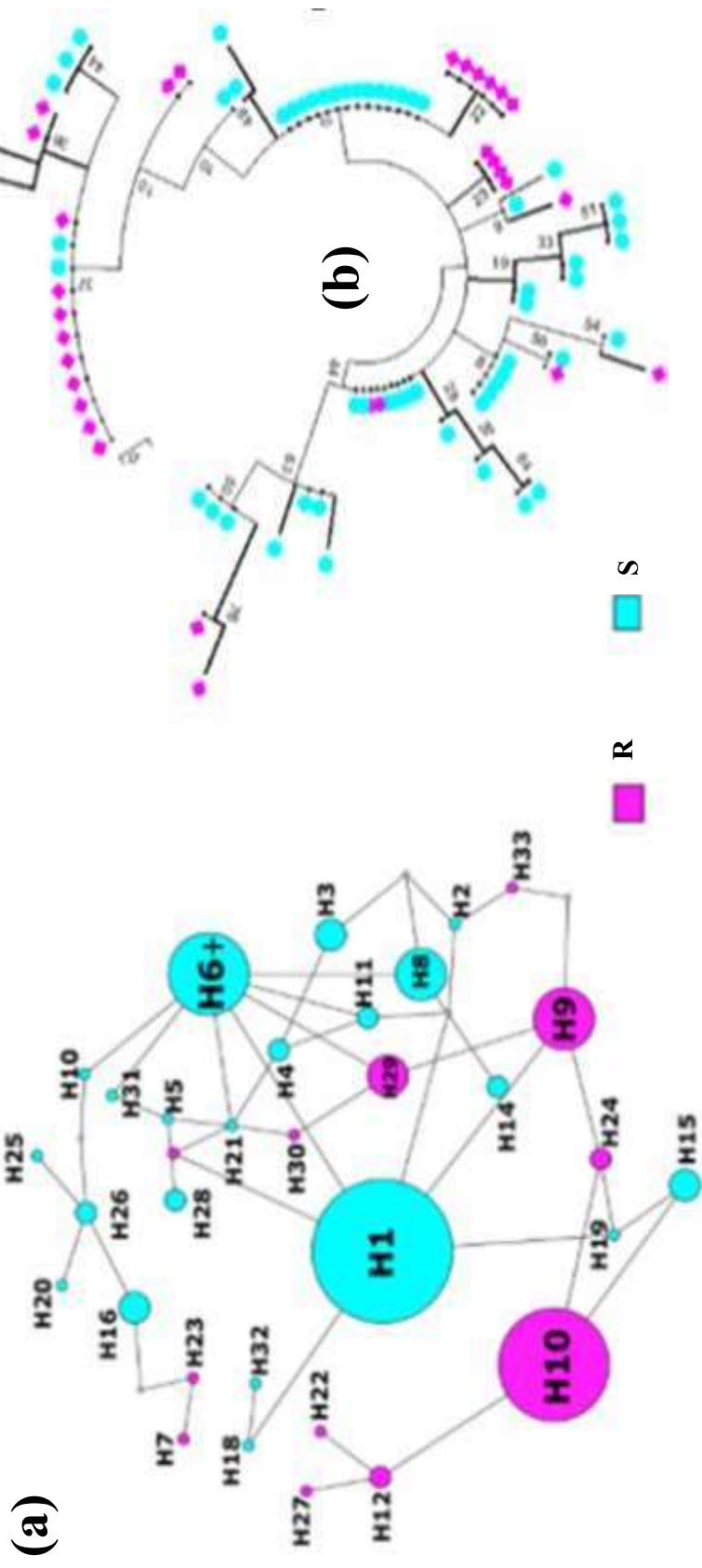


Figure 30 : Diversité haplotypique et arbre phylogénétique du gène *GSTe2* chez *Anopheles funestus* de Mibellon en relation de la longévité des moustiques (G1) et des allèles.

Diversité haplotypique (d) et arbre phylogénétique en utilisant une méthode du maximum de vraisemblance (e) en fonction des allèles au locus *GSTe2*.

III.1.1.4.5. Impact de la mutation L119F au locus *GSTe2* sur la compétitivité d'accouplement des mâles sauvages d'*Anopheles funestus*

Après génotypage du locus *GSTe2*, une fréquence faible mais non significative de l'allèle résistant 119F a été enregistrée chez les mâles accouplés (23,8%) comparée aux mâles non accouplés (33,5%) (**Tableau XI**).

Tableau X : Répartition des génotypes au locus L119F du gène *GSTe2* entre les mâles accouplés, les femelles accouplées et les mâles non couplés comparés aux femelles collectées à l'intérieur des maisons.

Groupes	Génotypes au locus <i>GSTe2</i>		
	119F/F-RR	119L/F-RS	L/L119-SS
Mâles accouplés	4 (19%)	2 (10%)	15 (71%)
Mâles non accouplés	14 (16%)	33 (36%)	44 (48%)
Femelles accouplés	7 (33%)	4 (19%)	10 (48%)
	Allèles de la mutation L119F		
	119F		L119
Mâles accouplés	23.8%		76.2%
Mâles non accouplés	33.5%	/	66.5%
Femelles accouplés	42.9%		57.1%

Aucune différence significative n'a été observée dans la distribution des génotypes entre mâles accouplés et mâles non accouplés ($P \geq 0,16$). Toutefois, l'évaluation de l'association entre les différents génotypes et le succès de l'accouplement avec les RC a révélé que les mâles de génotype hétérozygote (L119F-RS) avaient une compétitivité d'accouplement significativement inférieure à celle des homozygotes résistants (RC = 4,2 IC : 1,49-11,9 ; $P < 0,01$) et homozygotes sensibles (RC = 7,2 IC : 3,1 - 16,8 ; $P < 0,0001$) (**Tableau XI ; Figure 31**). En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les moustiques homozygotes résistants et homozygotes sensibles (RC = 1,77 ; IC 0,77-3,7 ; $P = 0,22$). L'impact de

l'allèle résistant 119F sur la compétitivité d'accouplement a été confirmé par la probabilité considérablement plus grande des moustiques porteur de cet allèle à ne pas s'accoupler comparer aux individus ayant l'allèle sensible L119 (RC = 2,1 ; IC 1,1 à 4,0 ; $P = 0,03$) (**Tableau XII**).

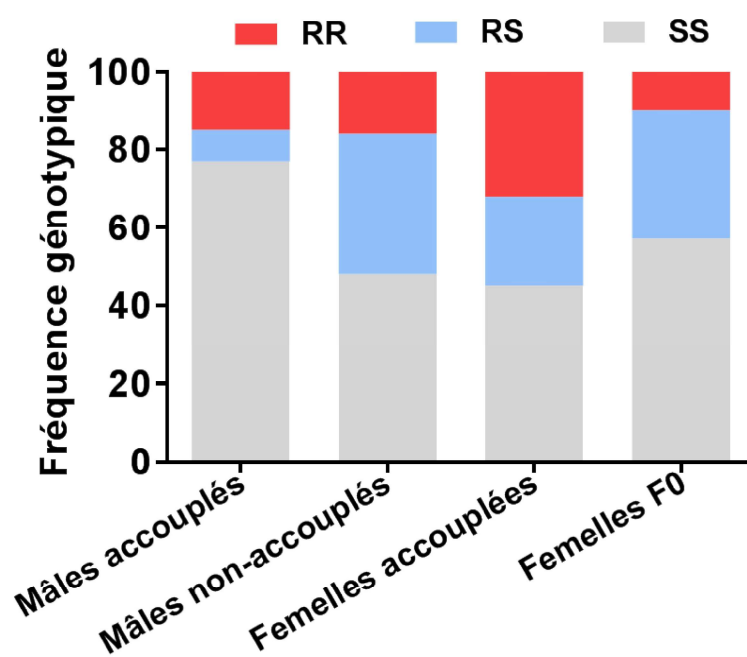


Figure 31 : Répartition des génotypes au locus L119F-GSTe2 entre les mâles accouplés, les mâles non accouplés et les femelles accouplées.

Tableau XI : Niveau d'association de différents génotypes au locus L119F-GSTe2 et le succès d'accouplement.

Génotypes au locus L119F-GSTe2	Niveau d'association	
	RC	Valeur de P
SS vs RR	1,77 (0,77– 3,77)	0,22
SS vs RS	7,2 (3,1 – 16,8)	<0,0001*
RR vs RS	4,2 (1,49-11,9)	0,010*
S vs R	2,1 (1,1-4,0)	0,03*

*, différence significative

III.1.2. Coût biologique de la résistance métabolique médiée par le cytochrome P450

III.1.2.1. Résultat du croisement et du profil de résistance de la souche hybride

Les tests de résistance réalisés sur des moustiques de la génération F4 issue des croisements réciproques entre les femelles FANG/mâles FUMOZ (FANG/FUMOZ) et femelles FUMOZ/mâles FANG (FUMOZ/FANG) ont montré que les deux souches hybrides sont résistantes aux pyréthriinoïdes et aux carbamates mais modérément résistantes au DDT (mortalité de 93%) (**Figure 32**).

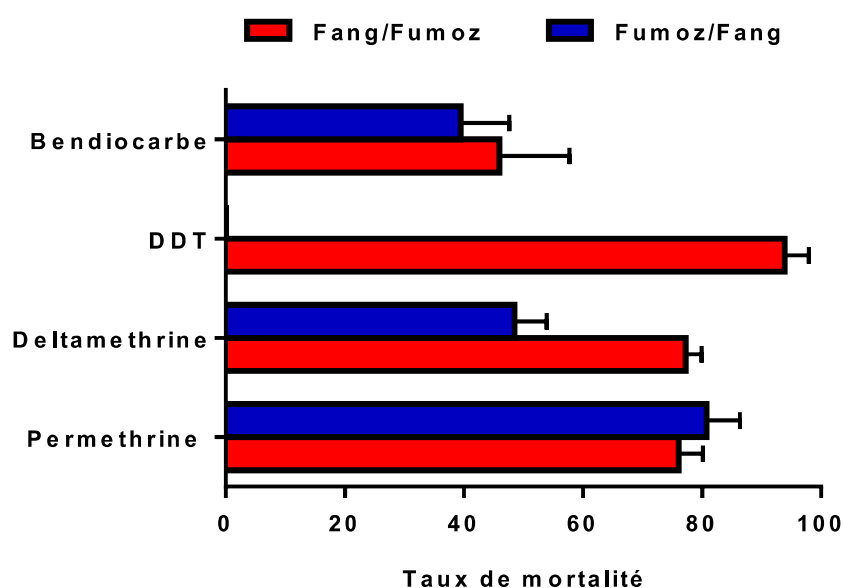


Figure 32 : Profil de susceptibilité aux insecticides chez les souches hybrides générées par le croisement entre la souche résistante (FUMOZ) et la souche sensible de référence (FANG).

Fang / Fumoz représente la lignée obtenue du croisement entre les femelles Fang et les mâles Fumoz, alors que Fumoz/Fang représente la lignée obtenue du croisement entre femelles Fumoz et mâles Fang ; Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Le niveau de résistance était inférieur à celui de la souche mère résistante FUMOZ_R, avec un taux de mortalité compris entre 76,1 et 80,7% après une heure d'exposition à la perméthrine. Cependant, une différence significative a été observée après exposition à la deltaméthrine avec un taux de mortalité plus élevé enregistré pour la souche issue du croisement entre les femelles FUMOZ_R et les mâles FANG (mortalité de 48,5%) comparé à la souche

obtenue des femelles FANG et mâles FUMOS_R (77,3%) (**Figure 32**). Cette différence du taux de mortalité entre les deux souches pourrait indiquer l'implication de certains gènes candidats situés dans le chromosome X dans la résistance à la deltaméthrine tel que le *CYP9K1*. Pour le bendiocarbe (carbamate), le profil de résistance était similaire pour les deux souches hybrides.

III.1.2.2. Validation de l'implication du gène *CYP6P9a* dans la résistance aux pyréthri-noïdes

L'évaluation par RT-qPCR du niveau d'expression du *CYP6P9a* chez la souche hybride après exposition à la perméthrine et à la deltaméthrine a montré une différence significative du niveau d'expression de ce gène comparé à la souche sensible FANG. Le niveau d'expression chez les moustiques survivants à la perméthrine a été de $FC = 16,6 \pm 4,7$, $P = 0,01$. Pour les survivants à la deltaméthrine, il a été de $FC = 8,8 \pm 4,7$, $P = 0,04$ et de $FC = 7,9 \pm 2,12$, $P = 0,01$ chez les moustiques non exposés (**Figure 33a**) confirmant que ce gène joue un rôle dans la résistance observée. Cependant, le niveau d'expression n'a pas été significativement différent entre les moustiques exposés comparé au non exposés (**Figure 33a**) montrant que le gène est exprimé de manière constitutive chez ces moustiques.

Afin de valider le rôle de l'allèle résistant (*CYP6P9a_R*) récemment détecté dans la résistance aux pyréthri-noïdes observée, nous avons évalué la corrélation entre cet allèle et la capacité des moustiques à survivre à l'exposition aux insecticides. Des taux de mortalité de 39,0% et 42,3% après 30 minutes d'exposition et de 81,3% et 86,3% après 90 minutes d'exposition ont été obtenus pour la perméthrine et la deltaméthrine respectivement (**Figure 33b**).

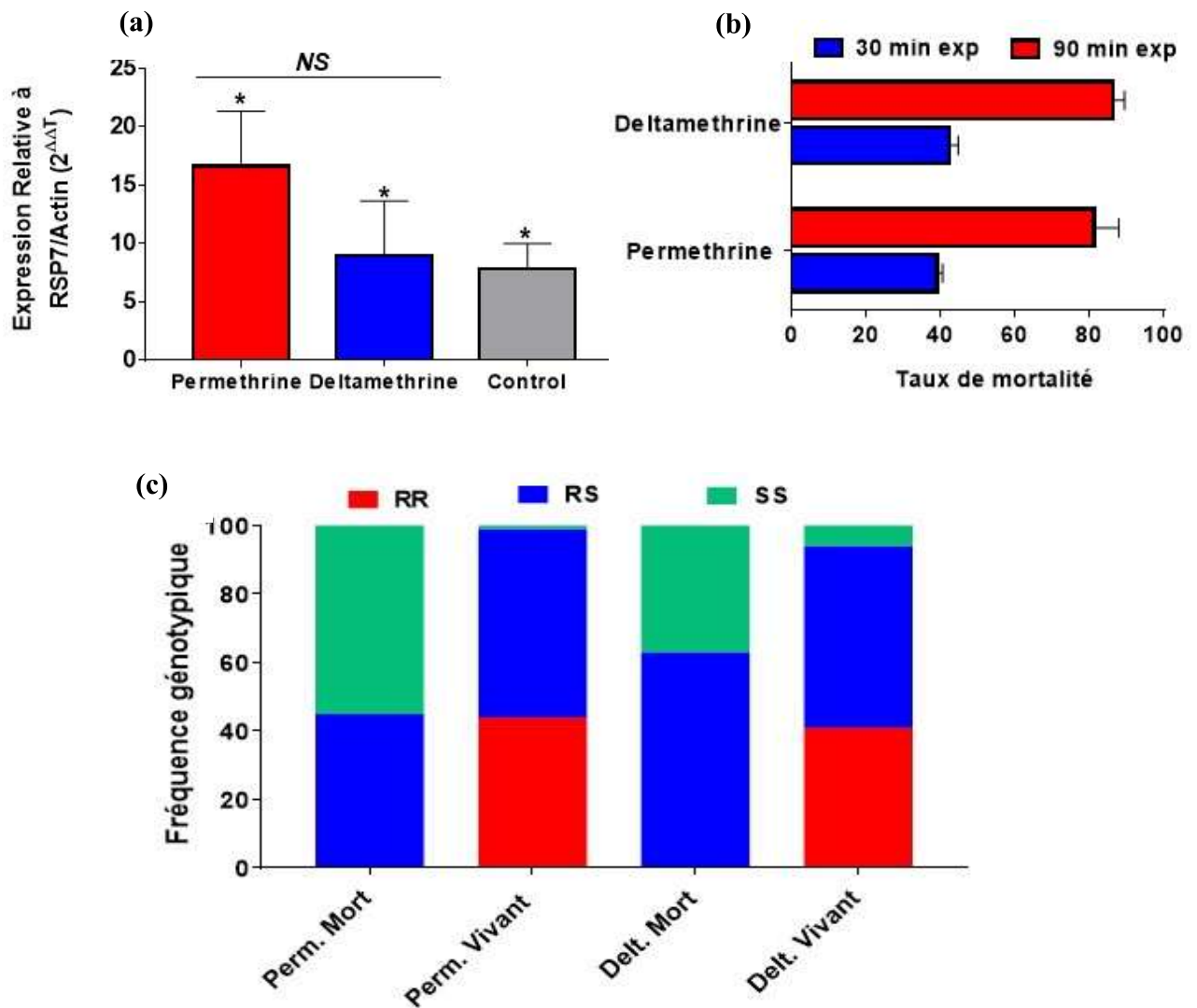


Figure 33 : Histogramme présentant le niveau d'expression du gène *CYP6P9a*, les taux de mortalité après exposition aux insecticides et les résultats du génotypage du locus *CYP6P9a* permettant de valider l'implication de ce gène dans la résistance aux pyréthrinoïdes.

- (a) Expression différentielle par RT-qPCR du gène *CYP6P9a* chez les moustiques hybrides résistants à la perméthrine et à la deltaméthrine en comparaison avec la souche sensible FANG ; (*) indique une expression différentielle statistiquement significative du gène *CYP6P9a* comparée à la souche sensible, NS : non significatif. (b) Taux de mortalité de la souche hybride FANG / FUMOZ à deux temps d'exposition afin de valider la corrélation entre le gène *CYP6P9a* et la résistance phénotypique aux pyréthrinoïdes ; (c) distribution des génotypes au locus *CYP6P9a* en fonction des phénotypes de résistance ; Perm = perméthrine et Delt = deltaméthrine.

Le génotypage du gène *CYP6P9a* chez les moustiques morts après 30 minutes d'exposition et ceux survivants à 90 minutes d'exposition à ces insecticides a montré que la capacité des moustiques homozygotes résistants à survie après exposition était supérieure à celle des moustiques homozygotes sensibles (RC = 693 ; IC 88-5421 ; $P < 0,0001$) (**Figure 33c**).

III.1.2.3. Effet du gène *CYP6P9a* sur les traits de vie d'*Anopheles funestus*

III.1.2.3.1. Effet du gène *CYP6P9a* sur la fécondité et la fertilité des femelles

Une différence non significative a été observée dans la distribution des génotypes entre les femelles qui ont pondu avec succès et celles n'ayant pas pondu ($\chi^2 = 4,3$; ddl = 2 ; $P > 0,1$) (**Figure 34a**). Cependant, une fréquence plus élevée mais non significative également ($\chi^2 = 1,65$; $P = 0,19$) de l'allèle résistant *CYP6P9a_R* a été observée chez les femelles n'ayant pas pondu (39%) comparée aux femelles qui ont pondu (33%). Le niveau d'association entre les génotypes au locus *CYP6P9a* et le succès de ponte des femelles est consigné dans le tableau XII et à la **figure 34b**. En outre, le nombre médian d'œufs pondus pour les femelle de génotype *CYP6P9a_RR* était de $53,7 \pm 10,05$ (min = 7 ; max = 124). La médiane était de $69,58 \pm 5,04$ (variant de 4 et 137) pour les *Cyp6p9a_RS*, tandis que *Cyp6p9a_SS* pondait en moyenne $74,52 \pm 4,06$ œufs par femelle (variant entre 8 et 185) (**Figure 34c**). Cela indique que les moustiques homozygotes sensibles ont tendance à pondre plus d'œufs que les femelles d'autres génotypes, mais la comparaison du nombre médian d'œufs pondus par génotype à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-wallis a révélé aucune différence non significative ($P = 0,2$) (**Figure 34 d et e**).

Tableau XII : Niveau d'association entre les génotypes au locus *CYP6P9a* et la capacité des femelles d'*An. funestus* de laboratoire à pondre.

Génotypes au locus <i>CYP6P9a</i>	Niveau d'association	
	RC	Valeur de P
SS vs. RR	2,0 (0,7–5,7)	0,15
SS vs. RS	2,04 (1,1–3,8)	0,01 *
RS vs. RR	1 (0,4–2,6)	0,57
S vs. R	1,4 (0,8 –2,6)	0,1

SS : homozygotes sensibles ; RR : homozygotes résistants ; RS : hétérozygotes ; (*) différence significative

En ce qui concerne la viabilité des œufs pondus, les moustiques Cyp6p9a_RR ont donné $28,0 \pm 10,31$ larves (min = 0 ; max = 98) avec à un taux d'éclosion de $39\% \pm 11,86\%$. Pour les moustiques Cyp6p9a_RS, le nombre moyen de larves était de $43,7 \pm 4,9$ larves (min = 0 ; max = 125) correspondant à un taux d'éclosion de $56,1\% \pm 4,0\%$, tandis que les moustiques Cyp6p9a_SS ont donnée $52,6 \pm 4,0$ larves (min = 0 ; max = 118) correspondant à un taux d'éclosion de $67,0\% \pm 3,9\%$ (**Figure 31d**). Le nombre moyen de larves était plus faible chez les Cyp6p9a_RR ($P = 0,02$) ainsi que pour le taux d'éclosion ($P < 0,04$) (**Figure 31e**).

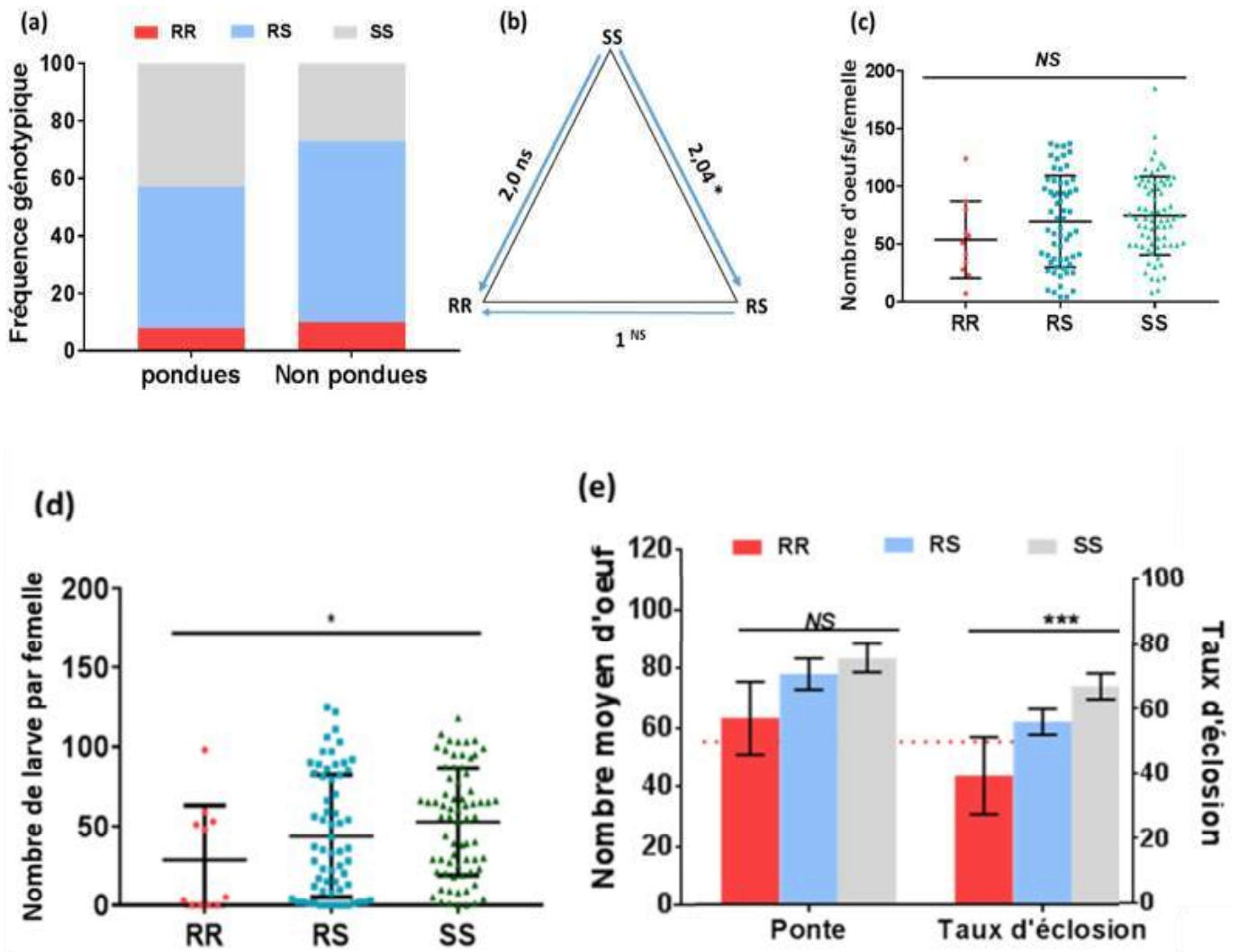


Figure 34 : Association entre le gène *CYP6P9a* et la fécondité/fertilité des femelles d'*An. funestus*.

(a) et (b), représentation schématique de l'impact des génotypes au locus *CYP6P9a* sur le succès de ponte par estimation des rapports de côte ; (c) Nombre d'œufs pondus et de de larves (d) obtenues par femelle de différents génotypes ; (e) comparaison du nombre moyen d'œufs pondus et du taux d'éclosion entre les trois génotypes au locus *CYP6P9a*. La valeur médiane avec l'intervalle interquartile sont indiqués pour chaque distribution. La ligne pointillée indique les femelles pour lesquelles au moins 50 œufs ou larves ont été obtenus. *** : différence significative à $p < 0,001$; * différence significative à $p < 0,05$; NS : non significatif

III.1.2.3.2. Influence du gène *CYP6P9a* sur la mortalité et la vitesse de développement larvaires

L'éclosion des œufs a eu lieu 2 jours après la ponte et le temps de développement du stade larvaire au stade nymphal était de $12,5 \pm 4,5$ jours au total. Le génotypage de 100 larves prises au hasard à chaque stade de développement (L1, L2, L3 et L4) à la génération F8 a révélé une diminution significative et constante de l'allèle résistant *CYP6P9a-R*, indiquant soit une mortalité plus importante soit un développement plus lent des moustiques résistants. Une réduction de la proportion des homozygotes résistants a été observée de L1 (11%) à L4 (5%) bien que non significatif, probablement en raison du nombre réduit des individus de ce génotype ($\chi^2 = 1,7$; $P = 0,2$) (**Figure 35a & b**).

Une réduction statistiquement significative de la proportion des individus de génotype hétérozygote a été observée de façon constante de L1 (49%) à L4 (27%) ($\chi^2 = 7,2$; $P = 0,007$) ainsi qu'une augmentation significative de la proportion des individus de génotype homozygotes sensibles de L1 (40%) à L4 (68%) ($\chi^2 = 12,15$; $P = 0,0004$) confirmant le coût biologique élevé du *CYP6P9a* sur les moustiques résistants.

Les nymphes ont été obtenues à partir du 9^e (pupes J9) au 17^e (pupes J17) jour après éclosion et la plupart des nymphoses (plus de 75%) ont été obtenues au 11^e jour après éclosion (pupes J11). La comparaison des fréquences génotypiques au locus *CYP6P9a* entre les nymphes obtenues à J9, J11 et J13 a révélé une diminution constante de la proportion des homozygotes sensibles de J9 (58%) à J11 (34%) ($\chi^2 = 1,73$; $P = 0,2$). Par opposition, une augmentation significative de la proportion des homozygotes résistants et des hétérozygotes de J9 à J13 ($\chi^2 = 11,2$; $P = 0,0008$) indiquant que les moustiques homozygotes sensibles se développeraient significativement plus vite que les moustiques homozygotes résistants et hétérozygotes raison pour laquelle leur proportion baisse (**Figure 35c & d**).

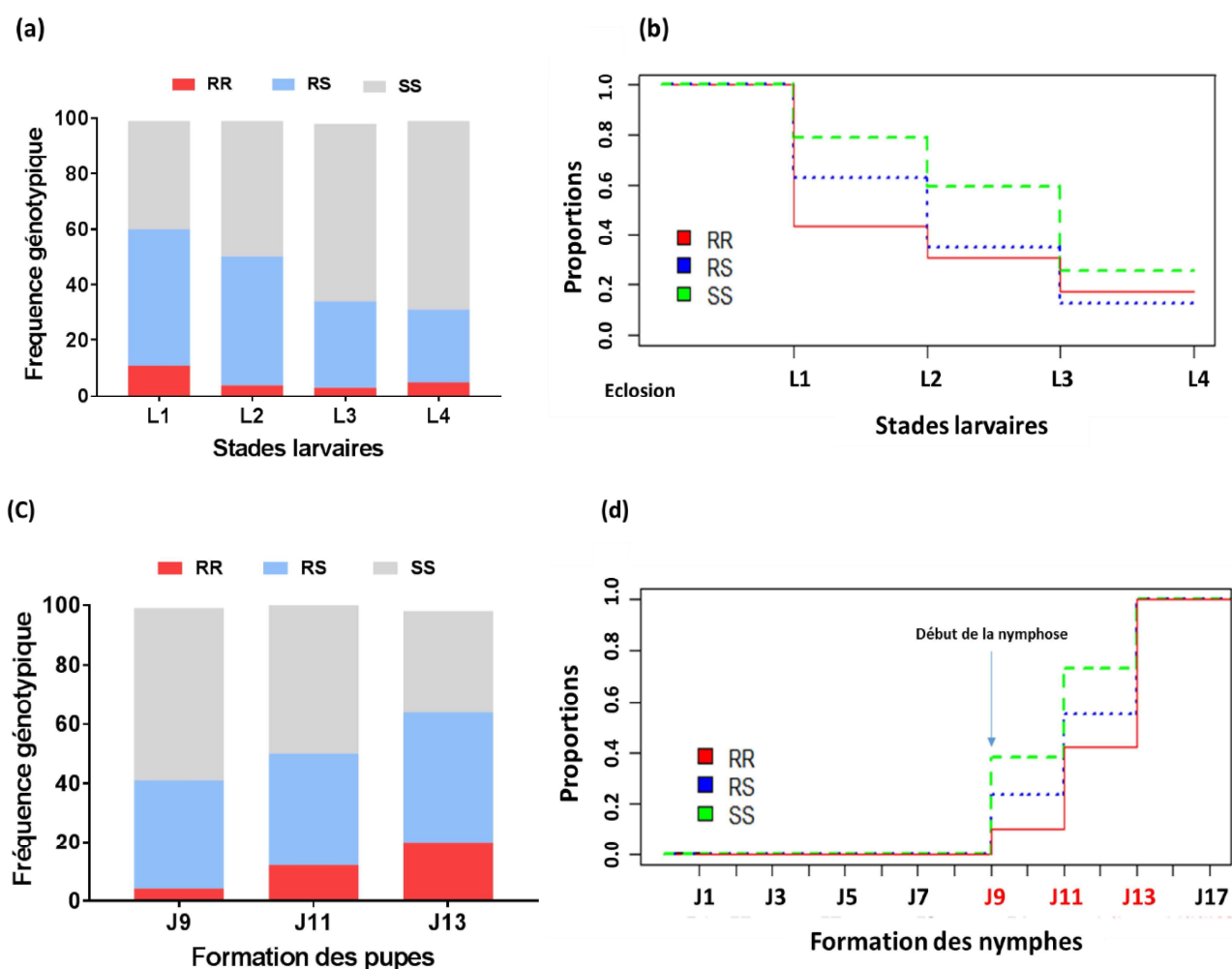


Figure 35 : Distribution des génotypes du locus *CYP6P9a* à différents stade de développement des stades immatures d'*An. funestus*.

(a) Histogramme de la variation de la fréquence des génotypes au cours du développement des larves (L1, L2, L3 et L4 représentent différents stades larvaires) et la formation de pupes (b) ; c) la proportion de larves vivant à chaque stade de développement, de l'éclosion (J1) à la formation des nymphes ; d) la proportion de nymphes obtenues aux J9, J11 ET J13 de développement. Les barres et les lignes colorées indiquent respectivement les génotypes *CYP6P9a*-RR, *CYP6P9a*-RS et *CYP6P9a*-SS. Les erreurs types ($n = 3$) sont également indiquées pour les histogrammes.

L'évaluation des RC pour la formation des pupes a également confirmé que les moustiques de génotype *Cyp6p9a*-SS se développent plus vite que ceux *CYP6P9a*-RR (RC > 2,50 ; $P < 0,01$) et *Cyp6p9a*-RS (RC > 1,18 ; $P < 0,6$) (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Niveau d'association entre les génotypes au locus *CYP6P9a* et la formation des nymphes d'*An. funestus*.

Génotypes locus <i>CYP6P9a</i>	J ₉ , J ₁₁		J ₉ , J ₁₃		J ₁₁ , J ₁₃	
	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P
SS vs. RR	3,0 (0,5–16,3)	0,2	7,5 (1,5–34,4)	0,007*	2,5 (0,6–1,9)	0,1
SS vs. RS	1,2 (0,9–2,2)	0,08	2,03 (0,9–4,9)	0,08	1,7 (0,7–3,9)	0,2
RS vs. RR	2,5 (0,5–14,3)	0,3	3,7 (0,7–18,7)	0,09	1,4 (0,5–4,5)	0,5
S vs. R	1,5 (0,8–2,8)	0,1	2,5 (1,4–4,6)	0,002*	1,7 (0,9–3,0)	0,05*

(*), différence significative.

III.1.2.3.3. Effet du gène *CYP6P9a* sur la longévité des femelles de laboratoire

La durée de vie des femelles de laboratoire d'*An. funestus* a varié de 12 à 44 jours en moyenne. Au total, 100 moustiques vivants ont été génotypés à J1, J10, J20 et J30 après émergence des adultes afin d'évaluer l'association entre l'allèle résistant *CYP6P9a*-R et la longévité des adultes. La comparaison des fréquences génotypiques et alléliques n'a montré aucune différence dans la distribution des génotypes ($\chi^2 = 1,6$; $P = 0,9$) (**Figure 36a**) et des allèles ($\chi^2 = 0,65$; $P = 0,88$) de J1 à J30 (**Figure 36b**).

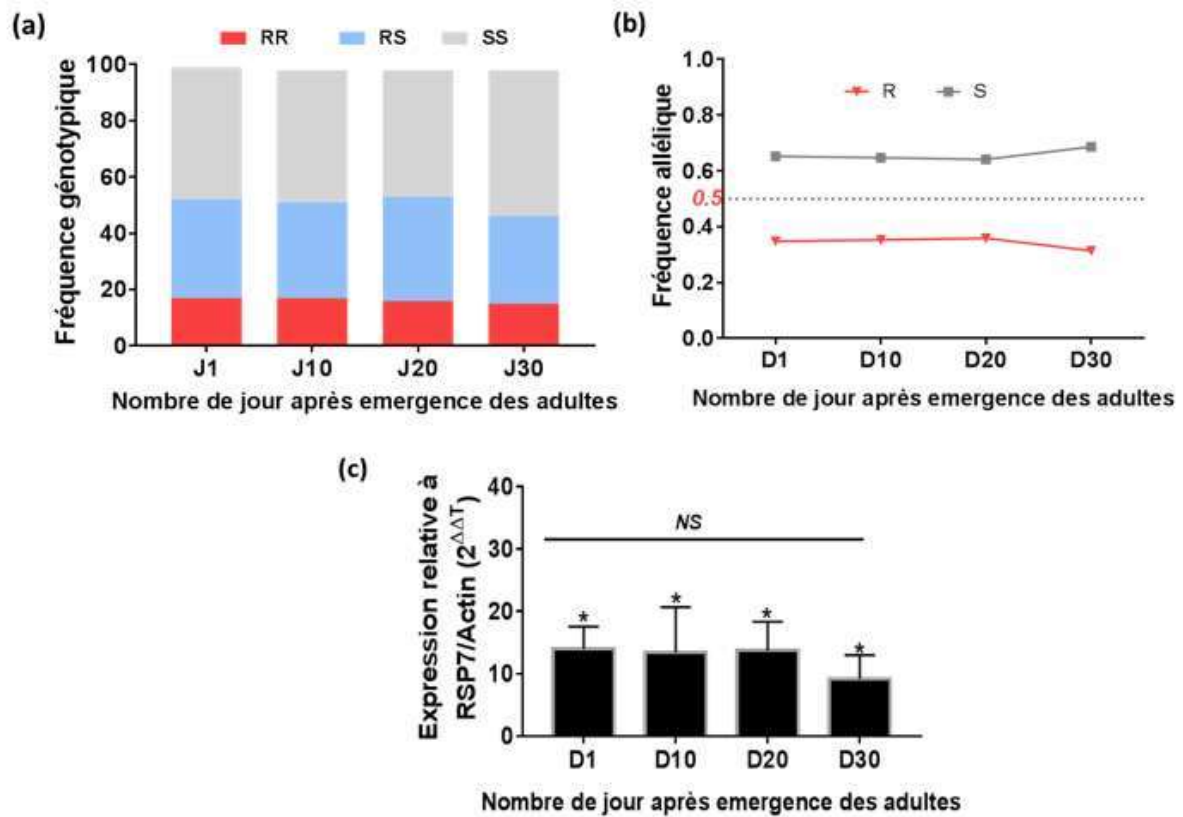


Figure 36 : Influence de l'allèle CYP6P9a_R sur la longévité des adultes d'*An. funestus*.

Distribution des génotypes (a) et des allèles (b) à différents intervalles de temps chez les moustiques vivants ; (c) expression différentielle par RT-qPCR du gène *CYP6P9a* chez les moustiques vivants à différents intervalles de temps comparé à la souche sensible de laboratoire FANG. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne.

En outre, l'évaluation des RC n'a montré aucune différence entre la durée de vie des moustiques homozygotes sensibles CYP6P9a_SS et homozygotes résistants Cyp6p9a_RR (RC <1.1 ; $P > 0.4$) ainsi que des hétérozygotes Cyp6p9a_RS (RC <1.1 ; $P > 0.2$) **Tableau XIV.**

Tableau XIV : Niveau d'association entre les génotypes au locus *CYP6P9a* et la longévité des adultes.

Génotypes locus <i>CYP6P9a</i>	D ₁ , D ₁₀		D ₁ , D ₂₀		D ₁ , D ₃₀		D ₁₀ , D ₂₀		D ₁₀ , D ₃₀		
	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	
SS vs. RR	1,1 (0,5-2,3)	0,5	1,0 (0,5-2,2)	0,5	0,8 (0,3-2,1)	0,4	0,8 (0,3-2,1)	0,4	0,8 (0,3-1,7)	0,3	0,8 (0,3-2,1)
SS vs. RS	1,0 (0,5-1,8)	0,5	1,1 (0,6-2,0)	0,4	0,7 (0,3-1,5)	0,2	0,7 (0,3-1,5)	0,2	0,6 (0,3-1,2)	0,1	0,7 (0,3-1,5)
RS vs. RR	1,1 (0,75-2,24)	0,5	0,9 (0,4-2,0)	0,5	1,1 (0,4-3,1)	0,5	1,1 (0,4-3,1)	0,5	1,2 (0,5-2,7)	0,4	1,1 (0,4-3,1)
S vs. R	1,04 (0,5-1,9)	0,5	1,04 (0,5-1,9)	0,5	0,8 (0,5-1,5)	0,3	1 (0,6-1,8)	0,5	0,8 (0,4-1,4)	0,3	0,8 (0,4-1,4)

L'évaluation du niveau d'expression du *CYP6P9a* de J1 à J30 n'a montré aucune différence significative du niveau d'expression de ce gène de J1 (degré de différence (DD) = 14,03 ± 3,50), J10 (DD = 13,4 ± 7,2), J20 (DD = 13,7 ± 4,6) à J30 (DD = 9,2 ± 3,8) (F = 1,08 ; P = 0,4) montrant que ce gène de résistance n'affecte pas la durée de vie de ces moustiques (**Figure 36c**).

III.1.2.4. Évaluation de la restauration de la sensibilité aux insecticides chez *Anopheles funestus* s.s en absence de pression de sélection.

Les expérimentations en cage ont été menées pour évaluer une restauration potentielle de la sensibilité en contrôlant les changements de fréquence de l'allèle résistant CYP6P9a-R sur 10 générations non chevauchantes, en absence de pression de sélection d'insecticide. Chez la souche hybride F₁, obtenu après croisement entre FANG et FUMOZ les fréquences alléliques étaient de 50% pour l'allèle résistant et de 50% pour l'allèle sensible. En effet, s'il existe un impact réel de la résistance sur les traits de vie du moustique, on devrait s'attendre à ce que la fréquence de l'allèle sensible augmente au fil des générations, ce qui a bien été confirmé dans cette étude. Une augmentation significative et constante de la proportion des moustiques homozygotes sensibles a été observée de la première génération F₁ (0%) à la dixième (54%) (**Figure 37a**) ainsi que de la fréquence de l'allèle sensible de F₁ (50%) à F₁₀ (70%) ($x_2 = 3,6$; $P = 0,05$) (**Figure 37b**). Le **tableau XV** présente le détail sur le nombre de moustiques génotypés à chaque génération.

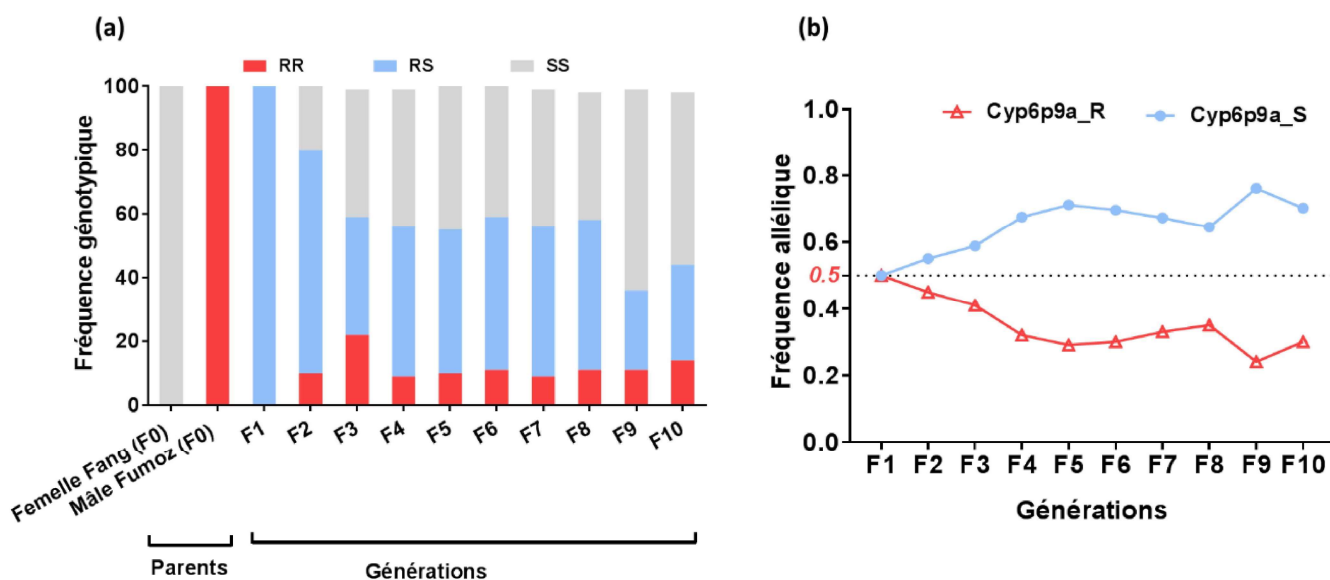


Figure 37 : Évaluation de la restauration de la sensibilité chez la souche hybride FANG / FUMOZ.

Variation de la fréquence des génotypes (a) et des allèles (b) du gène *CYP6P9a* pendant dix générations dans un environnement sans insecticides. F représente chaque génération tandis que la ligne en pointillée indique une fréquence de 50% pour les allèles résistants et sensibles.

Tableau XV : Variation de la fréquence des génotypes (a) et des allèles (b) du gène *CYP6P9a* pendant dix générations dans un environnement sans insecticides.

		Génération									
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
		Génotypes									
CYP6P9a-RR	0 (0%)	2 (10%)	9 (22%)	12 (9%)	9 (11%)	15 (15%)	5 (10%)	11 (12%)	5 (11%)	6 (14%)	
CYP6P9a-RS	45 (100%)	14 (70%)	15 (38%)	65 (47%)	31 (36%)	48 (48%)	26 (47%)	44 (47%)	11 (25%)	13 (31%)	
CYP6P9a-SS	0 (0%)	4 (20%)	16 (40%)	60 (44%)	45 (53%)	36 (37%)	24 (43%)	38 (40%)	28 (64%)	23 (55%)	
Total	45	20	40	137	85	99	55	93	44	42	
		Allèles									
CYP6P9a-R	50%	45%	41%	32%	29%	30%	33%	35%	24%	30%	
CYP6P9a-S	50%	55%	59%	68%	71%	70%	67%	65%	76%	70%	
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

III.1.3. Impact de la résistance métabolique sur l'infection a *Plasmodium* spp chez *An. funestus* : cas du gène *GSTe2*

III.1.3.1. Taux d'infection des moustiques sauvages par *Plasmodium* spp

A Obout, un total de 508 femelles du groupe *An. funestus* s.l. (moustiques entiers) sélectionnées au hasard parmi les moustiques collectés sur le terrain ont été testés pour l'infection par *Plasmodium*. Le taux global d'infection par ce parasite était très élevé dans cette localité, avec une prévalence totale de 57,1% (**Figure 38a**) dont 23% (119/508) infectés par *P. falciparum* (falcip +), 19% (95/508) par *P. ovale / vivax / malariae* (OVM +), contre 14,7% (76/508) co-infectés à la fois par falcip + et par OVM +.

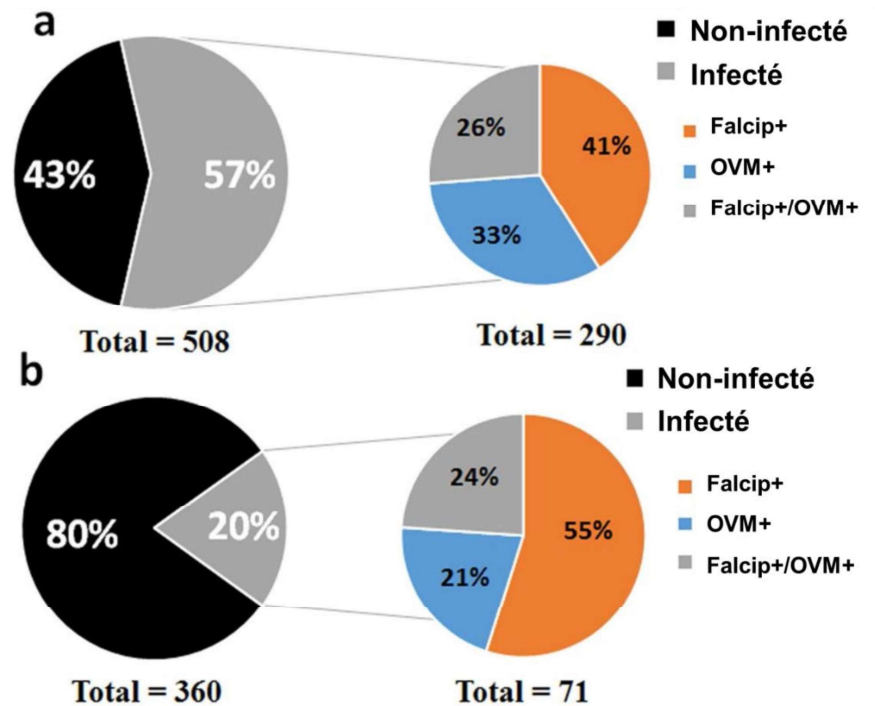


Figure 38 : Portion d'individus *An. funestus* s.l. d'Obout (a) et Mibellon (b) infectée par *Plasmodium* spp en utilisant la méthode TaqMan.

N, nombre total de moustiques testés ; Falcip +, infection par *Plasmodium falciparum*; Falcip + / OVM +, co-infection par *Plasmodium falciparum* et *P. ovale / vivax / malariae* ; OVM +, infection à *P. ovale / vivax / malariae*.

Sur 81 *An. funestus* disséqués en tête + thorax et analysés par la technique de PCR TaqMan, 12 (14,8%) ont été porteurs de sporozoïtes. Parmi les 12 moustiques infectés, 8 (9,9%) étaient porteurs de sporozoïtes à *P. falciparum*, 2 (2,5%) d'infection mixte par *P. falciparum* +/OVM + et 2(2,5%) de sporozoïtes à OVM +. Les oocystes ont été retrouvés chez 25 (30,8%) de moustiques dont 16 (19,7%) *falciparum* +, 3 (3,7%) *falciparum* +/OVM+ et 6 (7,4%) OVM +. Afin de confirmer le statut d'infection des moustiques et discriminer les parasites du groupe OVM+, la méthode dite *Nested-PCR* a été réalisée sur tous les moustiques positifs à l'infection (stade oocyste) par la méthode TaqMan. L'ensemble de l'infection par *P. falciparum* a été confirmé par cette technique (**Figure 39a**). La *Nested-PCR* a révélé que les trois moustiques *falciparum* +/OVM + étaient co-infectés par *P. falciparum* et *P. malariae*. Sur les 18 OVM + obtenu par TaqMan, 14 se sont révélés infectés par *P. malariae* (**Figure 39c**) et les quatre restants n'ont pas pu être amplifiés. Ces observations indiquent que *P. falciparum* et *P. malariae* sont en circulation dans cette localité.

A Mibellon, sur les 360 moustiques entiers testés, 71 (19,7%) ont été infectés par *Plasmodium*, dont 39 (10,8%) *falciparum*+, 15 (4,2%) OVM + et 17 (4,7%) co-infection à *falciparum*+/OVM + (**Figure 39b**). Parmi les 60 moustiques disséqués en tête/thorax et abdomen, 13 (20%) étaient positifs pour la recherche des oocystes et 3 (5%) positifs pour les sporozoïtes avec 2 (3,3%) *falciparum* +, 0 (0%) *falciparum* + / OVM+ et 1 (1,7%) OVM+. La validation par *nested-PCR* chez les moustiques à oocystes positifs a confirmé les six *falciparum* +, tandis que les deux co-infectés (*falciparum* +/OVM +) ont été confirmés comme étant positifs pour *P. falciparum* et *P. malariae*. Parmi les quatre tests OVM+ par la PCR Taqman, deux étaient infectés par *P. ovale* et deux par *P. malariae*, ce qui montre que *P. falciparum*, *P. ovale* (**Figure 39b**) et *P. malariae* sont tous présents à Mibellon.

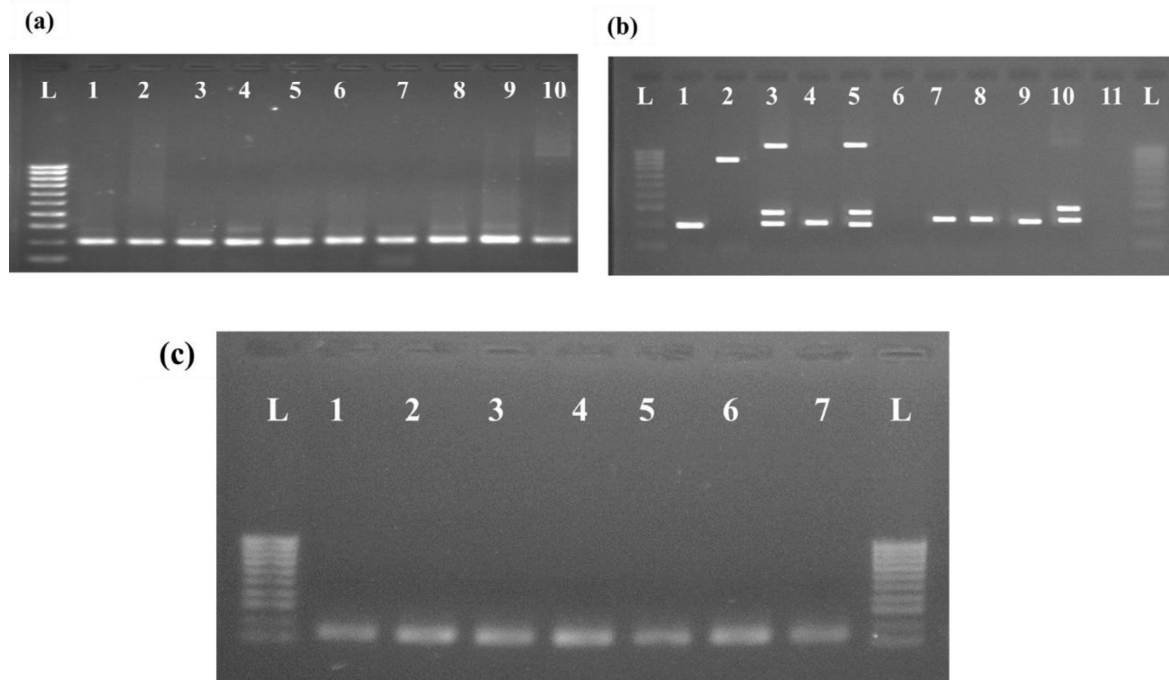


Figure 39 : Photographie du gel obtenu après amplification par *Nested-PCR* sur les moustiques positifs à l'infection par *Plasmodium* spp avec la méthode TaqMan.

- (a) L = Marqueur de poids moléculaire 100 pb, 1-10 = *P. falciparum* (205 pb); (b) L = Marqueur de poids moléculaire 100 pb; 1, 3-5, 7-10 = *P. falciparum* (205 pb); 2 *P. ovale* (800 pb), 11 = contrôle négatif (c) L = Marqueur de poids moléculaire 100 pb, 1-7 = *P. malariae* (144 pb).

III.1.3.2. Niveau d'association entre la mutation L119F au locus *GSTe2* et l'infection à *Plasmodium* spp

Au total, 174 moustiques entiers (infectés et non infectés choisis au hasard parmi les 508 testés pour l'infection à *Plasmodium*) provenant d'Obout ont été génotypés au locus L119F-GSTe2 (**Tableau XVI**). Pour les moustiques infectés, 33,7% ont été homozygotes résistants 119F/F-RR, 47,2% hétérozygotes L119F-RS et 19,1% ont été homozygotes sensibles L/L119-SS (**Figure 40a**). Une distribution similaire des trois génotypes a été observée chez les moustiques non infectés ($\chi^2 = 0,34$; $P = 0,82$), avec 31,7% d'individus de génotype 119F/F-RR, 49,4% de génotype L119F-RS et 18,8% L/L119-SS. L'absence de corrélation significative entre les génotypes au L119F-GSTe2 et l'infection à *Plasmodium* spp chez les moustiques entiers a été confirmée par l'évaluation des rapports de cotes (**Tableau XVI**).

Tableau XVI: Distribution des génotypes au locus L119F-GSTe2 chez *An. funestus* en fonction de son statut d'infection à *Plasmodium* spp.

Statut d'infection	N	Génotypes au locus L119F-GSTe2			Tests de χ^2	Valeur de P
		RR	RS	SS		
Obout	Infectés	89	30	42	0,34	0.82
	non infectés	85	27	42		
	% infection totale		52,6%	50%		
Mibellon	Infectés	41	2	18	0,11	0.94
	non infectés	143	8	59		
	% infection totale		20%	23,3%		

N, Nombre total de moustiques génotypes ; RR, homozygotes résistants ; RS, hétérozygotes ; SS, homozygotes sensible.

A Mibellon, 184 moustiques entiers sélectionnés au hasard parmi les 360 femelles collectées sur le terrain et examinées pour l'infection à *Plasmodium* spp ont été génotypés avec succès. La fréquence globale de l'allèle résistant pour l'allèle résistant 119F-GSTe2 était de 26,3% dans les deux groupes de moustiques (infectés et non infectés). Aucune différence significative n'a été trouvée dans la distribution des génotypes entre les moustiques infectés et non infectés ($\chi^2 = 0,1$; $P = 0,95$) (**Figure 38b ; Tableau XVI**).

III.1.3.3. Niveau d'association entre la mutation L119F et l'infection oocystique et sporozoïtique

A Obout, la distribution des génotypes au locus L119F-GSTe2 chez les moustiques portant les oocystes était la suivante : 28% (7/25) 119F/F-RR, 40% (10/25) L119F-RS et 32% (8/25) L / L119F-SS (**Figure 40c**). Aucune différence significative n'a été observée dans la distribution des génotypes entre les moustiques infectés et non infectés ($\chi^2 = 3,58$ $P = 0,17$) (**Tableau XVII**) par ce stade du parasite. Cependant, au stade de sporozoïte, 50% (6/12) des moustiques infectés étaient

119F/F-RR, 33% (4/12) des hétérozygotes et 17% (2/12) des homozygotes sensibles (**Figure 40d ; Tableau XVII**).

Contrairement à l'infection au stade oocystique, une différence significative a été observée dans la distribution des génotypes entre les moustiques infectés et non infectés ($\chi^2 = 9,79 ; P = 0,007$) par le stade sporozoïtique. L'évaluation des RC entre moustiques infectés par le sporozoïte et moustiques non infectés a révélé que les moustiques homozygotes résistants étaient plus susceptibles de porter les sporozoïtes que les hétérozygotes (RC = 2,10 ; IC 95%: 1,1–3,97 ; $P = 0,013$) et les homozygotes sensibles (RC = 2,46 ; IC 95%: 1,15–5,26 ; $P = 0,012$). Aucune différence n'a été observée entre les moustiques hétérozygotes et sensibles (RC= 1,17 ; $P = 0,41$) (**Tableau XVII**). Ces résultats montrent que les moustiques homozygotes résistants favoriseraient le développement du *Plasmodium* jusqu'au stade infectieux comparé aux moustiques sensibles.

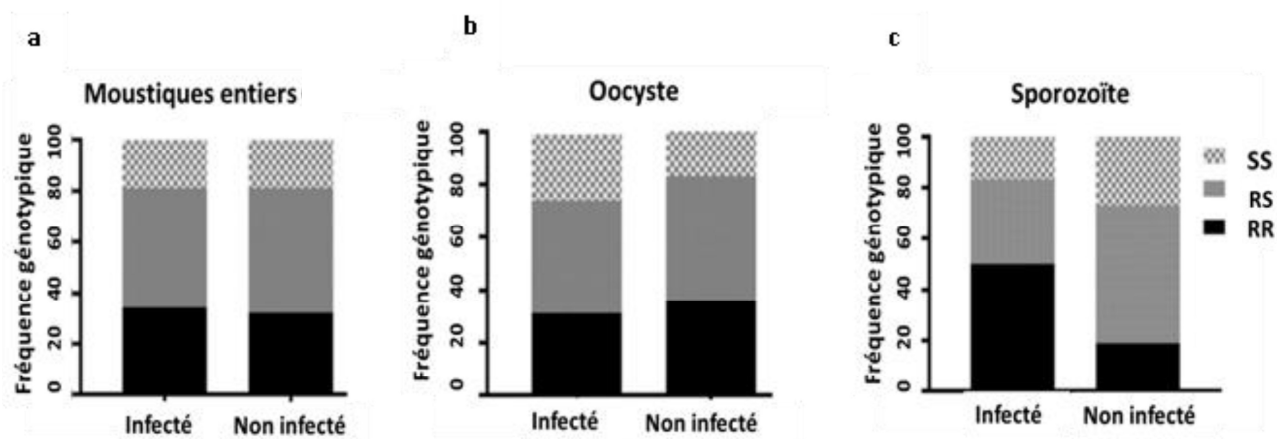


Figure 40 : Influence de la résistance métabolique (L119F-GSTe2) sur l'infection et la transmission du *Plasmodium* au sein des populations naturelles d'*An. funestus*.

(a), (b) et (c) sont respectivement l'infection chez le moustique entier, l'infection oocystique et sporozoïtique.

Tableau XVII : Composition génotypique au locus L119F-GSTe2 chez *An.funestus* d'Obout et de Mibellon en fonction de leur statut infecté ou non infecté.

	Statut de l'infection	N	RR	RS	SS	Test de χ^2	Valeur de P
Obout							
Oocyste	Infecté	25	7	10	8	3,58	0,17
	Non infectés	56	19	23	14		
	% infection		29,9%	30,3%	36%		
Sporozoïte	Infecté	12	6	4	2	9,79	0,007*
	Non infectés	151	20	28	17		
	% infection		23,1%	12,5%	10,5%		
Mibellon							
Oocyste	Infectés	11	1	7	4	13,05	0,001*
	Non infectés	14	3	14	24		
	% infection		10%	38,1%	18,75%		
Sporozoïte	Infectés	3	0	0	3	NA	NA
	Non infectés	49	4	21	25		

À Mibellon, sur les 60 moustiques disséqués et examinés, 12 (20%) ont été infectés par des oocystes dont 1 (8,3%) homozygote résistant, 7 (58,3%) hétérozygotes et 4 (33,3%) homozygote susceptible. Une différence significative a été observée dans la distribution des génotypes au locus L119F-GSTe2 entre les moustiques infectés et non infectés ($\chi^2 = 13,05$; $P = 0,001$) avec les moustiques hétérozygotes plus infectés (**Tableau XVII**). L'évaluation des RC n'a montré aucune différence entre les deux groupes (**Tableau XVIII**). Seulement 3 (5%) des moustiques ont été positifs à l'infection par les sporozoïtes et tous de génotype homozygotes sensibles (**Tableau XVIII**). Aucune comparaison n'a pu être faite compte tenu de la présence d'un seul génotype.

Tableau XVIII : Niveau d'association de différents génotypes au locus L119F-GSTe2 et le statut d'infection à *Plasmodium* spp.

Génotypes au locus L119F-GSTe2	Moustiques entiers		Abdomen		Tête et thorax	
	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P	RC	Valeur de P
Obout						
RR vs RS	1,11 (0,59– 2,07)	0,43	0,7 (0,41– 1,52)	0,30	2,10 (1,11 – 3,97)	0,01
RR vs SS	1,06 (0,48-2,36)	0,52	0,64 (0,18 – 2,19)	0,34	2,46 (1,15– 5,26)	0,01
RS vs SS	0,96 (0,45 – 2,03)	0,53	0,62 (0,31 – 1,25)	0,12	1,17 (0,54 – 2,51)	0,41
Mibellon						
RR vs RS	0,77 (0,22– 2,74)	0,47	0,67 (0,22 – 2,01)	0,33	NA	-
RR vs SS	0,86 (0,25 – 3,01)	0,54	1,92 (0,66 – 5,95)	0,17	NA	-
RS vs SS	1,11 (0,63 – 1,92)	0,41	2,96 (1,62 – 3,58)	0,0002	NA	-

III.1.3.4. Niveau d'association entre la mutation A296S au locus RDL et l'infection à *Plasmodium*

Compte tenu du fait que la mutation A296S–RDL a été détectée dans les différents sites d'études, nous avons à titre comparatif avec la résistance métabolique, évalué l'impact de cette mutation (résistance du site cible) sur l'infection d'*An. funestus* par *Plasmodium* spp. Après génotypage du locus A296–RDL, les moustiques de génotype homozygote sensible (A/A296) ont eu une proportion plus élevée chez les moustiques infectés (90%) comparés au groupe de moustiques non infectés (79%). L'évaluation des RC a montré que les moustiques sensibles A/A296 sont plus sus-

ceptibles à l'infection par *Plasmodium* que les moustiques d'autres génotypes (RC = 4 ; IC 95%: 1,24–12,86 ; $P = 0,03$) (Figure 41, Tableau XIX).

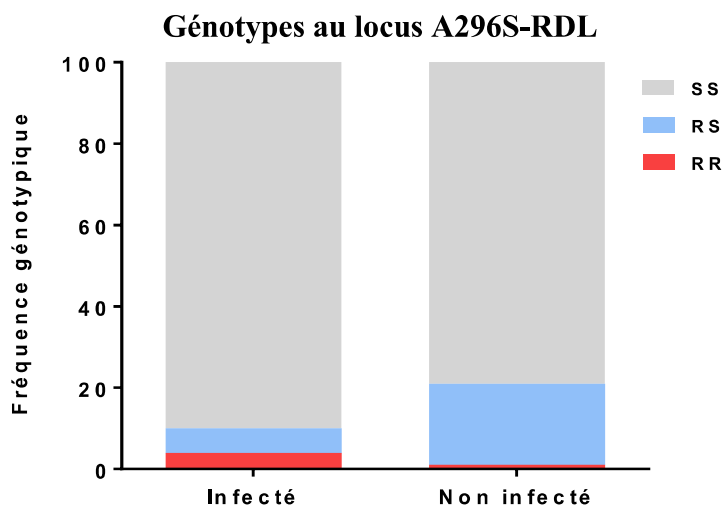


Figure 41 : Influence de la mutation A296S-RDL sur l'infection par *Plasmodium* spp chez les femelles d'*An. funestus* d'Obout.

Tableau XIX : Niveau d'association entre les génotypes au locus A296S-RDL et le statut d'infection à *Plasmodium* spp chez *An. funestus* s.s de Mibellon.

Combinaison de génotypes au locus RDL	Niveau d'association	
	Rapport de côte	Valeur de P
RR vs RS	0,10 (0,10 – 1,19)	0,08
RR vs SS	0,38 (0,04 – 3,77)	0,37
RS vs SS	4 (1,24 – 12,86)	0,03*

RR, homozygotes résistants ; RS, hétérozygotes ; SS, homozygotes sensibles ; l'intervalle de confiance 95% pour les rapports de côte est donné entre parenthèse ; *, différence significative.

III.1.3.5. Influence des deux mutations L119F-GSTe2 et A296S-RDL combinées sur l'infection à *Plasmodium* spp

Au total, 46 individus de chaque groupe (moustiques infectés et non infectés) ont été utilisés pour évaluer l'impact combiné des deux mécanismes de résistance sur l'infection à *Plasmodium* spp chez *An. funestus* (**Figure 42**). Les combinaisons fréquentes pour les deux groupes ont été (SS/SS), (RR/SS), (RS/SS) pour GSTe2/RDL. Les combinaisons SS/RR et RR/RR n'ont été présentes que chez les moustiques infectés, tandis que les combinaisons RR/RS et RS / RS n'ont été observées que chez les moustiques non infectés. Aucune différence significative n'a été observée dans la distribution de ces combinaisons entre les deux groupes ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,161$). Cependant une différence significative a été observée en évaluant les rapports de côtes au stade sporozoïte entre RR/RR et SS/RR (OR = INF ; $P < 0,0001$), entre RS/RR et SS/RR (RC = INF ; $P = 0,003$), indiquant que les moustiques doubles homozygotes (RR/RR) sont plus susceptibles à l'infection. Aucune différence significative n'a été observée au stade d'oocyste $P \geq 0,16$ confirmant le rôle de l'allèle 119F-GSTe2 dans la capacité des moustiques à développer le parasite jusqu'au stade infectieux.

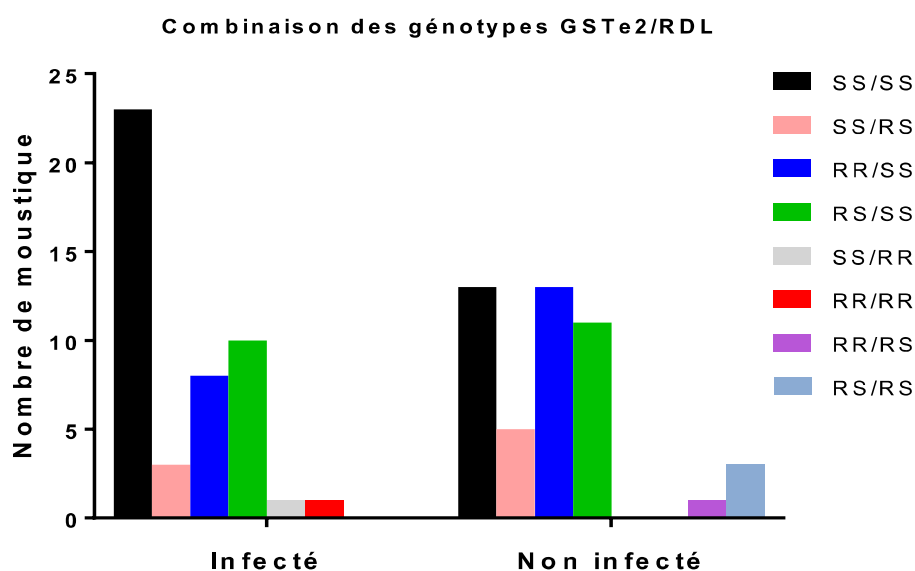


Figure 42 : Distribution des génotypes combinés (GSTe2/Rdl) en fonction du statut d'infection

III.1.3.6. Niveau d'association entre le polymorphisme du gène *GSTe2* et l'infection à *Plasmodium* spp

➤ Diversité génétique du gène *GSTe2*

Le fragment total du gène *GSTe2* (881 pb) a été séquencé avec succès chez 26 moustiques entiers collectés à Mibellon dont 11 infectés et 15 non infectés (**Figure 41a**). Les paramètres de diversité génétique sont donnés dans le **tableau XX**, en fonction du statut d'infection et des génotypes.

Tableau XX : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène *GSTe2* en fonction du statut d'infection et du profil de résistance métabolique aux insecticides

Echantillons	N	S	h (Hd)	Syn	NSyn	π (k)	D	F*
<i>P. falciparum</i>								
Infecté	22	20	16 (0,97)	4	7	0,006 (4,90)	- 0,39 ^{ns}	0,26 ^{ns}
Non-infecté	30	17	17 (0,94)	4	5	0,005 (3,64)	- 0,52 ^{ns}	- 0,35 ^{ns}
<i>GSTe2</i>								
Resistant (RR)	14	11	8 (0,87)	3	3	0,004 (3,03)	- 0,49 ^{ns}	- 0,56 ^{ns}
Heterozygote (RS)	12	13	7 (0,89)	3	5	0,004 (3,30)	- 0,99 ^{ns}	- 1,17 ^{ns}
Susceptible (SS)	26	19	19 (0,97)	5	3	0,005 (3,98)	- 0,71 ^{ns}	- 0,71 ^{ns}
<i>GSTe2</i> × <i>P. Falciparum</i>								
RR × <i>P. falcip</i> +	2	7	2 (1)	2	2	0,009 (7)	//	//
RR × <i>P. falcip</i> -	12	9	6 (0,82)	2	2	0,003 (2,44)	- 0,74 ^{ns}	- 1,22 ^{ns}
RS × <i>P. falcip</i> +	8	13	7 (0,96)	3	5	0,005 (4,21)	- 0,81 ^{ns}	- 0,96 ^{ns}
RS × <i>P. falcip</i> -	4	3	3 (0,83)	1	2	0,002 (1,67)	0,17 ^{ns}	0,15 ^{ns}
SS × <i>P. falcip</i> +	12	15	9 (0,96)	4	3	0,006 (4,73)	- 0,21 ^{ns}	0,27 ^{ns}
SS × <i>P. falcip</i> -	14	14	11 (0,96)	3	3	0,004 (3,37)	- 0,95 ^{ns}	- 1,41 ^{ns}
Total	52	23	28 (0,96)	5	7	0,005 (4,19)	- 0,57^{ns}	0,07^{ns}

N : nombre de séquences analysées (2n) ; S : nombre de sites polymorphes ; h : nombre d'haplotypes (dh : diversité haplotypique) ; Syn : nombres de mutations non- fonctionnelles ; Nsyn : nombre de mutations fonctionnelles ; π : diversité nucléotidique (k : nombre moyen de différences nucléotidiques entre séquences) ; D : index de Tajima ; F* : index de Fu & Li. ; ns : non significatif.

Au total, 23 sites polymorphes définissant 28 haplotypes ont été détectés, correspondant à une diversité haplotypique de 0,96. Les moustiques hétérozygotes et non infectés ont présenté un nombre inférieur de sites polymorphes (3) avec seulement 3 haplotypes (hd : 0,83).

La diversité nucléotidique globale était de 0,005 avec un nombre moyen de différences entre les nucléotides estimé à 4,19 montrant qu'il existe très peu de différence entre les séquences examinées. De plus, des valeurs négatives ont été obtenues pour les tests de Fu et Li Tajima F^* dans de nombreux cas.

➤ **Distribution des haplotypes et phylogénie**

L'analyse du réseau d'haplotype permet d'établir la relation entre différents haplotypes sur la base des différences d'étapes mutationnelles. Ici, l'analyse du réseau haplotypique du gène *GSTe2* en fonction des génotypes à la mutation L119F et du statut d'infection a révélé cinq haplotypes majeurs (H1, H2, H3, H4 et H5) responsables de la différenciation génétique dans cette population de terrain d'*An. funestus*. L'haplotype ancestral (H1) ainsi que les haplotypes (H2, H3 et H4) ont été identifiés uniquement chez les moustiques porteurs de l'allèle résistant 119F (**Figure 43a et 44a**). Cependant, les haplotypes H1 et H2 n'ont été trouvés que chez les moustiques non infectés, tandis que les haplotypes H3 et H4 étaient présents chez les moustiques infectés et non infectés (**Figure 43a**). De plus, l'haplotype H5 s'est avéré spécifique aux moustiques porteurs de l'allèle sensible L119, tant pour les individus infectés que pour ceux non infectés (**Figure 43a et 44a**). De même, l'analyse phylogénétique entre les haplotypes identifiés n'a révélé aucun groupe d'haplotypes associé à un statut d'infection particulier. Et aussi, il n'y avait pas un regroupement spécifique en fonction des allèles de la mutation L119F du gène *GSTe2* (**Figure 44a**). Tous ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'association entre le polymorphisme du gène *GSTe2* et l'infection par le parasite *Plasmodium*.

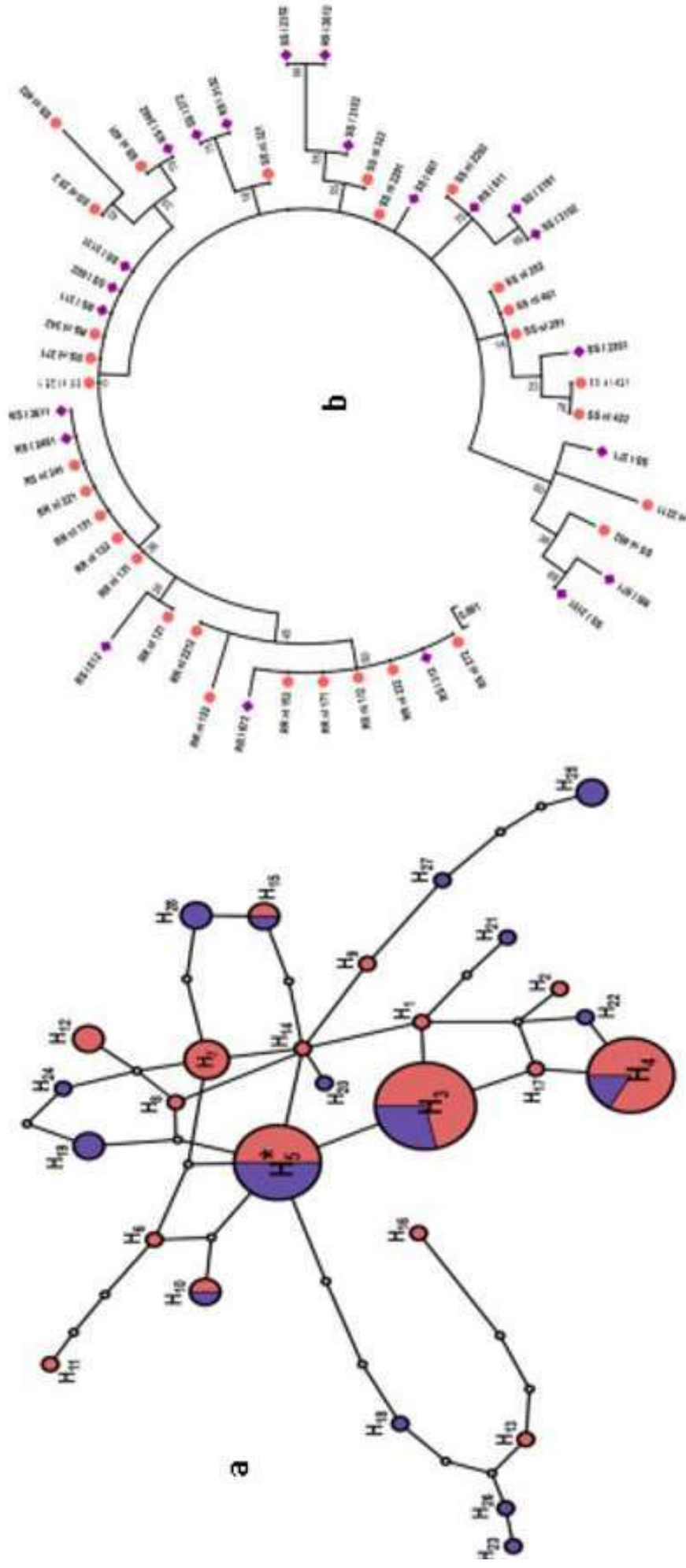


Figure 43 : Réseau d'haplotypes et arbre phylogénétique du gène *GStE2* chez *Anopheles funestus* s.s. de Mibellon en relation avec l'infection à *Plasmodium* spp.

Réseau d'haplotypes (a) et arbre phylogénétique avec la méthode de vraisemblance (b) entre moustiques infectés (bleu) et non infectés (violet).

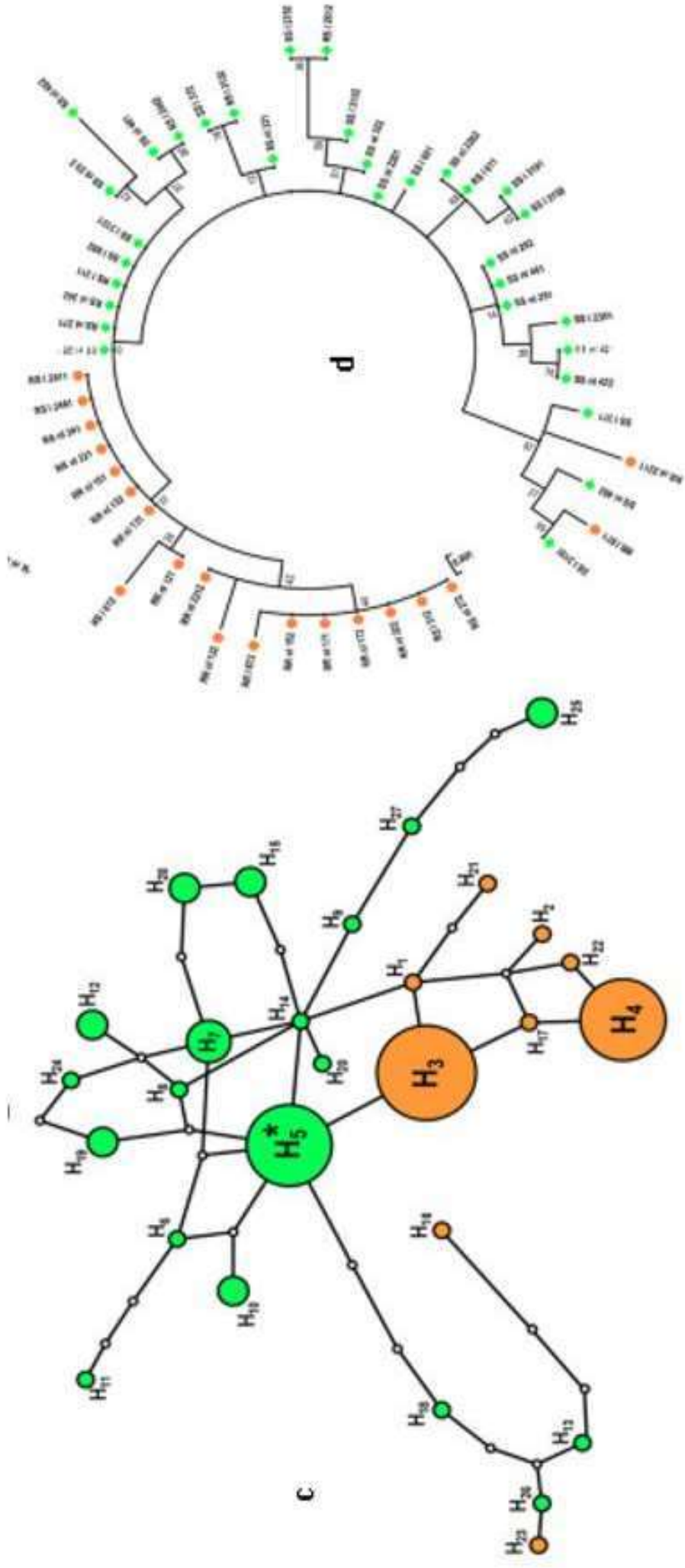


Figure 44 : Réseau d'haplotypes et arbre phylogénétique du gène *GSTe2* chez *Anopheles funestus* s.s. de Mibellon en fonction des allèles et du statut infecté ou non infecté par *Plasmodium spp*

(c) réseau d'haplotypes et (d) arbre phylogénétique (méthode du maximum de vraisemblance) entre moustiques ayant l'allèle résistant (orange) et ceux ayant l'allèle sensible (vert)

III.2. DISCUSSION

Les stratégies de gestion de la résistance aux insecticides telles que la rotation d'insecticides, reposent sur l'hypothèse que cette résistance serait associée à un coût biologique pouvant retarder la propagation des gènes de résistance au sein des populations de vecteurs (en absence de pression de sélection). Cependant, l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie ainsi que la capacité des moustiques résistants à transmettre le paludisme reste peu connu en raison de l'absence de marqueurs moléculaires pour ce type de résistance par le passé. Dans cette étude, après avoir établi le profil de la résistance, élucidé les bases moléculaires de celle-ci et le niveau d'infection par *Plasmodium* spp chez *An. funestus* dans les différents sites d'étude, nous avons évalué l'impact de deux marqueurs de résistance métabolique nouvellement détectés (la mutation L119F sur le gène *GSTe2* associée à la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes et la double insertion AA sur le gène *CYP6P9a* associée à la résistance aux pyréthriinoïdes) sur les traits de vie d'*An. funestus*. Nous nous sommes principalement intéressés à la fécondité, au temps de développement des larves, à la longévité des femelles, à la compétitivité d'accouplement des mâles ainsi qu'à la capacité vectorielle pour révéler en général que la résistance métabolique impose un coût biologique qui, toutefois se manifeste différemment selon le mécanisme impliqué.

III.2.1. Résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme dans les sites étudiés

Dans le cadre de la mise en œuvre des stratégies de lutte contre les vecteurs au Cameroun, la résistance aux insecticides est un aspect important et très développé (Etang *et al.*, 2007, Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015, Menze *et al.*, 2016) car elle menace les récents succès enregistrés en matière de prévention du paludisme. Notre étude a révélé un niveau élevé de résistance d'*An. funestus* s.s à plusieurs classes d'insecticides dans toutes les trois localités.

Cette forte résistance couplée aux taux élevés d'infection à *Plasmodium*, est préoccupante pour le programme de lutte contre le paludisme au Cameroun. En effet, *An. funestus s.s.* a été constamment résistant aux pyréthri-noïdes, la principale classe d'insecticides recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO, 2012). Ce profil de résistance est similaire aux observations faites dans d'autres localités au Cameroun (Tene Fossog *et al.*, 2013, Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017, Menze *et al.*, 2016, 2018) et d'autres pays d'Afrique centrale tels qu'en République Démocratique du Congo (Riveron *et al.*, 2018). Des résultats similaires ont également été signalés au Kenya, à Madagascar, en Tanzanie et en Ouganda (Christine *et al.*, 2015, Rakotoson *et al.*, 2017, Kisinza *et al.*, 2017, Okia *et al.*, 2018) où cette espèce est très résistante à ces insecticides. Par ailleurs, ce vecteur du paludisme a montré une résistance modérée aux carbamates (le bendiocarbe et le propoxur) similaire à celle rapportée au Nord Cameroun (Menze *et al.*, 2016). En effet, face à la résistance accrue aux pyréthri-noïdes à travers le continent, plusieurs pays utilisent en alternative les carbamates en PID. La résistance à cette classe d'insecticide montre que les carbamates ne peuvent pas permettre à lutter efficacement contre le paludisme au Cameroun. De même, les moustiquaires Olyset et Permanet 2.0, couramment utilisées par le PNLP pour la prévention du paludisme au Cameroun ont présenté une très faible efficacité sur ces moustiques sauvages utilisés dans notre étude à l'issue des tests en cônes. Cette faible efficacité de ces deux types de moustiquaires, traitées à la perméthrine et à la deltaméthrine uniquement est constamment observée au sein des populations d'*An. funestus* à travers le continent (Riveron *et al.*, 2015 ; Riveron *et al.*, 2016 ; Riveron *et al.*, 2018). La perte d'efficacité de ces moustiquaires ne contenant que des pyréthri-noïdes était en relation avec le niveau de résistance élevé observé après exposition à la perméthrine et à la deltaméthrine. Cependant, les moustiquaires à base de PBO (Olyset Plus et PermaNet 3.0) ont montré une très grande efficacité contre ces moustiques résistants indiquant que ces moustiquaires seraient une solution alternative pour contrôler cette espèce d'anophèle

pour laquelle la résistance est principalement métabolique. Ceci a été confirmé par les tests avec le synergiste PBO (inhibiteur de Cytochromes P450) qui a permis de restaurer la sensibilité de ce vecteur aux pyréthriinoïdes. Toutefois, la propagation ou l'augmentation de la fréquence de la résistance médiée par le *GSTe2* pourrait limiter l'efficacité de telles moustiquaires à base de PBO dans l'avenir car la restauration de la sensibilité du vecteur avec le synergiste DEM (inhibiteur des GSTs) n'a été que partielle. L'impact de la résistance induite par les GSTs sur l'efficacité des moustiquaires à base de PBO devrait donc être évalué en particulier dans les zones où ce mécanisme est prédominant comme au Cameroun et au Bénin (Riveron *et al.*, 2014, Menze *et al.*, 2016).

Il avait été prouvé qu'un simple changement d'acide aminé (L119F) au niveau de l'enzyme de détoxification *GSTe2* chez *An. funestus* s.s. confère une résistance croisée au DDT et à la perméthrine en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale (Riveron *et al.*, 2014). Cette mutation a été détectée dans nos trois localités avec une fréquence de l'allèle résistant plus élevée à Obout. L'on pourrait émettre l'hypothèse que cela est lié à une forte pression de sélection due aux PIDs à base de DDT dans le passé (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017) ou à l'utilisation des moustiquaires imprégnées à base de pyréthriinoïdes ou encore à l'utilisation abusive et non contrôlée des insecticides domestiques par les habitants (Vulule *et al.*, 1994, Myamba *et al.*, 2002, Stump *et al.*, 2004, Darriet, 2007, Trape *et al.*, 2011) ; il en découle la nécessité d'alterner les classes d'insecticides en lutte antivectorielle. La présence de ce marqueur de résistance (L119F) à haute fréquence à Obout corrobore les observations antérieures faites au Nord Cameroun (Gounougou) et au Benin (Menze *et al.*, 2016, Djouaka *et al.*, 2016) que cette mutation est fortement associée à la résistance croisée au DDT et à la perméthrine. À Mibellon et Tibati, l'allèle résistant de la mutation L119F-GSTe2 a été détecté à une fréquence plus faible (26,3%). Deux hypothèses peuvent expliquer cela : soit la mutation a été

récemment introduite dans cette population (importation), soit une nouvelle source de sélection moins forte jusqu'alors en est responsable.

La mutation A296S-RDL associée à la résistance à la dieldrine quant à elle a été détectée à une fréquence très élevée proche de la fixation à Obout. En revanche, cette mutation n'a été détectée qu'à très basse fréquence chez les moustiques collectés à Mibellon et Tibati. La haute fréquence de l'allèle résistant 296S au sein des populations d'*An. funestus* d'Obout est très préoccupante car les cyclodiènes (famille d'insecticides à laquelle appartient la dieldrine) ne sont plus utilisés dans la lutte antivectorielle au Cameroun depuis plusieurs décennies. Il avait été démontré que la résistance à la dieldrine était associée à un coût biologique très important chez les vecteurs du paludisme, notamment en ce qui concerne leur comportement et leur compétitivité d'accouplement (Rowland, 1991, Rowland, 1991) ce qui devrait entraîner une diminution de la fréquence de l'allèle résistant dans la population en absence de pression de sélection. Par conséquent, une restauration de la sensibilité est attendue en l'absence de pression de sélection de la dieldrine. La persistance de ce marqueur de résistance à la dieldrine au sein de la population d'*An. funestus* d'Obout pourrait être associée à l'utilisation de pesticides en agriculture, tels que le fipronil ou le lindane qui agissent sur le même récepteur GABA comme la dieldrine (Tantely *et al.*, 2010). Une autre raison pouvant expliquer cette persistance de l'allèle résistant serait que cet allèle aurait été fixé au sein de cette population avant que la dieldrine ne soit retirée du programme de lutte antivectorielle, limitant ainsi la possibilité de restauration de la sensibilité à la dieldrine. Cette dernière hypothèse peut se justifier par le fait qu'une population d'*An. gambiae* totalement résistante à la dieldrine (100% RR) avait été récolté en 1961 à Mbalmayo, une localité très proche d'Obout (Gariou et Mouchet, 1961). Ceci pourrait être également le cas pour la population d'*An. funestus* d'Obout.

III.2.2. Impact de la résistance sur les traits de vie d'*Anopheles funestus*

III.2.2.1. Impact sur la longévité

La longévité de l'anophèle femelle est un trait capital pour lequel une modification pourrait avoir un impact sur le risque de transmission du paludisme ; en effet, les vecteurs doivent vivre suffisamment longtemps pour assurer le développement complet du parasite jusqu'au stade infectieux (McCarroll et Hemingway, 2002). De façon générale, en ce qui concerne l'impact de la résistance sur la longévité des femelles, une réduction de la longévité est le plus souvent observée chez les moustiques résistants. C'est par exemple le cas du gène *kdr* chez *Aedes aegypti* qui a été associé à une longévité réduite des moustiques résistants (Martins *et al.*, 2012). Un résultat similaire avait été également obtenu pour le marqueur de résistance à la dieldrine chez les vecteurs du paludisme *An. gambiae* et *An. stephensi* (Rowland, 1991).

Dans notre étude, nous avons observé pour la mutation L119F-GSTe2 que les femelles portant l'allèle résistant 119F vivent plus longtemps que celles ayant l'allèle sensible. Une telle longévité augmenterait probablement la capacité vectorielle des moustiques résistants compte tenu de la période d'incubation extrinsèque du *Plasmodium*. Ces femelles résistantes auraient donc plus de chance de garder le parasite jusqu'au stade de sporozoïte et aurait suffisamment le temps d'assurer sa transmission au cours des repas de sang ultérieurs. Pour le gène *CYP6P9a* par contre, aucune association n'a été observée entre l'allèle résistant CYP6P9a-R et la longévité de femelles hybrides de laboratoire. Bien que ceci nécessite d'être évalué sur le terrain, cette observation suggère que ce gène n'a probablement pas d'impact sur la transmission de la maladie car les moustiques des trois génotypes n'ont montré aucune différence dans leur durée de vie. Rivero *et al.* (2010) avaient rapporté que les monooxygénases à cytochrome P450 et les GSTs sont les deux mécanismes de résistance aux insecticides qui agissent sur le stress oxydatif (contribuent à l'élimination des déchets de l'organisme de

l'insecte) chez les insectes mais de manière radicalement opposée (Rivero *et al.*, 2010). Ils avaient mentionné que les GSTs protègent les moustiques contre le stress oxydatif et entraînent par conséquent une augmentation de la longévité tandis que l'activité accrue des monoxygénases est associée à une augmentation du stress oxydatif chez les moustiques comme observé par antérieurement (de Montellano et DeVoss, 2005). L'augmentation du stress oxydatif due à la surproduction de monoxygénases réduirait donc la longévité des insectes.

La grande longévité des moustiques porteurs de l'allèle résistant 119F pourrait être associée à l'implication du *GSTe2* dans le stress oxydatif puisqu'il a été observé que la résistance causée par le *GST* protégeait les tissus contre les dommages oxydatifs et augmentait la longévité des mouches de fruits (McElwee *et al.*, 2007). Une autre étude sur l'expression de la GST chez la mouche de Hesse avait révélé que certaines GSTs pourraient conférer une protection contre les radicaux libres générés de manière endogène au cours du développement (Mittapalli *et al.*, 2007) et augmentent donc la longévité de l'insecte . L'augmentation de la longévité des moustiques résistants comme dans le cas du *GSTe2* pourrait entraîner celle de la transmission du paludisme dans les zones où ce gène est surexprimé. Ces résultats pourraient expliquer les observations récentes montrant une infection à *Plasmodium* élevée dans les populations d'*An. funestus* à fréquence élevée de l'allèle 119F-GSTe2, comme au Bénin (Djouaka *et al.*, 2016), Cameroun (Menze *et al.*, 2018, Ndo *et al.*, 2018) et au Congo (Riveron *et al.*, 2018). La longévité accrue des moustiques résistants montre que la résistance aux insecticides pourrait avoir un impact négatif sur l'efficacité des outils de lutte antivectorielle et augmenter la transmission du paludisme comme cela a été récemment démontré avec les moustiquaires en Tanzanie (Protopopoff *et al.*, 2018). En effet, les GSTs en supprimant le stress oxydatif favorisent aussi le développement du *Plasmodium* car les radicaux libres nuisent au *Plasmodium* (Ranson et Hemingway, 2005, Rivero *et al.*, 2010, Tarimo *et al.*, 2018)

Dans le cas du gène *CYP6P9a* où aucune association n'a été observée entre ce marqueur et la longévité des femelles résistantes, ceci suggère que ce gène n'augmente probablement pas le stress oxydatif chez les insectes comme d'autres monooxygénases. D'autre part, le fait que les souches utilisées dans cette étude aient été maintenues pendant plusieurs années en laboratoire pourrait potentiellement éliminer le coût biologique dû au *CYP6P9a*, mais cette dernière hypothèse nécessite d'être validée avec les moustiques de terrain.

III.2.2.2. Impact de la résistance sur le temps de développement des stades immatures d'*Anopheles funestus*

Le temps de développement des larves est un autre aspect clé du coût biologique chez les moustiques (Charlesworth, 1994). Cet aspect est très important car, en présence de prédateurs ou de parasites naturels, tout retard de développement peut potentiellement réduire le taux de survie des larves (Agnew et Koella, 1999). Dans cette étude, il a été observé pour la mutation L119F-GSTe2 que les individus hétérozygotes se développaient significativement plus vite que les moustiques homozygotes (résistants et sensibles). Un tel avantage de l'hétérozygote avait également été observé pour la résistance du site cible *kdr* mais en ce qui concerne la compétitivité d'accouplement chez *A. gambiae* au Burkina-Faso (Platt *et al.*, 2015). Les moustiques homozygotes sensibles se sont développés également plus vite que les individus homozygotes résistants indiquant un coût biologique de la mutation L119F-GSTe2 sur le temps de développement larvaire. Les mêmes observations ont été faites pour le *CYP6P9a* où nous avons observé une plus grande mortalité/développement plus long des moustiques résistants pendant le stade larvaire comparé à leurs homologues sensibles indiquant également un coût biologique de ce marqueur sur le développement larvaire.

Cette étude est la première à mettre en évidence un tel coût de la résistance métabolique chez les moustiques. Divers facteurs environnementaux peuvent influencer sur le temps de développement et sur la survie des larves et des nymphes (Rodcharoen et Mulla, 1997). Parmi

ceux-ci, la température, la nutrition et la densité larvaire (Reisen *et al.*, 1984; Clements, 1992) sont les principaux facteurs. Dans notre étude, la température était contrôlée (25 ± 2 ° C) ainsi que la nutrition et la densité larvaire. En outre, les moustiques des trois génotypes ont été maintenus ensemble dans les mêmes bacs d'élevage limitant ainsi tous les biais liés aux conditions environnementales. Une mortalité plus importante associée à un développement plus lent des moustiques résistants pour ces deux marqueurs de la résistance pourrait être liée au fait que, bien que les moustiques des trois génotypes aient été élevés dans les mêmes bols, que les larves portant l'allèle résistant, soient moins compétitives pour les ressources alimentaires comparées à celles ayant l'allèle sensible. Et de ce fait, ces larves résistantes prendraient plus de temps à se développer. Comme observé précédemment chez *Culex pipiens* pour la résistance métabolique médiée par les carboxylestérases (Foster *et al.*, 2003), il est probable que la surexpression des enzymes de détoxification (*GSTe2* et *CYP6P9a*) soit liée à une diminution des performances locomotrices, limitant la capacité des moustiques ayant l'allèle résistant à se déplacer aussi vite pour se nourrir. Tout cela pourrait expliquer le temps de développement plus long observé chez les moustiques résistants comparés aux individus sensibles.

Comme observé pour la résistance du site cible (*kdr*) chez le vecteur de la dengue *Aedes aegypti* (Brito *et al.*, 2013), notre étude montre pour la première fois que la résistance métabolique causée par les cytochromes P450 et les glutathion S-transférases induit un coût biologique important chez *An. funestus*. Ce coût biologique élevé des gènes de résistance sur la mortalité larvaire et le temps de développement des stades immatures de moustiques résistants est la preuve qu'une stratégie de gestion de la résistance mise en place avant la fixation de l'allèle dans la population de vecteur pourrait effectivement réduire la résistance métabolique sur le terrain.

III.2.2.3. Impact de la résistance sur la fécondité et la fertilité des femelles d'*Anopheles funestus*

Dans cette étude, pour la résistance métabolique médiée par le GST, les femelles homozygotes résistantes 119F-RR ont montré un taux de fécondité réduit par rapport aux hétérozygotes et homozygotes sensibles. Toutefois, aucune différence n'a été observée en ce qui concerne le nombre de larves obtenu par femelle. En revanche, pour la résistance médiée par le cytochrome P450, le nombre d'œufs obtenu pour les femelles de génotype homozygote CYP6P9a-RR résistant était statistiquement le même que pour les femelles d'autres génotypes. Contrairement au locus *GSTe2*, le nombre de larves obtenu était significativement faible pour les femelles de génotype homozygote résistant. Ces observations montrent que la résistance métabolique à GST influencerait différemment la fécondité des moustiques comparée à la résistance médiée par le cytochrome P450.

La réduction de la capacité des moustiques résistants à pondre avait également été observée chez *A. aegypti* pour la résistance du site cible à *kdr* (Martins *et al.*, 2012). Dans le même sens, il a été remarqué que, même si la quantité de sang ingérée par les moustiques ne différait pas entre les femelles résistantes (Rock-*kdr*) et sensibles d'*A. aegypti*, ces femelles résistantes montraient une réduction du taux d'insémination et du nombre d'œufs pondus (Brito *et al.*, 2013).

Plusieurs facteurs pourraient expliquer la faible fécondité des femelles résistantes : soit un faible taux d'insémination, soit un faible volume de sang ingéré par ces moustiques résistants. En effet, Le repas de sang est capital pour la reproduction des moustiques et la quantité de sang ingérée par ces moustiques détermine également le nombre d'œufs pondus (Woke *et al.*, 1956). La faible aptitude des moustiques résistants à pondre telle qu'observée dans cette étude pourrait également être liée au faible taux d'insémination comme observé chez les femelles d'*An. gambiae* et d'*An. stephensi* résistantes à la dieldrine par Rowland,

1991. Dans la nature, les femelles résistantes seraient très désavantagées si elles passaient plus de temps à rechercher des hôtes ou de bons sites de ponte ou si elles réagissaient moins aux prédateurs. De nombreuses autres études décrivent la réduction du nombre d'œufs pondus par des souches de moustiques résistantes aux insecticides à l'issue d'expériences en condition de laboratoire. C'est le cas par exemple de *Spodoptera exigua* résistant au fenvalérate (Brewer et Trumble, 1991), *Cydia pomonella* résistant à la deltaméthrine et au diflubenzuron (Bouvier *et al.*, 2001). Okoye *et al.* (2007) ont rapporté dans une étude sur le coût biologique de la résistance aux insecticides chez FUMOS (souche résistante) en comparaison avec FANG (souche sensible) que la proportion de femelles ayant pondu et la proportion d'œufs viables produits par la souche FUMOS étaient plus élevées que chez la souche sensible. Cependant, dans leur étude l'utilisation de moustiques de deux origines géographiques différentes pourrait être à l'origine de cette différence. Les auteurs n'avaient pas effectué de croisement entre les deux souches avant l'évaluation de sorte que le patrimoine génétique de la souche FUMOS soit mélangé à celui de la souche FANG, comme recommandé (Amin et White, 1984, Argentine *et al.*, 1989). Par conséquent, rien ne garantit que la différence observée soit réellement liée aux allèles de résistance car les deux souches pourraient différer pour de nombreux autres gènes que ceux impliqués dans la résistance, comme souligné par Varzandeh *et al.* (1954). Comme observé pour le développement des larves, le coût biologique de la résistance sur la fécondité des femelles noté dans notre étude pourrait contribuer à améliorer le succès des stratégies de gestion de la résistance, en particulier s'il était mis en œuvre avant que la fréquence des gènes de résistance ne devienne trop élevée ou fixée dans une population de vecteurs.

III.2.2.4. Impact de la résistance métabolique sur le succès d'accouplement d'*An. funestus* sur le terrain

Cette étude a mis en évidence un potentiel impact négatif de la mutation L119F-GSTe2 associée à la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes sur la compétitivité à l'accouplement des mâles résistants d'*An. funestus*. Il s'agit du premier rapport d'un tel impact négatif de la résistance métabolique sur le succès d'accouplement des vecteurs du paludisme sur le terrain. La compétitivité réduite des moustiques résistants observée dans cette étude montre que la mutation L119F du gène *GSTe2* affecte potentiellement certains traits physiologiques du moustique tels que la mobilité, la perception des stimuli de la même façon que la résistance du site cible (Rivero *et al.* , 2010c ; Alout *et al.* , 2016). Il a été observé que les moustiques hétérozygotes étaient plus affectés par cette mutation que les individus homozygotes ce qui indique un effet désavantageux pour les hétérozygotes. Contrairement à la mutation L119F-GSTe2, Platt *et al.* (2015) dans une étude menée dans la Vallée du Kou au Burkina Faso sur les mâles d'*An. coluzzii* avaient observé plutôt un avantage des hétérozygotes pour la résistance du site cible en ce qui concerne le succès d'accouplement. En effet, ils avaient observé que les mâles hétérozygotes pour le gène *kdr* avaient plus de chances de s'accoupler que leurs homologues homozygotes résistants et que les hétérozygotes pour le *RDL* étaient également plus compétitifs que les mâles homozygotes résistants. Il se peut que les individus hétérozygotes ne soient pas affectés de la même manière par la mutation du site cible et la résistance métabolique induite par le *GSTe2*. Pour confirmer la faible compétitivité d'accouplement des moustiques hétérozygotes observés dans notre étude, des travaux supplémentaires sont nécessaires dans d'autres régions compte tenu de la faible taille de notre échantillon. Diverses études menées sur d'autres espèces d'insectes sur l'impact de la résistance sur la compétitivité d'accouplement ont montré que ce trait de vie des moustiques n'est pas affecté de la même manière. Les mâles résistants ont souvent montré soit la même chance d'accouplement [par exemple chez *Metaseiulus occidentalis* : (Roush et Hoy, 1981)], soit une compétitivité plus faible [à l'instar d'*Anopheles gambiae* (Rowland, 1991a)], ou au contraire une plus

grande compétitivité [par exemple chez *Anopheles albimanus* (Gilotra, 1965) ; *Tribolium castaneum* (Arnaud et Haubruge, 1999)] d'accouplement comparé à celle de leurs homologues sensibles. Platt *et al* (2015) avaient montré également que dans certains cas on peut avoir un effet additif des mécanismes de résistance sur l'aptitude des moustiques à compétir pour l'accouplement. Ils avaient en effet noté un désavantage additif chez les mâles homozygotes pour les allèles résistants des gènes *kdr* et *RDL*. En raison de la faible fréquence de l'allèle résistant du gène *RDL* dans notre site d'étude, il n'a pas été possible d'évaluer l'impact cumulatif de la résistance du site cible (*RDL*) et la résistance métabolique (*GSTe2*). Toutefois, il serait judicieux de mener cette évaluation dans l'avenir dans des populations où les deux types de mécanismes coexistent.

Il avait été précédemment rapporté que des mécanismes de résistance métabolique, tels que la surproduction de carboxylestérases observée chez *Culex pipiens*, pourraient conférer un coût biologique important sur les traits de vie du moustique. Chez cette espèce, il a été constaté que les individus résistants présentaient une performance locomotrice réduite par rapport aux individus sensibles probablement due à un épuisement des ressources lié à la surproduction de carboxylestérases (Berticat *et al.*, 2002). Avant cette étude, le seul rapport sur l'impact de la résistance métabolique sur la compétitivité d'accouplement des vecteurs du paludisme était celui de Platt *et al* (2015) chez *An. gambiae* mais basé uniquement sur l'expression génique et non génotypique comme nous l'avons fait ici. La compétitivité à l'accouplement chez cette espèce n'était pas influencée par la résistance métabolique (Platt *et al.*, 2015). Cependant, en raison de l'indisponibilité d'un marqueur de la résistance métabolique, juste une analyse transcriptomique avec la méthode de *Microarray* avait été effectuée ne permettant donc pas de mieux apprécier l'impact de la résistance sur les moustiques individuellement. La performance réduite des moustiques résistants à s'accoupler pourrait contribuer à ralentir la vitesse de propagation de la fréquence d'allèles résistants dans la nature, et empê-

cherait ou retarderait également la fixation des gènes de résistance dans la population. Il est donc nécessaire que de telles études soient étendues à d'autres mécanismes de résistance métabolique et à d'autres endroits avec des échantillons de plus grande taille afin de contribuer à la mise en œuvre de stratégies de gestion efficace de la résistance aux insecticides.

III.2.3. Restauration de la sensibilité aux insecticides en absence de pression de sélection

La restauration de la sensibilité à l'insecticide est attendue au sein des populations de vecteur lorsque les gènes de résistance présentent un coût biologique en absence d'insecticide. Par conséquent, une fois que la pression de sélection due aux insecticides aura cessé, la fréquence de l'allèle résistant, et par conséquent le niveau de résistance aux insecticides, diminuera en raison du coût de la résistance sur les traits de vie du moustique. La connaissance de la vitesse de restauration de la sensibilité pour un insecticide donné tel que les pyréthriinoïdes est donc cruciale avant la mise en œuvre d'une stratégie de gestion de la résistance sur le terrain. Dans notre étude, une diminution significative de la fréquence de l'allèle résistant CYP6P9a-R a été observée après dix générations dans un environnement sans insecticide. Comme observé par Saavedra *et al.* (2012), cette réduction de la fréquence de l'allèle résistant pourrait être attribuée soit à l'accumulation d'effets délétères comme nous l'avons observé pour la fécondité et le développement larvaire, soit aux effets associés à d'autres gènes très proches.

L'accouplement ou la copulation ainsi que l'efficacité d'insémination sont d'autres facteurs clés qui n'ont pas été évalués dans cette étude, ils auraient pu contribuer à la réduction de la fréquence allélique observée car les anophèles femelles ne sont inséminés qu'une seule fois durant toute leur vie. Dans ces derniers cas, les mâles doivent être assez compétitifs pour l'accouplement car le premier à inséminer la femelle augmentera les chances de trans-

mission de ses gènes. Chez *Culex pipiens* par exemple, les mâles d'une souche sensible avaient montré un avantage pour la compétitivité à l'accouplement comparé à celui des mâles résistants aux organophosphates (Berticat *et al.*, 2002). Si une telle compétitivité réduite des mâles pour l'accouplement est observée chez la souche d'*An. funestus* utilisée dans notre étude, elle aurait pu contribuer à la restauration observée. Comme noté dans cette étude pour la souche d'*An. funestus* de laboratoire, si une telle réduction de la fréquence de l'allèle résistant dans un environnement exempt d'insecticide est observée sur le terrain, des stratégies de gestion de la résistance telles que la rotation d'insecticides pourraient aider à restaurer la sensibilité si elles sont mises en œuvre rapidement.

Un bon exemple de restauration de la sensibilité a été révélé chez *An. arabiensis* au Soudan où, après les pulvérisations antipaludiques au début des années 1980, on a constaté une résistance au malathion. Cette observation avait poussé les programmes de contrôle à un changement de traitement du malathion au fénitrothion (organophosphoré) puis la sensibilité au malathion a été rétablie quelques années plus tard (Corbel et N'Guessan, 2013). Toutefois, la vitesse de restauration peut varier et peut même être très lente ou impossible notamment lorsqu'un insecticide donné a été utilisé pendant plusieurs années. Par exemple au Sri Lanka, l'utilisation massive du DDT pour la lutte antipaludique pendant environ 20 ans dans les années 1960 a contribué à sélectionner la résistance chez *An. culicifacies* s.l. et *An. subpictus*. Pour cette raison, le DDT a été remplacé par le malathion au début des années 1970 et la sensibilité au DDT a été lentement restaurée, passant de 80% de résistance dans les années 1970 à environ 50% dans les années 1990. Le même schéma a été observé en Afrique de l'Ouest où, en l'absence de sélection de la dieldrine, une restauration de la sensibilité a été observée au Nord du Nigeria au sein d'une population d'*An. gambiae* six ans après l'arrêt des pulvérisations de la dieldrine (Hamon et Garrett-Jones, 1963). La même restauration a été rapportée chez *Anopheles culicifacies* en Inde en 1963 (Bhatia et Deobhankar, 1963). Cepen-

dant le même gène *Rdl* aurait été maintenu dans les populations de vecteur au Sri Lanka malgré le retrait des cyclodienes des programmes de lutte contre les moustiques depuis plus de 30 ans (Roush et McKenzie, 1987). Tout cela indique que la connaissance de la vitesse de restauration de la sensibilité vis-à-vis d'un insecticide est cruciale pour la mise en œuvre d'une stratégie de gestion de la résistance sur le terrain basée sur la rotation d'insecticides.

III.2.4. Impact de la résistance métabolique sur la compétence et la capacité vectorielle des femelles sauvages d'*Anopheles funestus*

Des taux d'infection à *Plasmodium* (sporozoïtes) très élevés ont été enregistrés chez *An. funestus* s.s dans les différents sites d'étude (14,8% à Obout, 5% à Mibellon et 3% à Tibati) montrant que cette espèce joue un rôle majeur dans la transmission du paludisme dans ces localités. Ces taux d'infection élevés chez *An. funestus* s.s. tel que observés dans ces localités sont similaires à ceux obtenus précédemment chez cette espèce à travers le continent, notamment au Burkina Faso où un pourcentage d'infection de 20% a été obtenu en 2007 (Dabire *et al.*, 2007) et 50% en 1999 (Costantini *et al.*, 1999). Par ailleurs les taux d'infections de 13,6% (Sandeu *et al.*, 2012) et de 18% (Djouaka *et al.*, 2016) ont été rapportés au Bénin contre 12,5% au Ghana (Riveron *et al.*, 2016). Ces taux d'infection relativement élevés bien que les méthodes de détection utilisées soient différentes (PCR, ELISA et Nested-PCR) sont préoccupants pour la lutte antipaludique car ils montrent net que malgré les interventions de lutte en cours, le niveau de transmission du paludisme reste élevé dans plusieurs localités. Dans notre étude, nous avons constaté que *P. falciparum* était le parasite prédominant du paludisme dans les trois localités d'étude. Cette prépondérance de *P. falciparum* a été observée dans plusieurs études (Ngimbi *et al.*, 1982, Molez et Baudon, 1984, Riveron *et al.*, 2017) ; elle confirme que cette espèce est responsable de la majorité des cas de paludisme en Afrique subsaharienne. Ceci peut être dû à la plus grande capacité de *P. falciparum* à développer des stratégies de

défense contre le système immunitaire des vecteurs après une longue période de coévolution avec l'homme (Hume *et al.*, 2007). Cependant, la détection d'autres parasites du paludisme, bien qu'à des fréquences plus basses, indique que les efforts de contrôle et d'élimination ne doivent pas ignorer ces espèces secondaires de *Plasmodium*, en particulier *P. malariae*.

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les génotypes homozygotes résistants, homozygotes sensibles et hétérozygotes pour la résistance métabolique médiée par la mutation L119F-GSTe2 et l'infection à *P. falciparum* lorsque le moustique entier était analysé. Cependant, en comparaison à la résistance du site cible RDL, les moustiques de génotype homozygote sensible A/A296-RDL ont été significativement plus infectés par *Plasmodium* spp que les moustiques d'autres génotypes. Des études antérieures ont démontré que les mécanismes de résistance aux insecticides peuvent modifier la compétence vectorielle du moustique en affectant le développement du parasite ou la susceptibilité de l'hôte à l'infection. Cette observation n'a pas été faite dans notre étude pour la mutation A296S-RDL. Dans une étude évaluant le lien entre la résistance aux insecticides et la compétence des vecteurs, Alout et ses collaborateurs ont démontré que les mutations du site cible (*kdr* et *Ace-1R*) augmentaient la prévalence de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae* résistants aux pyrèthroïdes comparé à leurs homologues sensibles (Alout *et al.*, 2013). Cependant, malgré un taux d'infection plus élevé, il a été constaté que les moustiques résistants pour le gène *kdr* avaient une charge en oocystes plus faible (Alout *et al.*, 2013).

Les taux élevés d'infection par les sporozoïtes notés dans nos sites d'étude et particulièrement à Obout étaient similaires aux observations récentes dans certaines populations d'*An. funestus* où la résistance aux insecticides était causée par le *GSTe2* à l'instar du Bénin (Djouaka *et al.*, 2016) et de la République Démocratique du Congo (Riveron *et al.*, 2018). En revanche, le taux d'infection à Obout où la fréquence de l'allèle 119F est plus élevée était supérieur aux taux d'infection enregistrés dans d'autres populations d'*An. funestus*

résistants aux pyréthrinoïdes d'Afrique australe. C'est l'exemple du Malawi avec un taux d'infection de 4,8% (Riveron *et al.*, 2015) ou de nombreux pays africains pour d'autres vecteurs du paludisme (Djouaka *et al.*, 2011 ; Kabula *et al.*, 2016). Ce taux élevé d'infection à *Plasmodium* dans les populations d'*An. funestus* à haute fréquence du *GSTe2* met en évidence la menace que ce mécanisme de résistance représente dans le contrôle du paludisme. Dans notre étude, une association significative a été trouvée entre le génotype résistant 119F/F-GSTe2 et la présence de sporozoïte de *P. falciparum* chez *An. funestus* à Obout. Le taux d'infection par les sporozoïtes chez les moustiques résistants homozygotes 119F/F était trois fois plus élevé que chez les moustiques homozygotes sensibles. Ceci indique que les parasites se développeraient mieux chez les moustiques résistants que chez leurs homologues sensibles. Cette situation est très préoccupante, car la possession de cet allèle résistant pourrait contribuer à une transmission plus élevée du paludisme. Un résultat similaire avait été trouvé chez *An. gambiae* s.s. pour la mutation du site cible *vgsc* -*L1014S* (Kabula *et al.*, 2016) . Trois principales raisons peuvent expliquer l'association observée dans cette étude entre l'infection à *Plasmodium* (sporozoïte) et la mutation L119F-GSTe2.

Tout d'abord, cela pourrait être dû à l'expression phénotypique de la mutation L119F-GSTe2, de sorte que les moustiques homozygotes résistants 119F/F vivent plus longtemps en raison de leur capacité à résister à l'exposition aux insecticides sur le terrain. Dans ce cas, ils ont plus de chance de permettre au *Plasmodium* de terminer sa période d'incubation extrinsèque comparé aux moustiques homozygotes sensibles. Cette hypothèse peut se justifier par le fait que la glutathion S-transférase est associée à la résistance aux insecticides chez *An. funestus* (Riveron *et al.* , 2014a) et serait également impliquée dans la réduction du stress oxydatif chez les insectes (Parkes *et al.* , 1993, Hayes et McLellan, 1999 , Vontas *et al.*, 2001, Rivero *et al.*, 2010).

La deuxième raison pouvant expliquer un taux d'infection par les sporozoïtes plus élevé chez les moustiques de génotype homozygote résistant 119F/F-GSTe2 c'est l'altération de l'immunité causée par la résistance aux insecticides. En effet, il est possible, comme rapporté précédemment (Rivero *et al.*, 2010), que la surexpression des GSTs chez des moustiques protège ces derniers contre les effets néfastes des radicaux libres. Ces éléments sont connus comme étant les composants clés de la réponse immunitaire des moustiques contre l'infection à *Plasmodium* (Kumar *et al.*, 2003). Il est probable que la surexpression des GSTs affecte le développement du parasite ou la susceptibilité du moustique à l'infection en neutralisant la réponse oxydative des moustiques 119F/F à *Plasmodium* spp et ainsi potentiellement augmenter leur vulnérabilité à l'infection. Par le passé, il avait été prouvé que la résistance causée par les GSTs protégeait les tissus du moustique des dommages oxydatifs en augmentait leur longévité (McElwee *et al.*, 2007b). En effet, le stress oxydatif qui fait partie de la réponse immunitaire du moustique contre le *Plasmodium* peut être neutralisé par une surproduction de GST. Par conséquent, la neutralisation du stress oxydatif pourrait prédisposer les moustiques à une infection parasitaire plus grave.

Malgré le fait que cette deuxième hypothèse nécessite d'être confirmée par des infections expérimentales en laboratoire, il a été rapporté dans une étude que la résistance aux insecticides chez le moustique *Culex quinquefasciatus* par exemple, a un effet négatif sur le nématode parasite *Wuchereria bancrofti* responsable de la filariose lymphatique humaine (McCarroll *et al.* , 2000, McCarroll et Hemingway, 2002b). Felix *et al* (2010) ont également observé une association entre la résistance aux insecticides et l'immunité chez *An. gambiae* où le gène responsable (estérases) de la résistance aux pyréthriinoïdes a été surexprimé au niveau de l'intestin moyen des moustiques infectés par le *Plasmodium* comparé aux non infectés. La même observation a été faite quelques années après par Alout *et al.* (2013) pour la résistance métabolique. Par contre, Vezilier *et al.* (2010) avaient noté que la

résistance du site cible (la mutation *Ace-1*) semble ne pas avoir d'effet sur les taux d'infection ni sur la charge parasitaire chez *Culex pipiens*.

Troisièmement, l'infection à *Plasmodium* spp observée chez les moustiques 119F/F homozygotes résistants pourrait être due à la réduction de la compétence immunitaire par le biais de compromis en ressources entre une surexpression de la GST et la réponse immunitaire du moustique. Il a été démontré que lorsque certaines ressources énergétiques sont réorientées vers la production de grandes quantités d'enzymes de détoxification telles que les GSTs, un compromis basé sur les ressources est généralement impliqué et affecte l'immuno-compétence du vecteur (Després *et al.*, 2014). En conséquence, il est probable que l'épuisement des ressources énergétiques limite la capacité du vecteur à générer une réponse immunitaire suffisante contre le plasmodium, ce qui entraîne une forte susceptibilité du moustique résistant, comme observé dans notre étude. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure la résistance aux insecticides affecte la capacité vectorielle du moustique afin de confirmer l'impact de la résistance sur la transmission du paludisme.

CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

CONCLUSION

Cette étude a révélé une résistance élevée et multiple aux insecticides, associée à une baisse de l'efficacité des MILDA sans PBO chez les moustiques sauvages analysés. Ceci souligne la menace que la résistance aux insecticides représente sur l'efficacité des outils de lutte antivectorielle existants. Nous avons observé que la résistance métabolique médiée par la mutation L119F-GSTe2 et le AA-CYP6P9a présentent des effets négatifs sur certains traits de vie ainsi que la compétitivité d'accouplement d'*An. funestus* confirmant l'hypothèse selon laquelle la résistance aux insecticides serait associée à un coût biologique pouvant retarder la propagation des gènes de résistance. Ces résultats montrent que des stratégies de gestion de la résistance telles que la rotation d'insecticides pourraient aider à contrôler la résistance si elles sont appliquées avant que les gènes de résistance ne se fixent dans la population. Cependant, le fait que les moustiques résistants portant doublement la mutation L119F vivent plus longtemps et montrent une capacité vectorielle plus grande représente une menace sérieuse pour la lutte contre le paludisme, dans la mesure où cela pourrait entraîner une augmentation du niveau de transmission du paludisme dans les zones où ce mécanisme de résistance est prédominant, comme observé dans certains pays, notamment le Cameroun. En outre, la présente étude a révélé que les essais d'*An. funestus* peuvent être facilement détectés et caractérisés sur le terrain montrant que les essais d'accouplement peuvent être ciblés comme mesure alternative de lutte antivectorielle.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons dans les travaux futurs d' :

- étendre cette étude à d'autres localités et à d'autres gènes de résistance métabolique afin d'avoir une vue à grande échelle sur le coût biologique de la résistance métabolique ;

- évaluer l'impact de la résistance métabolique causée par les monooxygénases en général et les cytochromes *CYP6Pa/b* en particulier sur les traits de vie des populations naturelles d'*An. funestus* ;
- étudier la restauration de la sensibilité en absence de pression d'insecticides en utilisant les moustiques sauvages ;
- valider de façon *In-vivo* à l'aide de la méthode de *RNA-interference* et de CRISPR-Cas9 l'impact de la résistance sur les traits de vie des vecteurs du paludisme ;
- effectuer une étude longitudinale afin de déterminer la dynamique des essaims d'accouplement d'*An. funestus* et évaluer les paramètres écologique et physiologique favorisant l'accouplement de cette espèce sur le terrain, en vue de la mise en œuvre de stratégies de lutte ciblant les essaims d'accouplement ;

RECOMMANDATIONS

Nous recommandons aux populations de nos différentes localités d'étude l'usage généralisé et quotidien de moustiquaires qui limitent la transmission du paludisme. Aux chercheurs, nous recommandons la mise sur pied de nouveaux marqueurs de la résistance métabolique qui permettra de détecter assez rapidement cette résistance sur le terrain et d'étudier le coût biologique associé afin de mieux contrôler cette résistance, d'approfondir les recherches sur l'impact de la résistance métabolique sur les traits de vie et la dynamique de transmission du plasmodium chez les vecteurs majeurs. 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, du PBO) et d'envisager les pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides (PID) à effet rémanent ainsi que des pulvérisations spatiales à base des organophosphorés qui est la seule classe d'insecticide pour laquelle une mortalité de 100% a été enregistrée. Aussi une stratégie de gestion de la résistance basée

sur la rotation d'insecticides pourrait contribuer à lutter efficacement contre le paludisme compte tenu du coût de la résistance observé sur certains traits de vie d'*An. funestus*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A-ELGAYOUM, S., EL-FEKIAEL, K., MAHGOUB, B., EL-RAYAH, E.-A. & GIHA, H. 2009. Malaria overdiagnosis and burden of malaria misdiagnosis in the suburbs of central Sudan: special emphasis on artemisinin-based combination therapy era. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 20-6.
- AGNEW, P. & KOELLA, J. 1999. Life history interactions with environmental conditions in a host–parasite relationship and the parasite's mode of transmission.
- AMENYA, D. A., NAGURAN, R., LO, T. C., RANSON, H., SPILLINGS, B. L., WOOD, O. R., BROOKE, B. D., COETZEE, M. & KOEKEMOER, L. L. 2008. Over expression of a cytochrome P450 (CYP6P9) in a major African malaria vector, *Anopheles funestus*, resistant to pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 17, 19-25.
- AMIN, A. & WHITE, G. 1984. Relative fitness of organophosphate-resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bulletin of entomological research*, 74, 591-598.
- ANNAN, Z. 2007. Structure génétique des populations de *Plasmodium falciparum*, agent de forme grave du paludisme, chez l'homme et les anophèles vecteurs en Afrique. Montpellier 2.
- ANOFEL 2014. polycopié national de parasitologie et de mycologie.
- ANTONIO-NKONDJIO, C., FOSSOG, B. T., KOPYA, E., POUMACHU, Y., DJANTIO, B. M., NDO, C., TCHUINKAM, T., AWONO-AMBENE, P. & WONDJI, C. S. 2015. Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malaria journal*, 14, 155.
- ANTONIO-NKONDJIO, C., KERAH, C., SIMARD, F., AWONO-AMBENE, P., CHOUAIBOU, M., TCHUINKAM, T. & FONTENILLE, D. 2006. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology*, 43, 1215-1221.
- ANTONIO-NKONDJIO, C. & SIMARD, F. 2013. Highlights on *Anopheles nili* and *Anopheles moucheti*, Malaria Vectors in Africa. In: MANGUIN S, I. T. (ed.) *Anopheles Mosquitoes: New Insights into Malaria Vectors*.
- ANTONIO-NKONDJIO, C., SONHAFOUO-CHIANA, N., NGADJEU, C. S., DOUMBE-BELISSE, P., TALIPOUO, A., DJAMOUKO-DJONKAM, L., KOPYA, E., BAMOU, R., AWONO-AMBENE, P. & WONDJI, C. S. 2017. Review of the evolution of

- insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors*, 10, 472.
- APPERSON, C. S. & GEORGHIOU, G. P. 1975. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of economic entomology*, 68, 153-157.
- ARGENTINE, J., CLARK, J. M. & FERRO, D. 1989. Relative fitness of insecticide-resistant Colorado potato beetle strains (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental entomology*, 18, 705-710.
- AWOLOLA, T., ODUOLA, O., STRODE, C., KOEKEMOER, L., BROOKE, B. & RANSON, H. 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 1139-1145.
- AYALA, F. J., ESCALANTE, A. A. & RICH, S. M. 1999. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia*, 41, 55-68.
- BASS, C., NIKOU, D., BLAGBOROUGH, M., VONTAS, J., SINDEN, E., WILLIAMSON, S. & FIELD, M. 2008. PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malaria Journal*, 7, 177.
- BASS, C., SCHROEDER, I., TURBERG, A., FIELD, L. M. & WILLIAMSON, M. S. 2004. Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60, 1157-1162.
- BAUDON, D., CARNEVALE, P., AMBROISE-THOMAS, P. & ROUX, J. 1987. La lutte antipaludique en Afrique: de l'éradication du paludisme au contrôle des paludismes. *Revue épidémiologique et santé publique*, 401-415.
- BECKER, N. 1988. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel Journal Entomology*, 32, 63-69.
- BERTICAT, C., BOQUIEN, G., RAYMOND, M. & CHEVILLON, C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res*, 79, 41-7.

- BERTICAT, C., BOQUIEN, G., RAYMOND, M. & CHEVILLON, C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetics Research*, 79, 41-47.
- BHATIA, S. & DEOBHANKAR, R. 1963. Reversion of dieldrin-resistance in the field population of *A. culicifacies* in Maharashtra State (erstwhile Bombay State), India. *Indian journal of malariology*, 17.
- BHATT, S., WEISS, D., CAMERON, E., BISANZIO, D., MAPPIN, B., DALRYMPLE, U., BATTLE, K., MOYES, C., HENRY, A. & ECKHOFF, P. 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526, 207.
- BOMBLIES, A., DUCHEMIN, J. & ELTAHIR, E. 2008. Hydrology of malaria: Model development and application to a Sahelian village. *Water Resources Research*, 44, W12445.
- BONNING, B. C., HEMINGWAY, J., ROMI, R. & MAJORI, G. 1991. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. *Bulletin of Entomological research*, 81, 5-10.
- BOUVIER, J. C., BUES, R., BOIVIN, T., BOUDINHON, L., BESLAY, D. & SAUPHANOR, B. 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity*, 87, 456-62.
- BRAY, R. & GARNHAM, P. 1982. The life-cycle of primate malaria parasites. *British medical bulletin*, 38, 117-122.
- BREWER, M. & TRUMBLE, J. 1991. *Inheritance and Fitness Consequences of Resistance to Fenvalerate in Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae)*.
- BRITO, L. P., LINSS, J. G., LIMA-CAMARA, T. N., BELINATO, T. A., PEIXOTO, A. A., LIMA, J. B., VALLE, D. & MARTINS, A. J. 2013. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One*, 8, e60878.
- BROOKE, B., HUNT, R., MATAMBO, T., KOEKEMOER, L., VAN WYK, P. & COETZEE, M. 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and veterinary entomology*, 20, 294-299.
- BROOKE, B. D., KLOKE, G., HUNT, R. H., KOEKEMOER, L. L., TEMU, E. A., TAYLOR, M. E., SMALL, G., HEMINGWAY, J. & COETZEE, M. 2001. Bioassay

- and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*, 91, 265-72.
- BRYAN, J., DI DECO, M., PETRARCA, V. & COLUZZI, M. 1982. Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s. str. in The Gambia, West Africa. *Genetica*, 59, 167-176.
- BUXTON, P. 1945. The use of the new insecticide DDT in relation to the problems of tropical medicine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 38, 367-400.
- CARLE, P. Mode d'action et utilisation des pyrèthrinoïdes. Insectes-insecticides-santé. Colloque national d'Angers. ACTA, 1985. 225-244.
- CARNEVALE, P. & MOUCHET, J. 1990. Vector control and malaria control. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*, 50, 391-398.
- CARNEVALE, P., ROBERT, V., MANGUIN, S., CORBEL, V., FONTENILLE, D., GARROS, C. & ROGIER, C. 2009. Les anophèles-Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. 2009. *Marseille: IRD Ed.*
- CASIMIRO, S., COLEMAN, M., HEMINGWAY, J. & SHARP, B. 2006. Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *Journal of Medical Entomology*, 43, 276-282.
- CASIMIRO, S. L., HEMINGWAY, J., SHARP, B. L. & COLEMAN, M. 2007. Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. *Malar J*, 6, 142.
- CHAMP, P. 1985. Mode d'action et utilisation des organophosphorés. *Mode d'action et utilisation des insecticides: Insectes, insecticides, santé. Paris, Publication A*, 207-223.
- CHANDRE, F., MANGUIN, S., BRENGUES, C., DOSSOU, J. Y., DARRIET, F., DIABATE, A., CARNEVALE, P. & GUILLET, P. 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*, 41, 319-322.
- CHARLESWORTH, B. 1994. *Evolution in Age-Structured Populations*, Cambridge, Cambridge University Press.
- CHRISTINE, L. W., JERNARD, P. M., EDNA, O., MAXWELL, G., YAW, A. A., HARRYSONE, E. A., GUOFA, Z., ANDREW, G. & EUGENIA, L. 2015. Pyrethroid

- and DDT Resistance and Organophosphate Susceptibility among *Anopheles* spp. Mosquitoes, Western Kenya. *Emerging Infectious Disease journal*, 21, 2178.
- COETZEE, M. & FONTENILLE, D. 2004. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 34, 599-605.
- COETZEE, M., HUNT, R. H., WILKERSON, R., DELLA TORRE, A., COULIBALY, M. B. & BESANSKY, N. J. 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619, 246-274.
- COHUET, A., SIMARD, F., TOTO, J., KENGNE, P., COETZEE, M. & FONTENILLE, D. 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 200–205.
- COLUZZI, M., PETRARCA, V. & DI DECO, M. A. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Italian Journal of Zoology*, 52, 45-63.
- COLUZZI, M., SABATINI, A., PETRARCA, V. & DI DECO, M. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 483-497.
- CORBEL, V. & N'GUESSAN, R. 2013. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors*. InTech.
- COSTANTINI, C., SAGNON, N., ILBOUDO-SANOGO, E., COLUZZI, M. & BOCCOLINI, D. 1999. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*, 41, 595-611.
- CUAMBA, N., MORGAN, J. C., IRVING, H., STEVEN, A. & WONDJI, C. S. 2010. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the Chokwe District in Mozambique. *PloS one*, 5, e11010.
- DABIRE, K. R., BALDET, T., DIABATE, A., DIA, I., COSTANTINI, C., COHUET, A., GUIGUEMDE, T. R. & FONTENILLE, D. 2007. *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol*, 44, 990-7.
- DABIRE, K. R., SAWADOGO, P. S., HIEN, D. F., BIMBILE-SOMDA, N. S., SOMA, D. D., MILLOGO, A., BALDET, T., GOUAGNA, L. C., SIMARD, F., LEFEVRE, T.,

- DIABATE, A., LEES, R. S. & GILLES, J. R. 2014. Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso City, Burkina Faso, West Africa. *Acta Trop*, 132 Suppl, S35-41.
- DAME, D., CURTIS, C., BENEDICT, M., ROBINSON, A. & KNOLS, B. 2009. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal*, 8, S2.
- DANIS, M. & MOUCHET, J. 1991. *Paludisme*.
- DARRIET, F. 2007. Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides, IRD éditions.
- DAVIDSON, G. 1962. *Anopheles gambiae* complex. *Nature*, 196, 907-907.
- DETINOVA, T. S., BERTRAM, D. & ORGANIZATION, W. H. 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria, World Health Organization.
- DIABATE, A., BALDET, T., CHANDRE, F., AKOUBETO, M., GUIGUEMDE, T. R., DARRIET, F., BRENGUES, C., GUILLET, P., HEMINGWAY, J. & SMALL, G. J. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67, 617-622.
- DIABATE, A., DABIRE, R. K., KENGNE, P., BRENGUES, C., BALDET, T., OUARI, A., SIMARD, F. & LEHMANN, T. 2006. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol*, 43, 480-3.
- DJOUAKA, R., AKOTON, R., TCHIGOSSOU, G. M., ATOYEBI, S. M., IRVING, H., KUSIMO, M. O., DJEGBE, I., RIVERON, J. M., TOSSOU, E., YESSOUFOU, A. & WONDJI, C. S. 2016. Mapping the distribution of *Anopheles funestus* across Benin highlights a sharp contrast of susceptibility to insecticides and infection rate to *Plasmodium* between southern and northern populations. *Wellcome Open Res*, 1, 28.
- DJOUAKA, R., RIVERON, J. M., YESSOUFOU, A., TCHIGOSSOU, G., AKOTON, R., IRVING, H., DJEGBE, I., MOUTAIROU, K., ADEOTI, R., TAMO, M., MANYONG, V. & WONDJI, C. S. 2016. Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasit Vectors*, 9, 453.
- DJOUAKA, R. F., BAKARE, A. A., COULIBALY, O. N., AKOGBETO, M. C., RANSON, H., HEMINGWAY, J. & STRODE, C. 2008. Expression of the cytochrome P450s,

- CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* ss. from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics*, 9, 538.
- DONDORP, A. 2008. Clinical significance of sequestration in adults with severe malaria. *Transfusion Clinique et Biologique*, 15, 56-7.
- DU, W., AWOLOLA, T., HOWELL, P., KOEKEMOER, L., BROOKE, B., BENEDICT, M., COETZEE, M. & ZHENG, L. 2005. Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology*, 14, 179-183.
- EDI, A. V. C., N'DRI, B. P., CHOUAIBOU, M., KOUADIO, F. B., PIGNATELLI, P., RASO, G., WEETMAN, D. & BONFOH, B. 2017. First detection of N1575Y mutation in pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Southern Côte d'Ivoire. *Wellcome open research*, 2.
- ENAYATI, A. & HEMINGWAY, J. 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annual review of entomology*, 55, 569-591.
- ENAYATI, A. A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14, 3-8.
- ETANG, J., FONDJO, E., CHANDRE, F., MORLAIS, I., BRENGUES, C., NWANE, P., CHOUAIBOU, M., NDJEMAI, H. & SIMARD, F. 2006. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74, 795-797.
- ETANG, J., MANGA, L., TOTO, J.-C., GUILLET, P., FONDJO, E. & CHANDRE, F. 2007. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *Journal of Vector Ecology*, 32, 123-133.
- FARENHORST, M., MOUATCHO, J., KIKANKIE, C., BROOKE, B., HUNT, R., THOMAS, M., KOEKEMOER, L., KNOLS, B. & COETZEE, M. 2009. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 106, 17443-17447.
- FAVIA, G., LANFRANCOTTI, A., SPANOS, L., SIDÉN-KIAMOS, I. & LOUIS, C. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology*, 10, 19-23.
- FEYEREISEN, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology*, 44, 507-533.

- FFRENCH-CONSTANT, R. H. & ROCHELEAU, T. A. 1993. Drosophilay-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *Journal of neurochemistry*, 60, 2323-2326.
- FONTENILLE, D., COHUET, A., AWONO-AMBENE, P., ANTONIO-NKONDJIO, C., WONDJI, C., KENGNE, P., DIA, I., BOUCCOLINI, D., RAJAONARIVELO, V., DABIRE, R., ADJA-AKRE, M., CEAINU, C., LE GOFF, G. & SIMARD, F. 2003. Systématique et biologie des anophèles vecteur de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Médecine Tropicale*, 63, 247-253.
- FONTENILLE, D., COHUET, A., AWONO-AMBENE, P., KENGNE, P., ANTONIO-NKONDJIO, C., WONDJI, C. & SIMARD, F. 2005. Malaria vectors: from the field to genetics. Research in Africa. *Revue d'épidémiologie et de Sante Publique*, 53, 283-290.
- FONTENILLE, D. & SIMARD, F. 2004. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 357-375.
- FOSTER, S. P., YOUNG, S., WILLIAMSON, M. S., DUCE, I., DENHOLM, I. & DEVINE, G. J. 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity (Edinb)*, 91, 98-106.
- GARIOU, J. & MOUCHET, J. 1961. [Appearance of a dieldrin-resistant strain of *Anopheles gambiae* in the antimalaria campaign zone in southern Cameroon's]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 54, 870-5.
- GARNHAM, P. C. C. 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*.
- GILLES, H. 1993. Diagnostic methods in malaria. *Bruce-Chwatt's Essential Microbiology*.
- GILLIES, M. & COETZEE, M. 1987. A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). . *Publications of the South African Institute for Medical Research*, 55.
- GILLIES, M. & DE MEILLON, B. 1968. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Inst Med Res*, 54: 343.
- GREEN, P. E. & SRINIVASAN, V. 1990. Conjoint analysis in marketing: new developments with implications for research and practice. *Journal of marketing*, 54, 3-19.
- GREENWOOD, B. & TARGETT, G. 2009. Do we still need a malaria vaccine? *Parasite Immunology*, 31, 582-586.

- GUENGERICH, F. P., THIER, R., PERSMARK, M., TAYLOR, J. B., PEMBLE, S. E. & KETTERER, B. 1995. Conjugation of carcinogens by theta class glutathione S-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics*, 5, S103-7.
- HAMON, J. & GARRETT-JONES, C. 1963. Resistance to insecticides in the major malaria vectors and its operational importance. *Bulletin of the World Health Organization*, 28, 1.
- HARBACH, R. 1994. Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera : Culicidae) : the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*, 84, 331-342.
- HARBACH, R. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of entomological research*, 94, 537-553.
- HARBACH, R. 2011. *Genus ANOPHELES Meigen, 1818 Mosquito Taxonomic Inventory*.
- HARBACH, R. E. 1994. Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*, 84, 331-342.
- HARGREAVES, K., KOEKEMOER, L. L., BROOKE, B. D., HUNT, R. H., MTHEMBU, J. & COETZEE, M. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol*, 14, 181-9.
- HAUBRUGE, É. & AMICHOT, M. 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *BASE*.
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N., CARROLL, L. & RANSON, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 653-65.
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N. J., MCCARROLL, L. & RANSON, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34, 653-665.
- HEMINGWAY, J. & RANSON, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 45, 371-391.
- HOSIE, A., SATTELLE, D. & ARONSTEIN, K. 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in neurosciences*, 20, 578-583.

- HUANG, H.-S., HU, N.-T., YAO, Y.-E., WU, C.-Y., CHIANG, S.-W. & SUN, C.-N. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28, 651-658.
- HUME, J. C., TUNNICLIFF, M., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. & DAY, K. P. 2007. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 6, 139.
- HUNT, R. H., EDWARDES, M. & COETZEE, M. 2010. Pyrethroid resistance in southern African *Anopheles funestus* extends to Likoma Island in Lake Malawi. *Parasites & Vectors*, 3, 122.
- IRVING, H. & WONDJI, C. S. 2017. Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genetics*, 18, 76.
- KERAH, H., MALLAYE, P., ANTONIO-NKONDJIO, C., DONAN-GOUNI, I., AWONO-AMBENE, P., SAME- EKOBO, A. & SIMARD, F. 2009. Malaria transmission dynamics in Goulmoun, a rural city in south-western Chad. *BMC Infectious Diseases*, 9, 71.
- KISINZA, W. N., NKYA, T. E., KABULA, B., OVERGAARD, H. J., MASSUE, D. J., MAGENI, Z., GREER, G., KASPAR, N., MOHAMED, M., REITHINGER, R., MOORE, S., LORENZ, L. M. & MAGESA, S. 2017. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from Tanzania: a major concern for malaria vector control. *Malaria Journal*, 16, 439.
- KNIGHT, K. & STONE, A. 1977. *A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae)*, Washington.
- KOEKEMOER, L., KAMAU, L., HUNT, R. & COETZEE, M. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J Trop Med Hyg*, 66, 804-811.
- KOSTAROPOULOS, I., PAPADOPOULOS, A. I., METAXAKIS, A., BOUKOUVALA, E. & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 31, 313-319.
- KWIATKOWSKA, R. M., PLATT, N., POUPARDIN, R., IRVING, H., DABIRE, R. K., MITCHELL, S., JONES, C. M., DIABATÉ, A., RANSON, H. & WONDJI, C. S. 2013. Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance

- phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallée du Kou, Burkina Faso. *Gene*, 519, 98-106.
- LANZARO, G. C., TOURÉ, Y. T., CARNAHAN, J., ZHENG, L., DOLO, G., TRAORÉ, S., PETRARCA, V., VERNICK, K. D. & TAYLOR, C. E. 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 14260-14265.
- LEE, K.-S., COX-SINGH, J., BROOKE, G., MATUSOP, A. & SINGH, B. 2009. Plasmodium knowlesi from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *International journal for parasitology*, 39, 1125-1128.
- LI, A., BARMADA, S. J., ROTH, K. A. & HARRIS, D. A. 2007. N-terminally deleted forms of the prion protein activate both Bax-dependent and Bax-independent neurotoxic pathways. *Journal of Neuroscience*, 27, 852-859.
- LINDBERG, R. L. & NEGISHI, M. 1989. Alteration of mouse cytochrome P450 coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 339, 632.
- LINES, J., MYAMBA, J. & CURTIS, C. 1987. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. *Medical and veterinary entomology*, 1, 37-51.
- LIVAK, K. J. 1984. Organization and mapping of a sequence on the Drosophila melanogaster X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics*, 107, 611-34.
- LOVETT, B., BILGO, E., MILLOGO, S. A., OUATTARRA, A. K., SARE, I., GNAMBANI, E. J., DABIRE, R. K., DIABATE, A. & LEGER, R. J. S. 2019. Transgenic Metarhizium rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. *Science*, 364, 894-897.
- LWETOIJERA, D. W., HARRIS, C., KIWARE, S. S., DONGUS, S., DEVINE, G. J., MCCALL, P. J. & MAJAMBERE, S. 2014. Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malar J*, 13, 331.
- MANGUIN, S., GARROS, C., DUSFOUR, I., HARBACH, R. & COOSEMANS, M. 2008. Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of Anopheles subgenus Cellia in Southeast Asia: an updated review. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 489-503.

- MARTINEZ-TORRES, D., CHANDRE, F., WILLIAMSON, M., DARRIET, F., BERGE, J. B., DEVONSHIRE, A. L., GUILLET, P., PASTEUR, N. & PAURON, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology*, 7, 179-184.
- MARTINS, A. J., RIBEIRO, C. D., BELLINATO, D. F., PEIXOTO, A. A., VALLE, D. & LIMA, J. B. 2012. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One*, 7, e31889.
- MATHENGE, E. M., GIMNIG, J. E., KOLCZAK, M., OMBOK, M., IRUNGU, L. W. & HAWLEY, W. A. 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *Journal of medical entomology*, 38, 531-536.
- MAYR, E. 1942. *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*, Harvard University Press.
- MCCARROLL, L. & HEMINGWAY, J. 2002. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1345-51.
- MCELWEE, J. J., SCHUSTER, E., BLANC, E., PIPER, M. D., THOMAS, J. H., PATEL, D. S., SELMAN, C., WITHERS, D. J., THORNTON, J. M., PARTRIDGE, L. & GEMS, D. 2007. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol*, 8, R132.
- MENZE, B. D., RIVERON, J. M., IBRAHIM, S. S., IRVING, H., ANTONIO-NKONDJIO, C., AWONO-AMBENE, P. H. & WONDJI, C. S. 2016. Multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon is mediated by metabolic resistance alongside potential target site insensitivity mutations. *PLoS One*, 11, e0163261.
- MENZE, B. D., WONDJI, M. J., TCHAPGA, W., TCHOUPPO, M., RIVERON, J. M. & WONDJI, C. S. 2018. Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in Central Cameroon. *Malaria Journal*, In Press.
- MITCHELL, S. N., STEVENSON, B. J., MÜLLER, P., WILDING, C. S., EGYIR-YAWSON, A., FIELD, S. G., HEMINGWAY, J., PAINE, M. J., RANSON, H. & DONNELLY, M. J. 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6147-6152.

- MITTAPALLI, O., NEAL, J. J. & SHUKLE, R. H. 2007. Antioxidant defense response in a galling insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1889-1894.
- MOLEZ, J.-F. & BAUDON, D. 1984. Distribution géographique des paludismes et leur incidence en Afrique. *Études médicales*, 2, 117-119.
- MOLINEAUX, L., STOREY, J., COHEN, J. E. & THOMAS, A. 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different Plasmodium species, in particular P. falciparum and P. malariae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29, 725-737.
- MOORES, G., BINGHAM, G. & GUNNING, R. 2005. Use of 'temporal synergism to overcome insecticide resistance. *Outlooks on Pest Management*, 16, 7-9.
- MORGAN, J. C., IRVING, H., OKEDI, L. M., STEVEN, A. & WONDJI, C. S. 2010. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One*, 5, e11872.
- MOUCHET, J. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*, John Libbey Eurotext.
- MOUCHET, J., CARNEVALE, P., COOSEMANS, M., JULVEZ, J., MANGUIN, S., RICHARD-LENOBLE, D. & SIRCOULON, J. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*, Paris.
- MULAMBA, C., RIVERON, J. M., IBRAHIM, S. S., IRVING, H., BARNES, K. G., MUKWAYA, L. G., BIRUNGI, J. & WONDJI, C. S. 2014. Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PLoS One*, 9, e110058.
- MYAMBA, J., MAXWELL, C., ASIDI, A. & CURTIS, C. 2002. Pyrethroid resistance in tropical bedbugs, Cimex hemipterus, associated with use of treated bednets. *Medical and veterinary entomology*, 16, 448-451.
- NACIRI, M. 2019. La bactérie Wolbachia bloque l'infection des moustiques par différents pathogènes humains. *médecine/sciences*, 35, 584-585.
- NDO, C., KOPYA, E., DONBOU, M. A., NJIOKOU, F., AWONO-AMBENE, P. & WONDJI, C. 2018. Elevated Plasmodium infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control. *Parasit Vectors*, 11, 157.
- NGIMBI, N., BECKERS, A. & WERY, M. Aperçu de la situation épidémiologique du paludisme à Kinshasa (République du Zaïre) en 1980. *Annales de la Société Belge de Médecine tropicale*, 1982. 121-137.

- OKIA, M., HOEL, D. F., KIRUNDA, J., RWAKIMARI, J. B., MPEKA, B., AMBAYO, D., PRICE, A., OGUTTU, D. W., OKUI, A. P. & GOVERE, J. 2018. Insecticide resistance status of the malaria mosquitoes: *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in eastern and northern Uganda. *Malar J*, 17, 157.
- OKOYE, P. N., BROOKE, B. D., HUNT, R. H. & COETZEE, M. 2007. Relative developmental and reproductive fitness associated with pyrethroid resistance in the major southern African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Bull Entomol Res*, 97, 599-605.
- OKOYE, P. N., BROOKE, B. D., KOEKEMOER, L. L., HUNT, R. H. & COETZEE, M. 2008. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102, 591-8.
- OMS 2018. Malaria report 2018.
- PARAJULI, K., HANCHANA, S., INWONG, M., PUKRITTAYAKAYAMEE, S. & CHIMIRE, P. 2009. Comparative evaluation of microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspected malaria patients of Nepal. *Nepal Medical College Journal*, 11, 23-7.
- PINTO, J., LYND, A., ELISSA, N., DONNELLY, M., COSTA, C., GENTILE, G., CACCONE, A. & ROSÁRIO, V. D. 2006. Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 27-32.
- PITMAN, R. M. 1971. Transmitter substances in insects: a review. *Comparative and general pharmacology*, 2, 347-371.
- PLATT, N., KWIATKOWSKA, R. M., IRVING, H., DIABATE, A., DABIRE, R. & WONDJI, C. S. 2015. Target-site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity (Edinb)*, 115, 243-52.
- POIRIÉ, M. & PASTEUR, N. 1991. La résistance des insectes aux insecticides. *La Recherche: l'actualité des sciences*, 22, 874-881.
- PROTOPOPOFF, N., MOSHA, J. F., LUKOLE, E., CHARLWOOD, J. D., WRIGHT, A., MWALIMU, C. D., MANJURANO, A., MOSHA, F. W., KISINZA, W., KLEINSCHMIDT, I. & ROWLAND, M. 2018. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant

- mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two factorial design trial. *Lancet*, 391, 1577-1588.
- RAKOTOSON, J. D., FORNADEL, C. M., BELEMVIRE, A., NORRIS, L. C., GEORGE, K., CARANCI, A., LUCAS, B. & DENGELA, D. 2017. Insecticide resistance status of three malaria vectors, *Anopheles gambiae* (s.l.), *An. funestus* and *An. mascarensis*, from the south, central and east coasts of Madagascar. *Parasit Vectors*, 10, 396.
- RANSON, H., CLAUDIANOS, C., ORTELLI, F., ABGRALL, C., HEMINGWAY, J., SHARAKHOVA, M. V., UNGER, M. F., COLLINS, F. H. & FEYEREISEN, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298, 179-181.
- RANSON, H. & HEMINGWAY, J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 226-241.
- RANSON, H., JENSEN, B., WANG, X., PRAPANTHADARA, L., HEMINGWAY, J. & COLLINS, F. 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology*, 9, 499-507.
- RAYMOND, M., FOURNIER, D., BRIDE, J.-M., CUANY, A., BERGE, J., MAGNIN, M. & PASTEUR, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology*, 79, 1452-1458.
- RBM 2008. The Global Malaria Action Plan for a Malaria-free World. In: ORGANISATION, R. B. M.-W. H. (ed.). Geneva Switzerland.
- REID, J. A. & KNIGHT, K. L. 1961. Classification within the subgenus *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 55, 474-488.
- RENDIC, S. 2002. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*, 34, 83-448.
- RIVERO, A., VEZILIER, J., WEILL, M., READ, A. F. & GANDON, S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS pathogens*, 6, e1001000.
- RIVERON, J. M., IRVING, H., NDULA, M., BARNES, K. G., IBRAHIM, S. S., PAINE, M. J. & WONDJI, C. S. 2013. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 252-7.
- RIVERON, J. M., OSAE, M., EGYIR-YAWSON, A., IRVING, H., IBRAHIM, S. S. & WONDJI, C. S. 2016. Multiple insecticide resistance in the major malaria vector

- Anopheles funestus* in southern Ghana: implications for malaria control. *Parasit Vectors*, 9, 504.
- RIVERON, J. M., WATSENGA, F., IRVING, H., IRISH, S. R. & WONDJI, C. S. 2017. High Plasmodium Infection Rate and Reduced Bed Net Efficacy in Multiple Insecticide-Resistant Malaria Vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *The Journal of infectious diseases*, 217, 320-328.
- RIVERON, J. M., WATSENGA, F., IRVING, H., IRISH, S. R. & WONDJI, C. S. 2018. High Plasmodium Infection Rate and Reduced Bed Net Efficacy in Multiple Insecticide-Resistant Malaria Vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J Infect Dis*, 217, 320-328.
- RIVERON, J. M., YUNTA, C., IBRAHIM, S. S., DJOUAKA, R., IRVING, H., MENZE, B. D., ISMAIL, H. M., HEMINGWAY, J., RANSON, H., ALBERT, A. & WONDJI, C. S. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically-based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol*, 15, R27.
- RODHAIN, F. & PEREZ, C. 1985. *Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs.*
- ROUSH, R. T. & MCKENZIE, J. A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol*, 32, 361-80.
- ROUSH, R. T. & MCKENZIE, J. A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual review of entomology*, 32, 361-380.
- ROWLAND, M. 1991. Activity and mating competitiveness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An.stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Med Vet Entomol*, 5, 207-22.
- ROWLAND, M. 1991. Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An.stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology*, 5, 193-206.
- SALGADO, V. L., IRVING, S. N. & MILLER, T. 1983. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20, 169-182.
- SAMB, B., KONATE, L., IRVING, H., RIVERON, J. M., DIA, I., FAYE, O. & WONDJI, C. S. 2016. Investigating molecular basis of lambda-cyhalothrin resistance in an *Anopheles funestus* population from Senegal. *Parasit Vectors*, 9, 449.

- SANDEU, M. M., MOUSSILIOU, A., MOIROUX, N., PADONOU, G. G., MASSOUGBODJI, A., CORBEL, V. & NDAM, N. T. 2012. Optimized Pan-species and speciation duplex real-time PCR assays for Plasmodium parasites detection in malaria vectors. *PLoS One*, 7, e52719.
- SANTOLAMAZZA, F., MANCINI, E., SIMARD, F., QI, Y., TU, Z. & DELLA TORRE, A. 2008. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria journal*, 7, 163.
- SAUL, A. 2007. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20, 476-481.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCOTT, J. A., BROGDON, W. G. & COLLINS, F. H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 49, 520-529.
- SCOTT, J. G., LIU, N. & WEN, Z. 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121, 147-155.
- SIMARD, F., FONTENILLE, D., LEHMANN, T., GIROD, R., BRUTUS, L., GOPAUL, R., DOURNON, C. & COLLINS, F. H. 1999. High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 1000-1009.
- SINKA, M., BANGS, M., MANGUIN, S., RUBIO-PALIS, Y., CHAREONVIRIYAPHAP, T., COETZEE, M., MBOGO, C., HEMINGWAY, J., PATIL, A., TEMPERLEY, W., GETHING, P., KABARIA, C., BURKOT, T., HARBACH, R. & HAY, S. 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 69.
- SNOUNOU, G. & SINGH, B. 2002. Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. *Malaria methods and protocols*. Springer.
- SPILLINGS, B., BROOKE, B., KOEKEMOER, L., CHIPHWANYA, J., COETZEE, M. & HUNT, R. 2009. A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, the major malaria vector in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 510-515.
- STUMP, A. D., ATIEMI, F. K., VULULE, J. M. & BESANSKY, N. J. 2004. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles*

- gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70, 591-596.
- SUCHEL, F. 1988. Les régions climatiques du Cameroun: Les climats du Cameroun. *Travaux de Géographie Tropicale*, 5, 1-288.
- TABACHNICK, W. 2003. Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases. *Journal of Medical Entomology*, 40, 597-606.
- TABUE, R., NEM, T., ATANGANA, J., BIGOGA, J., PATCHOKE, S., TCHOUINE, F., FODJO, B., LEKE, R. & FONDJO, E. 2014. *Anopheles ziemanni* a locally important malaria vector in Ndop health district, north west region of Cameroon. *Parasites & Vectors*, 7, 262.
- TANTELY, M. L., TORTOSA, P., ALOUT, H., BERTICAT, C., BERTHOMIEU, A., RUTEE, A., DEHECQ, J. S., MAKOUNDOU, P., LABBE, P., PASTEUR, N. & WEILL, M. 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. *Insect Biochem Mol Biol*, 40, 317-24.
- TARIMO, B., LAW, H., TAO, D., PASTRANA-MENA, R., KANZOK, S., BUZA, J. & DINGLASAN, R. 2018. Paraquat-Mediated Oxidative Stress in *Anopheles gambiae* Mosquitoes Is Regulated by An Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response. *Proteomes*, 6, 47.
- TCHOUAKUI, M., RIVERON, J. M., DJONABAYE, D., TCHAPGA, W., IRVING, H., TAKAM, P. S., NJIOKOU, F. & WONDJI, C. S. 2018. Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes*, 9, 645.
- THABET, H., BRAHMI, N., KOURAÏCHI, N., ELGHORD, H. & AMAMOU, M. 2009. Intoxications par les pesticides organophosphorés: nouveaux concepts. *Réanimation*, 18, 633-639.
- TORRE, A. D., FANELLO, C., AKOGBETO, M., DOSSOU-YOVO, J., FAVIA, G., PETRARCA, V. & COLUZZI, M. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* ss in West Africa. *Insect molecular biology*, 10, 9-18.
- TOURÉ, Y., PETRARCA, V., TRAORE, S., COULIBALY, A., MAIGA, H., SANKARE, O., SOW, M., DI DECO, M. & COLUZZI, M. 1994. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s. str. in Mali, West Africa. *Genetica*, 94, 213-223.

- TRAPE, J.-F., TALL, A., DIAGNE, N., NDIATH, O., LY, A. B., FAYE, J., DIEYE-BA, F., ROUCHER, C., BOUGANALI, C. & BADIANE, A. 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, 925-932.
- VONTAS, J., KIOULOS, E., PAVLIDI, N., MOROU, E., DELLA TORRE, A. & RANSON, H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 126-131.
- VULULE, J., BEACH, R., ATIEMI, F., ROBERTS, J., MOUNT, D. & MWANGI, R. 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, 71-75.
- WEEDALL, G. D., MUGENZI, L. M., MENZE, B. D., TCHOUAKUI, M., IBRAHIM, S. S., AMVONGO-ADJIA, N., IRVING, H., WONDJI, M. J., TCHOUPO, M. & DJOUAKA, R. 2019. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11, eaat7386.
- WEILL, M., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K., CHANDRE, F., BERTHOMIEU, A., BERTICAT, C., PASTEUR, N., PHILIPS, A., FORT, P. & RAYMOND, M. 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423, 136.
- WHITE, G. 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, 68, 278-298.
- WHO 2011. Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment [2000-2009]. Geneva: World Health Organization.
- WHO 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). 2012. ISBN, 978, 4.
- WHO 2016. *World malaria report 2015*, World Health Organization.
- WHO 2018. <Malaria report 2018.pdf>.
- WOKE, P. A., ALLY, M. S. & ROSENBERGER JR, C. R. 1956. The numbers of eggs developed related to the quantities of human blood ingested in *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 49, 435-441.

- WONDJI, C., SIMARD, F. & FONTENILLE, D. 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Molecular Biology*, 11, 11-19.
- WONDJI, C. S., COLEMAN, M., KLEINSCHMIDT, I., MZILAHOWA, T., IRVING, H., NDULA, M., REHMAN, A., MORGAN, J., BARNES, K. G. & HEMINGWAY, J. 2012. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19063-70.
- WONDJI, C. S., DABIRE, R. K., TUKUR, Z., IRVING, H., DJOUAKA, R. & MORGAN, J. C. 2011. Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41, 484-491.
- WONDJI, C. S., IRVING, H., MORGAN, J., LOBO, N. F., COLLINS, F. H., HUNT, R. H., COETZEE, M., HEMINGWAY, J. & RANSON, H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome research*, 19, 452-459.
- ZAIM, M., AITIO, A. & NAKASHIMA, N. 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and veterinary entomology*, 14, 1-5.
- ZAIM, M. & GUILLET, P. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18, 161-163.
- ZHENG, L., BENEDICT, M. Q., CORNEL, A. J., COLLINS, F. H. & KAFATOS, F. C. 1996. An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 143, 941-952.

ANNEXES

Annexe 1 : Gite typique à *Anopheles funestus*



Annexe 2 : Clé d'identification des adultes d'anophèles

CLES DES ANOPHELES VECTEURS MAJEURS AU CAMEROUN (adultes)













CARACTERES COMMUNS

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

CARACTERES DISTINCTIFS

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

AUTRES CRITERES BIOMETRIQUES

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

Annexe 3 : Conception de la méthode Allele-Specific PCR pour le génotypage de la mutation L119F

Séquence du gène *GSTe2* chez *An. funestus* avec la mutation L119F (C/T)

```

ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCTACACCTAAGCCCACCATGCCG
GGCCGTCGAACTGACAGCCAAAGCGTTGGGATTGGAACGGAACAG
AAGAATATTAACCTTCTGGCTGGTGATCATTTGACGCCGGAGTTCAT
GAAGGTAAGTTTTTTAGGGATTAGAGAATGTTTGTTTTTGATCCATCA
TATTCAACTTAACCTACGATCATTACAGTTAAACCCCAACATACGA
TCCCGGTGCTGGATGATGATGGTACGATCATTACCGAGAGTCATGCG
ATCATGATCTATCTGGTGACGAAGTATGGCAAAGATGACACCCTGTA
CCAAAAGATCCAGTCCAGCAGGCTCGCGTAAATGCTGCCCTACACT
TTGAATCTGGTGTACTGTTTGCACGAATGCGTTTCATTTTTGTGAGTT
AATTTATTGACTGGTTATCAATGCGGTAGATAAACAATTTTTCAT
TTCTTATTCTCATTACAGGAGCGTATT [C/T] TTTCTACGGAAAATCG
GACATTCCCGAAGATCGAGTCGAGTATGTGCAGAAAATCGTACCGCTT
GCTGGAGGACACCCTAAAGGATGACTTTGTTGCTGGGTGAAAATGA
CAATTGCCGACTTTAGCTGCATTTCTACCATCTCTAGCATTATGGGCG
TTGTTCCGCTGGAGCAATCGGAGCATCCACGTATCTATGAGTGGATC
GATCGTTTGAAGCAGTTGCCATACTACGAGGAAGCTAATGGAGGCGG
TGGAACCTGACCTGGGCAAGTTTGTACTTGCCAAAAAGGAGGAAAAT
GCTAAAGCTTGA
  
```

Séquences d'amorces pour le génotypage

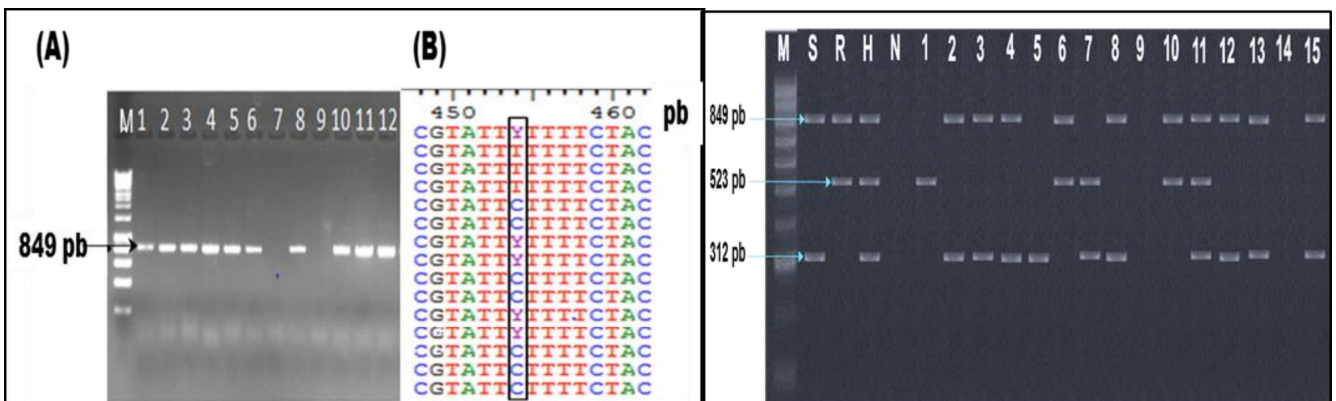
L119F-Fwd ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT

L119F-Rev TTCCTCCTTTTTACGATTTCGAACT

L119F-Res CGGGAATGTCCGATTTTCCGTAGAA**tAA**

L119-F-Sus CATTCTTATTCTCATTACAGGAGCGTA**aTC**

Schéma du gel après migration



Annexe 4 : Liste des présentations orales à différentes conférences.

Magellan Tchouakui, Mu-Chun Chiang, Cyrille Ndo, Carine Kuicheu Kegoum, Jacob Riveron Miranda, Murielle Wondji, Micareme Tchoupo, Charles Wondji. **2018**. Impact of L119F-GSTe2 metabolic resistance and A296S-RDL target site resistance on the vectorial capacity of *Anopheles funestus* in Cameroon; [Oral presentation] *first annual conference of PAMCA Cameroon (Cameroon)*, January 12, 2018.

Magellan Tchouakui, Mu-Chun Chiang, Cyrille Ndo, Carine Kuicheu Kegoum, Jacob Riveron Miranda, Murielle Wondji, Micareme Tchoupo, Charles Wondji. **2018**. Impact of L119F-GSTe2 metabolic resistance and A296S-RDL target site resistance on the vectorial capacity of *Anopheles funestus* in Cameroon; [Oral presentation] *Seventh MULTILATERAL INITIATIVE ON MALARIA PANAFRICAN conference (MIM) (Senegal)*, April 14-20, 2018.

Annexe 5 : Posters présentés en conférences.



Fitness cost of L119F-GSTe2 First DNA-based molecular marker for metabolic resistance on life traits and vectorial capacity of *Anopheles funestus* field population from Cameroon



Magellan Tchouakui, Mu-Chun Chiang, Cyrille Ndo, Carine Kuicheu Kegoum, Jacob Riveron Miranda, Murielle Wondji, Micareme Tchoupo, Flobert Njiokou, Charles Wondji

¹Research Unit LSTM/CRID P.O. BOX 13591, Yaoundé, Cameroon Email: mtchouakui@yahoo.fr

1. Summary

- Malaria control in Africa is mainly based on the use of insecticides based interventions: long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS)
- Metabolic resistance to insecticides is threatening malaria control in this region. However, the extent to which it impacts malaria transmission remains unclear
- Here, we investigated the impact of a glutathione S-transferase metabolic resistance on life-traits and *Plasmodium* infection in field *Anopheles funestus* s.s population



2. Introduction

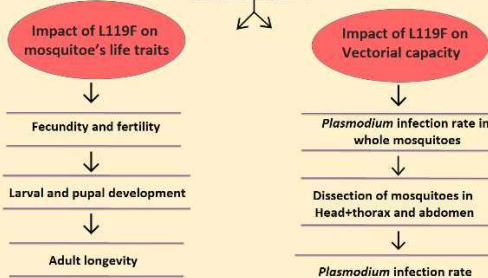
- Progress made so far towards eliminating malaria is threatened by insecticide resistance. A good understanding of resistance mechanisms and more importantly, their impact on vector's life traits and diseases transmission are essential for the success of resistance management strategies (1).
- An. funestus* s.s., a major malaria vector, is increasingly being reported resistant to pyrethroid across Africa (2) and metabolic resistance has consistently been reported to be the main driver of pyrethroid and DDT resistance in this species for which no *kdr* marker has been detected so far despite the widespread report of resistance across the continent (3).
- However the extent to which metabolic resistance affects natural populations of mosquitoes including their reproduction ability remains uncharacterised due to lack of DNA-based molecular marker for metabolic resistance. The recent detection of a single amino acid change (L119F) in the glutathione S-transferase epsilon 2 (GSTe2) conferring DDT/pyrethroid resistance in *An. funestus* (4), further offers the opportunity to assess such impact.
- The main aim of the study was to evaluate the impact of a glutathione S-transferase metabolic resistance on key life traits and *Plasmodium* infection in field *Anopheles funestus* s.s.

3. Methods

- Indoor resting mosquitoes were collected indoor in Mibellon and Obout Cameroon using electric aspirators
- A cocktail polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm a randomly field collected females as *An. funestus* s.s.
- A new allele-specific PCR (AS-PCR) performed to genotype the L119F-GSTe2 mutation (associated with DDT and permethrin resistance).



Indoor collection using electric aspirator



DNA extraction according to LIVAK method.



Molecular identification of the members of *An. funestus* group with cocktail PCR



Real-time assays for *Plasmodium* detection



Design of AS-PCR for L119F genotyping

We compared the fecundity, fertility, larval and pupal developmental time, adult longevity and vectorial capacity of L119F-RR homozygous resistant mosquitoes to that of the L119F-RS heterozygotes and L119F-SS homozygous susceptible mosquitoes using Graph pad prism 7.00.

7. References

- WHO. 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). 2012. *JSRN*, 978, 4.
- RIVERON, J. M., IRVING, H., NDJALA, M., BARNES, K. G., IBRAHIM, S. S., PAINE, M. J. & WONDJI, C. S. 2013. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 252-7.
- Irving H, Wondji CS. 2017. Investigating knockdown resistance (*kdr*) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genetics* 2017, 18:76.
- Riveron, J. M., Yanta, C., Ibrahim, S. S., Djonaka, R., Irving, H., Menze, B. D., Ismail, H. M., Heringway, J., Ransun, T., Albert, A. & Wondji, C. S. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol.* 15, R27.

4. Results

4.1 Impact of L119F-GSTe2 on mosquito's life traits

- A total of 1,000 female blood fed females *An. funestus* s.l were collected in Obout and 1,147 in Mibellon and molecular analysis revealed that 95% were *An. funestus* s.s ;
- The L119F-GSTe2 resistant allele was present in Southern (Obout) (56%) and Adamawa (Mibellon) (25%) regions of Cameroon
- L119F-RR had lower fecundity than both L119F-RS and L119F-SS ($P = 0.003$) but L119F-RS developed significantly faster than other genotypes ($X^2=8.96$; $P = 0.0028$)
- L119F-RR homozygote resistant had increase longevity than heterozygote and homozygote susceptible mosquitoes ($2.2 < OR < 7.5$; IC 95%: 1.04 – 21.28; $0.001 < P < 0.050$).

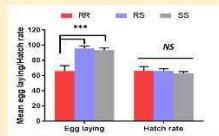


Figure 2. Comparison of mean number of eggs laid and hatch rate between RR, RS and SS

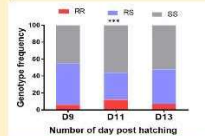


Figure 3. Comparison of larval developmental time and pupal formation between RR, RS and SS



Figure 1. AS-PCR for L119F-GSTe2 genotyping

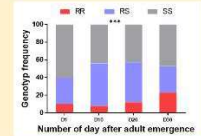


Figure 4. Comparison of adult longevity between RR, RS and SS

4.2 Impact of L119F-GSTe2 on vectorial capacity of field *An. funestus* s.s

- The whole mosquito *Plasmodium* and sporozoite infection rate was respectively 57% and 14.8% in Obout (n=508) and 19.7% and 5% in Mibellon (n=360)
- No association was found between L119F-GSTe2 and whole mosquito infection status.
- However, when analyzing oocyst and sporozoite infection separately, the resistant homozygous L119F-RR genotype was significantly more infected in Obout than both heterozygote ($OR=2.5$; $P=0.012$) and homozygote susceptible (L119F-SS) genotypes ($OR=2.10$; $P=0.013$)

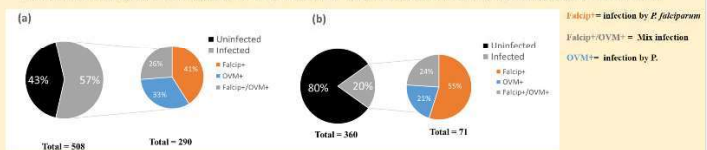


Figure 5. *Plasmodium* infection status in Obout (a) and Mibellon (b)

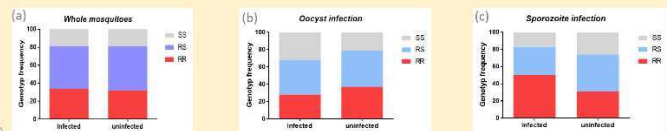


Figure 6. Comparison of *Plasmodium* infection rates between L119F-RR, L119F-RS, and L119F-SS in whole mosquitoes (a), abdomen (b) and head+thorax (c) from Obout

5. Discussion & Conclusions

- An. funestus* s.s were the main malaria vector in both Obout and Mibellon with very high *Plasmodium* infection rate recorded in this species
- The high frequency of L119F resistant allele observed in this localities, could reduce the effectiveness of control tools
- L119F-GSTe2 mutation had a detrimental effect on fecundity of field collected mosquitoes and heterozygote advantage effect was observed in developmental time of larvae indicating that this resistance could be managed if early detected.
- Metabolic resistance due to GSTe2 may increase malaria transmission as *Plasmodium* parasites may developed easily in resistant mosquitoes than in susceptible which is problematic for malaria control program.

This study highlights the epidemiological importance of molecular markers and suggest that DDT and pyrethroids resistance have important public health consequences

8. Acknowledgement/Funding



Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus*

Magellan Tchoukui, Billy Tene Fossog, Brigitte Vanessa Ngannang, Doumani Djonabaye, Williams Tchappa, Flobert Njiokou, Charles S. Wondji



Research Unit LSTM/CRID P.O. BOX 13591, Yaoundé, Cameroon. Email: magellan.tchoukui@crid-cam.net



INTRODUCTION The scale up of vector control measures, in particular long-lasting insecticide treated nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS), significantly contributed to the reduction of malaria burden. However, recent reports of increase cases of malaria (WHO, 2018) is an indication that more is needed to control this disease. In fact, resistance to insecticides is spreading in malaria vectors (including *Anopheles funestus*) in Africa compromising the effectiveness of vector control tools (WHO, 2018). Improved understanding of mosquito mating systems, and more importantly how insecticide resistance mechanisms affects the mating success in field population of malaria vectors such as *An. funestus*, could possibly give new tools for vector control implementation.

AIMS

- Characterize the mating swarms of *An. funestus* in two locations in Cameroon
- Investigate the resistance profiling and molecular basis of insecticide resistance in a natural populations of *An. funestus* in Tibati, Cameroon.
- Investigate the potential impact of metabolic resistance on mating male competitiveness by assessing the association between the L119F-GSTe2 metabolic resistance marker and the mating success of *An. funestus* mosquitoes in field conditions.

METHODOLOGY

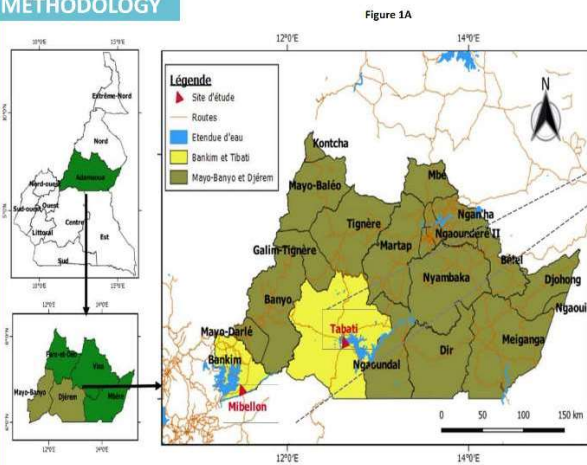


Figure 1A: map representing the different study sites
 - The main malaria vectors in Tibati are *An. funestus* during the dry season and *An. gambiae* s.l. during the rainy season, whereas in Mibellon *An. funestus* is the predominant species (Cohuet et al., 2005).
 - The dominance of *An. funestus* in these areas is due to the presence of multiple lakes known as suitable breeding sites for this species.
 - LLINs is the main vector control approach in Cameroon.

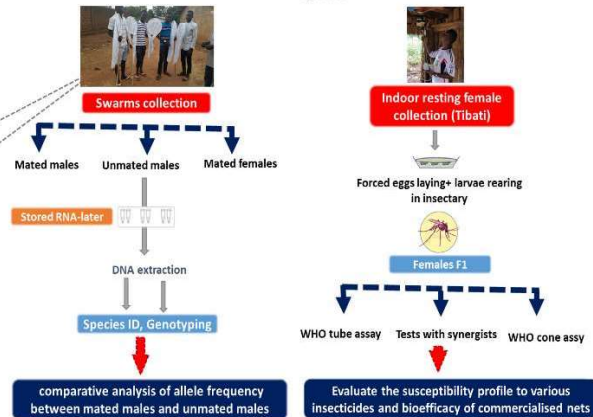


Figure 1B: study design
 - Method of swarms collection using sweep nets (left) and collection of indoor resting females (right) using electric aspirators
 - Collected mosquitoes (from swarms and indoor) were morphologically identified using the key of Gillies and De Meillon (1968) and molecularly using a cocktail PCR (Koenker et al., 2002).
 - The L119F-GSTe2 metabolic and A296S-RDL target-site resistance markers, involved in DDT/pyrethrin and deltamethrin resistance in *An. funestus* respectively were genotyped in order to assess the effect of these resistance mechanisms on the mating ability of *An. funestus* field mosquitoes

RESULTS AND DISCUSSION

1- Susceptibility profile to insecticides and bio efficacy of commercialised nets

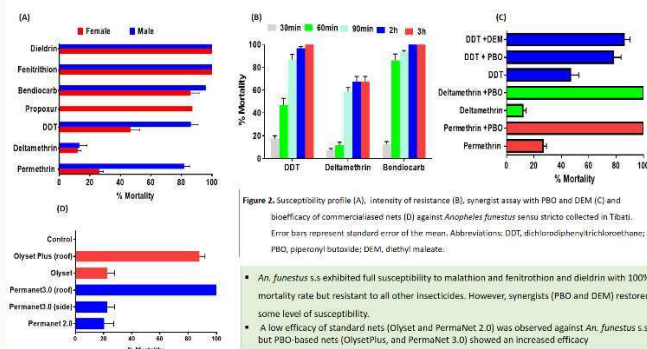
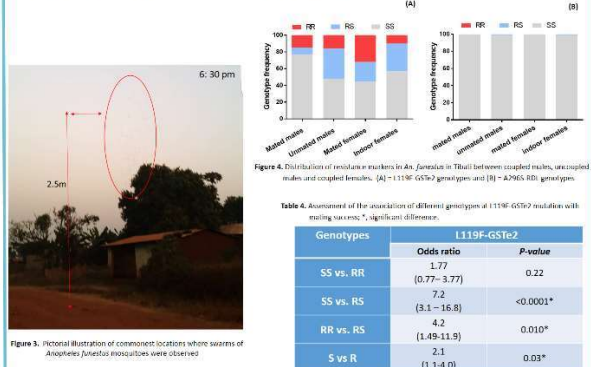


Figure 2. Susceptibility profile (A), intensity of resistance (B), synergist assay with PBO and DEM (C) and bioefficacy of commercialised nets (D) against *Anopheles funestus* sensu stricto collected in Tibati. Error bars represent standard error of the mean. Abbreviations: DDT, dichlorodiphenylchloroethane; PBO, piperonyl butoxide; DEM, deltamethrin.
 • *An. funestus* s.s exhibited full susceptibility to malathion and fenitrothion and deltamethrin with 100% mortality rate but resistant to all other insecticides. However, synergists (PBO and DEM) restored some level of susceptibility.
 • A low efficacy of standard nets (Olyset and PermaNet 2.0) was observed against *An. funestus* s.s. but PBO-based nets (OlysetPlus, and PermaNet 3.0) showed an increased efficacy

2- Impact of L119F-GSTe2 metabolic and A296S-RDL target site resistance on the mating success of *An. funestus* s.s field population



CONCLUSION This study revealed a high and multiple resistance to insecticides, coupled with low efficacy of LLINs without PBO in *An. funestus*, highlighting the threat that insecticide resistance poses on the efficacy of existing vector control tools.

- Interestingly, this study revealed that *An. funestus* swarms can be detected and characterized in the field providing the opportunity for mating swarms of this species to be targeted to implement alternative vector control strategies.
- This study also provides preliminary evidences that metabolic resistance potentially exerts a fitness cost on mating competitiveness in resistant mosquitoes.

ACKNOWLEDGEMENT/FUNDING
 2nd ANTI-VeC Annual Meeting, Imperial College London, 20th - 21st June 2019

Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus*

P-0041

Magefian Tchoufou, Sally Tern-Tsang, Brigitte Vanessa Njirang, Doumar Opatobaye, Williams Tchigba, Robert Hurler, Charles S. World



ORCID: 0009-0001-11881-7666, Yaoundé, Cameroon. Email: magefian.tchoufou@ucm-cm.net



INTRODUCTION

The scale up of vector control measures, in particular long-lasting insecticide treated nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS), significantly contributed to the reduction of malaria burden. However, recent reports of increased cases of malaria (WHO, 2018) is an indication that more is needed to control this disease. In fact, resistance to insecticides is spreading in malaria vectors (including *Anopheles funestus*) in Africa compromising the effectiveness of vector control tools (WHO, 2018). Improved understanding of mosquito mating systems, and more importantly how insecticide resistance mechanisms affects the mating systems in field population of malaria vectors such as *An. funestus*, could possibly give new leads for vector control implementation.

AIMS

- Characterize the mating systems of *An. funestus* in two localities in Cameroon
- Investigate the resistance profiling and molecular basis of insecticide resistance in a natural population of *An. funestus* in Tibati, Cameroon.
- Investigate the potential impact of metabolic resistance on mating male competitiveness by assessing the association between the LLIN-DDT metabolic resistance marker and the mating success of *An. funestus* mosquitoes in field conditions.

METHODOLOGY

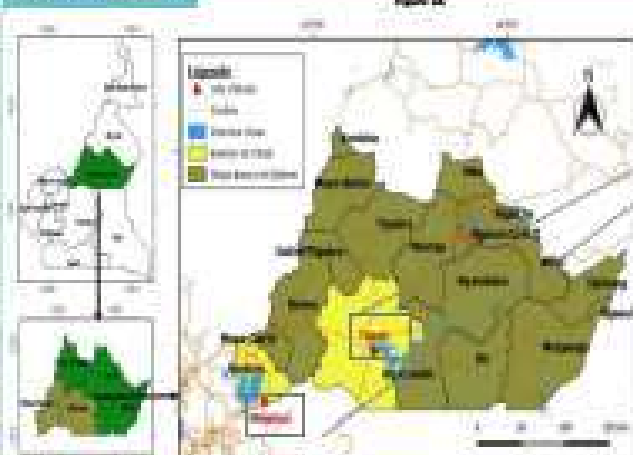


Figure 1: Map of Cameroon showing the different study sites. The inset map shows the location of Cameroon in West Africa. The main map shows the study sites: Tibati and Yaoundé. The legend indicates the study sites, roads, and rivers.

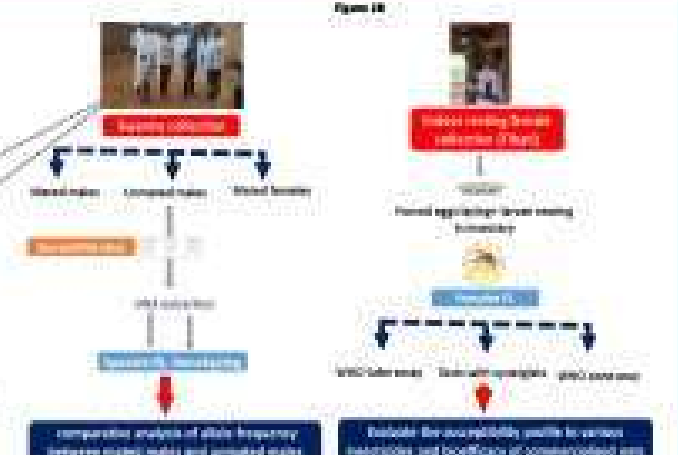


Figure 2: Study methodology flowchart. The process involves sampling mosquitoes from Tibati and Yaoundé, analyzing their resistance profiles and mating systems, and comparing mating frequencies between resistant and untreated males.

RESULTS AND DISCUSSION



1- Susceptibility profile to insecticides and the efficacy of commercialized nets

Figure 3: Susceptibility profiles to insecticides and the efficacy of commercialized nets. The charts show the percentage of mosquitoes that were susceptible to DDT, Permethrin, and Deltamethrin. The efficacy of LLINs with and without PBO is also shown.



2- Impact of LLIN-DDT metabolic and L119F-GSTe2 target site resistance on the mating success of *An. funestus* L1 field population

Figure 3: Impact of LLIN-DDT metabolic and L119F-GSTe2 target site resistance on the mating success of *An. funestus* L1 field population. The bar chart shows the mating success of *An. funestus* L1 field population under different conditions.

CONCLUSION

This study revealed a high and multiple resistance to insecticides, coupled with low efficacy of LLINs without PBO in *An. funestus*, highlighting the threat that insecticide resistance poses on the efficacy of existing vector control tools. Interestingly, this study revealed that *An. funestus* systems can be detected and characterized in the field providing the opportunity for mating success of this species to be targeted to implement alternative vector control strategies. This study also provides preliminary evidence that metabolic resistance potentially exerts a fitness cost on mating competitiveness in resistant mosquitoes.

ACKNOWLEDGEMENTS/SPONSORING

With Pan African Mosquito Control Association (PAMCA) Annual Conference, Yaoundé 23rd – 25th September 2019

Annexe 6 : Articles publiés en relation avec la thèse.

Liste des publications :

TCHOUAKUI, M., RIVERON, J. M., DJONABAYE, D., TCHAPGA, W., IRVING, H., TAKAM, P. S., NJIOKOU, F. & WONDJI, C. S. 2018. Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes*, 9, 645.

TCHOUAKUI, M., FOSSOG, B. T., NGANNANG, B. V., DJONABAYE, D., TCHAPGA, W., NJIOKOU, F. & WONDJI, C. S. 2019. Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector. *Wellcome Open Research*, 4.

TCHOUAKUI, M., CHIANG, M.-C., NDO, C., KUICHEU, C. K., AMVONGO-ADJIA, N., WONDJI, M. J., TCHOUPPO, M., KUSIMO, M. O., RIVERON, J. M. & WONDJI, C. S. 2019. A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher *Plasmodium* infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Scientific reports*, 9, 5772.

TCHOUAKUI, M., MIRANDA, J. R., MUGENZI, L. M., DJONABAYE, D., WONDJI, M. J., TCHOUPPO, M., et al. 2020. Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Heredity*, 124, 621-632

ARTICLES

1- TCHOUAKUI, M., RIVERON, J. M., DJONABAYE, D., TCHAPGA, W., IRVING, H., TAKAM, P. S., NJIOKOU, F. & WONDJI, C. S. 2018. Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes*, 9, 645.

Article

Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles Funestus*

Magellan Tchouakui ^{1,2,*}, Jacob M. Riveron ^{1,3}, Doumani Djonabaye ^{1,4}, Williams Tchapgga ¹, Helen Irving ³, Patrice Soh Takam ⁵, Flobert Njiokou ^{1,2} and Charles S. Wondji ^{1,3,*}

¹ LSTM Research Unit at the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), P.O. Box 13591 Yaoundé, Cameroon; jacob.riveron_miranda@syngenta.com (J.M.R.); doumani_dd@yahoo.com (D.D.); wills.tchapga@gmail.com (W.T.); njiokouf@yahoo.com (F.N.)

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

³ Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L35QA, UK; helen.irving@lstm.ac.uk

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon

⁵ Department of Mathematics, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon; b_calvo2002@yahoo.fr

* Correspondence: mtchouakui@yahoo.fr (M.T.); charles.wondji@lstm.ac.uk (C.S.W.)

Received: 24 October 2018; Accepted: 17 December 2018; Published: 19 December 2018



Abstract: Metabolic resistance to insecticides threatens malaria control. However, little is known about its fitness cost in field populations of malaria vectors, thus limiting the design of suitable resistance management strategies. Here, we assessed the association between the glutathione S-transferase GSTe2-mediated metabolic resistance and life-traits of natural populations of *Anopheles funestus*. A total of 1200 indoor resting blood-fed female *An. funestus* (F₀) were collected in Mibellon, Cameroon (2016/2017), and allowed to lay eggs individually. Genotyping of F1 mosquitoes for the L119F-GSTE2 mutation revealed that L/L119-homozygote susceptible (SS) mosquitoes significantly laid more eggs than heterozygotes L119F-RS (odds ratio (OR) = 2.06; $p < 0.0001$) and homozygote resistant 119F/F-RR (OR = 2.93; $p < 0.0001$). L/L119-SS susceptible mosquitoes also showed the higher ability for oviposition than 119F/F-RR resistant (OR = 2.68; $p = 0.0002$) indicating a reduced fecundity in resistant mosquitoes. Furthermore, L119F-RS larvae developed faster (nine days) than L119F-RR and L119F-SS (11 days) ($X^2 = 11.052$; degree of freedom (df) = 4; $p = 0.02$) suggesting a heterozygote advantage effect for larval development. Interestingly, L/L119-SS developed faster than 119F/F-RR (OR = 5.3; $p < 0.0001$) revealing an increased developmental time in resistant mosquitoes. However, genotyping and sequencing revealed that L119F-RR mosquitoes exhibited a higher adult longevity compared to RS (OR > 2.2; $p < 0.05$) and SS (OR > 2.1; $p < 0.05$) with an increased frequency of GSTe2-resistant haplotypes in mosquitoes of D30 after adult emergence. Additionally, comparison of the expression of GSTe2 revealed a significantly increased expression from D1-D30 after emergence of adults (Anova test (F) = 8; df = 3; $p = 0.008$). The negative association between GSTe2 and some life traits of *An. funestus* could facilitate new resistance management strategies. However, the increased longevity of GSTe2-resistant mosquitoes suggests that an increase in resistance could exacerbate malaria transmission.

Keywords: malaria; vector control; *Anopheles funestus*; metabolic resistance; fitness cost; glutathione S-transferase; L119F-GSTE2

1. Introduction

Malaria remains one of the main causes of morbidity and mortality in Sub-Saharan Africa, predominantly in children under 5 years old and pregnant women [1]. Insecticide-based control interventions using pyrethroids and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), notably through long lasting insecticide nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS), are key components of malaria control in Africa [1]. This strategy was recently revealed to have contributed to a decrease of more than 70% of malaria cases in the past decade [2]. Unfortunately, malaria vectors such as *Anopheles funestus* are increasingly developing resistance to the main insecticide classes particularly against pyrethroids, the only class recommended for bed net impregnation since they are safe and fast acting [3]. To ensure the continued effectiveness of insecticide-based interventions, it is crucial to design and implement suitable insecticide resistance management (IRM) strategies. However, designing such IRM strategies requires a good understanding of the fitness costs incurred by the development of resistance in the field populations. A fitness cost means that an individual possessing the resistance allele would lack some other advantages or “qualities” such that only susceptible insects will have such qualities in the absence of insecticide selection pressure [4]. In fact, it was shown that mutations or genes conferring resistance, such as the resistance of malaria vectors to insecticides, are usually associated with fitness costs that disrupt normal physiological functions of the vectors. For example, resistant vectors may have lower mating success [4,5], lower fecundity and fertility, higher developmental time and reduced longevity [6–9]. The presence of such fitness costs that can impact the spread and persistence of resistance alleles in the vector populations is a pre-requisite for the implementation of most insecticide resistance management strategies (IRMS) including rotation of insecticides [1]. Some progress has been made to study the fitness costs incurred by target-site resistance mechanisms [4–8], however, little is known about the fitness cost incurred by metabolic resistance [10], a mechanism that has been acknowledged to be more likely to lead to control failure [11]. This lack of information on the fitness cost of metabolic resistance is mainly caused by the absence of molecular markers to easily track the effect of this resistance in mosquitoes. In contrast, for target-site resistance, the first DNA-based diagnostic tools were available more than 20 years ago particularly for the knockdown resistance (*knr*) [12]. However, recent efforts have contributed to diagnostic tools with the identification of the first DNA-based metabolic resistance marker in the major malaria vector *An. funestus* where a leucine to phenylalanine amino acid change at codon 119 in the glutathione S-transferase epsilon 2 (L119F-GSTe2) was demonstrated to confer resistance to pyrethroid/DDT [13]. The L119F-GSTe2 diagnostic assay provides an excellent tool to study the fitness costs of a metabolic-mediated resistance in natural populations of *An. funestus*. This mosquito species plays a major role in the transmission of malaria and is widely distributed across the continent [14]. The important role of *An. funestus* in malaria transmission is related to the high *Plasmodium falciparum* parasite infection rates (more than 5%) of this vector in many African countries including Cameroon, its wide distribution and its anthropophilic behavior [15,16]. Pyrethroid resistance has also been increasingly reported in *An. funestus* populations from different regions in Sub-Saharan Africa including in southern Africa (South Africa [17,18], Mozambique [19,20], Malawi [21,22]). It has also been reported in East Africa (Uganda and Kenya [23,24] and Tanzania [25]), Central (Cameroon [26–28]) and West Africa (Benin [29,30], Ghana [31,32], Senegal [33] and Nigeria [30]). From the field evidence, it is unclear how this increased report of resistance affects the life traits of the vectors and malaria control. Although entomological parameters suggest that resistance may lead to a failure to reduce the number of mosquitoes and the biting rate, there is little evidence of failure to control malaria [10]. In this study the fitness cost of insecticide resistance on natural populations of *An. funestus* was assessed by investigating several fitness components of life-history using field-collected mosquitoes from Cameroon where the *An. funestus* populations are both resistant to pyrethroids and DDT [28]. Fitness cost evaluated by comparing the life traits parameters between different genotypes of the L119F-GSTe2 marker revealed that L119F-GSTe2 mutation has a detrimental impact on some life-traits of *An. funestus* field mosquitoes including fecundity and development of larvae but in contrast increased the adult longevity.

2. Materials and Methods

2.1. Study Site and Sample Collection

Indoor resting female mosquitoes were collected between May 2016 and February 2017 in Mibellon (6°46' N, 11°70' E), a village in Cameroon located in the Adamawa Region; Mayo Banyo Division and Bankim sub-division. The main malaria vector in the area is *An. funestus* present throughout the year due to the presence of a lake, with minor contributions from *Anopheles gambiae* [28]. The main vector control approach used in the area is LLINs, and the villages benefited from the universal LLIN coverage campaigns in recent years (2015) before this study. These malaria vectors are resistant to pyrethroids and DDT [28]. Most of the houses are mainly made of mud and brick walls, with thatched or iron-sheet roofs. The communities rely mainly on subsistence farming, cultivating rice and maize but also small-scale fishing. The F₀ females collected were kept in the insectary for at least four days and then left to oviposit using the forced-egg laying method as previously described [23]. All stages were reared according to the protocol previously described [23].

2.2. Life Traits Experiments

2.2.1. Fecundity and Fertility

Fully gravid females collected were put individually in 1.5 mL Eppendorf tubes with damp filter paper to enable them to lay eggs. After oviposition, the number of eggs laid per female and the number of larvae were recorded. After assessing the normality of eggs distribution using a Shapiro–Wilk normality test, the impact of resistance on fecundity was assessed by comparing the median number of eggs laid by different genotypes using a Kruskal–Wallis non-parametric test. Odds ratio for oviposition between wild homozygote resistant mosquitoes (L119F-RR), homozygote susceptible (L119F-SS) and heterozygote mosquitoes (L119F-RS) was also assessed using a statistical significance calculation based on the Fisher's exact probability test. The impact of resistance on fertility was assessed by comparing the hatch rate between different genotypes using a Chi-square (χ^2) test.

2.2.2. Development of Larvae and Pupae

After recording the total number of larvae produced per female, all larvae from the different genotypes were pooled and reared in the same container, thus avoiding variation in environmental conditions. This experiment was performed in three replicates of 10 trays per replicate and all immature stages were reared in the standard insectary condition. Larval bowls were large enough to allow for a sufficient surface area to prevent overcrowding and competition for food. The number of larvae varied between 200 and 300 per tray and water was changed every two days in each tray to minimize the effect of pollution. Changes in the length of larval and pupal development times and mortality rates were equally assessed by genotyping a set of 150 larvae at different stages (L1, L2, L3 and L4). Genotype frequency were monitored in larvae, pupae and adults to assess the impact of L119F mutation on developmental time and mortality. The rates of pupae formation was evaluated by comparing the genotype and allele frequency from the starting of pupation (pupae D9), on the third day (pupae D11) and on the fifth day of pupation (pupae D13).

2.2.3. Longevity of the Adult Mosquitoes

After adult emergence, mosquitoes were divided into three replicates. A set of about 40 mosquitoes was removed in each of the three replicates at different time points (day 1, 10, 20 and 30 after emergence). In average, 50 mosquitoes were used for genotyping whereas 3 pools of 10 mosquitoes each were used to assess the gene expression level of *GSTe2* at each time point. The lifespan of homozygous resistant adult mosquitoes was compared to that of susceptible and heterozygote mosquitoes by assessing the frequency of 119F resistant allele and expression levels of *GSTe2* (quantitative reverse transcription PCR; qRT-PCR) at different time points. In addition, the entire *GSTe2* gene of 882 bp was sequenced in

12 randomly selected mosquitoes for each time-point (D1, D10, D20 and D30 post-emergence) to assess the variation in haplotype diversity at the four-time points.

2.3. DNA Extraction and Species Identification

Genomic DNA (gDNA) was extracted from whole female mosquitoes (F_0) and all larval and pupal stages using the LIVAK method [34]. All females used for oviposition were morphologically identified as belonging to the *An. funestus* group [14]. Molecular identification was achieved through a cocktail PCR described by Koekoemoer et al. (2002) in order to determine the species [35].

2.4. Detection of Plasmodium Parasite in F_0 Field-Collected Mosquitoes

TaqMan assay protocol described by Bass et al. (2008) [36] was used to detect the presence of *Plasmodium* parasite in 200 *An. funestus* s.s field-collected females. This method detects the presence of *P. falciparum* (falcip+) and/or *P. ovale*, *P. vivax* and *P. malariae* (OVM+).

2.5. Genotyping of L119F-GSTe2 Mutation

To assess the role of metabolic-mediated resistance on the different life traits of resistant mosquitoes, the L119F-GSTe2 mutation, previously shown to confer DDT and permethrin resistance in *An. funestus* [13] was genotyped using a newly designed allele-specific PCR (AS-PCR) diagnostic assay. All the F_0 field-collected mosquitoes oviposited and non- oviposited and all the mosquitoes from larval and pupal stages were genotyped. Two outer and two inner primers are needed for the AS-PCR. The inner primers were designed manually with mismatched nucleotides in the 3rd nucleotide from the 3' end. PCR was carried out using 10 mM of each primer and 1 μ L of gDNA as template in 15 μ L reaction containing 10X Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 U Kapa Taq (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). The cycle parameters were: 1 cycle at 95 °C for 2 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were separated on 2% agarose gel by electrophoresis. The bands corresponding to different genotypes were interpreted as described by Tchouakui et al. (2018) [37].

2.6. Gene Expression Profile of GSTe2 and Longevity Adult of Adult Mosquitoes Using Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA from three biological replicates of D1, D10, D20 and D30 after the emergence of the adult was extracted using the Picopure RNA Isolation Kit (Life Technologies, Camarillo, CA, USA). The qRT-PCR assays were performed to assess the expression level of GSTe2 from D1 to D30; 1 mg of RNA from each of the three biological replicates made of pools of 10 mosquitoes at each time point, and FANG (full susceptible strain) was used as a template for cDNA synthesis using the superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's guidelines. The qRT-PCR was carried out as previously described [38,39] with the relative expression level and fold-change (FC) of GSTe2 in each time point relative to the susceptible strain calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [40] after normalization with the housekeeping genes ribosomal protein S7 (RSP7; AFUN007153) and actin 5C (AFUN006819).

2.7. Genetic Diversity of GSTe2 Gene and Adult Longevity

The full-length of the *An. funestus* GSTe2 gene (809 bp) was amplified from a total of 48 mosquitoes (12 for each time point). Two primers; Gste2F, 5'GGAATTCCATATGACCAAGCTAGT TCTGTACACGCT3' and Gste2R, 5'TCTAGATCAAGCTTTAGCATTTTCCTCCTT3' was used for gene amplification in 15 μ L reaction containing 10 mM of each primer, 10X Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 U Kapa Taq (Kapa Biosystems). PCR conditions were 1 cycle at 95 °C for 5 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were firstly visualized on 1.5% agarose gel stained with Midori green stain (Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany) and then purified using ExoSAP (New England

Biolabs, Ipswich, UK) clean up protocol according to manufacturer recommendations and directly sequenced on both strands. Sequences were visualised and corrected using BioEdit v7.2.5 software [41] and aligned using ClustalW Multiple Alignment integrated with BioEdit [42]. Parameters of genetic diversity were assessed using DnaSP v5.10.01 software [43] and MEGA v7.0.21 software [44].

2.8. Data Analysis

All analyses were conducted using GraphPad Prism version 7.00 and R 3.3.2. for Windows.

3. Results

3.1. Field Collection and Species Identification

One thousand and two hundred blood-fed females were collected indoor in Mibellon, Cameroon. Results from PCR species identification performed on the F₀ females morphologically identified as *An. funestus* group confirmed that they all belong to the major malaria vector, *An. funestus* s.s. species.

3.2. Infection of *An. funestus* by *Plasmodium* Parasite

Two-hundred field collected females were screened for *P. falciparum* (falcip+) and *P. ovale*/*P. vivax*/*P. malariae* (OVM+) using TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) assay on whole mosquitoes. Twenty one percent (42/200) of mosquitoes were infected with *Plasmodium* parasites comprising 71% (30/42) infection by falcip+, 19.04% (8/42) by OVM+ and 9.52% (4/42) mixed infection by falcip+ and OVM+ using the whole mosquitoes. However, the sporozoite infection rate was 4.2% (5/120) with three falcip+, one OVM+ and one mix infection with falcip+/OVM+.

3.3. Genotyping of the L119F-GSTe2 in Field-Collected Mosquitoes

The L119F-GSTe2 was successfully genotyped in 260 oviposited females (F₀) revealing a low frequency of the 119F resistant allele in the *An. funestus* s.s. population from Mibellon (24.8%). 6.1% (16/260) of the individuals were homozygote for the 119F resistant allele (119F/F-RR) whereas 37.3% (97/260) were heterozygote (L119F-RS), and 56.5% (147/260) were homozygote for the L119 susceptible allele (L/L119-SS).

3.4. Assessment of the Association between the L119F-GSTe2 Mutation and the Life Traits of *An. funestus*

3.4.1. Association between L119F-GSTe2 and Fecundity/Fertility of Female Mosquitoes

In order to assess the role of the L119F mutation on the ability of wild *An. funestus* to lay eggs, we compared the frequency of the resistant allele between oviposited and non-oviposited females. This revealed a higher but not significant ($\chi^2 = 1.65$; $p = 0.19$) frequency of 119F resistant (31.5%) in non-oviposited females compared to the oviposited females (24.8%) (Table S1). Assessment of the odds ratio (OR) showed that the ability of L/L119-SS mosquitoes to lay eggs was higher compared to L119F-RS (OR = 2.06; confidence interval (CI) 95%: 1.45–2.92; $p < 0.0001$) and 119F/F-RR (OR = 2.93; CI 95%: 1.66–5.18; $p < 0.0001$) suggesting an association between the L119F mutation and reduced fecundity. Moreover, L119F-RS showed also a higher ability to lay eggs compared to L119F-RR (OR = 2.68; CI 95%: 1.51–4.77; $p = 0.0002$) (Table 1) suggesting an additional burden of the 119F allele on fecundity.

Table 1. Assessment of the association between L119F-GSTe2 genotypes and the ability of females to lay eggs. SS: homozygote susceptible; RR: homozygote resistant; RS: heterozygote; * significant difference $p < 0.05$.

Genotypes	L119F-GSTe2 and Oviposition	
	Odds Ratio	<i>p</i> -Value
SS vs. RR	2.93 (1.66–5.18)	0.0001 *
SS vs. RS	2.06 (1.45–2.92)	0.000001 *
RS vs. RR	2.68 (1.51–4.77)	0.0002 *

Furthermore, the mean number of eggs laid per female for 119F-RR was 65.8 (min = 12; max = 125). The mean was 95.7 with a clutch size ranging from 13 to 156 for L119F-RS while L119F-SS laid a mean number of 93.5 eggs per female with a clutch size ranging from 2 to 162 (Figure 1a). Comparison of the mean number of eggs produced per genotype showed that 119F-RR mosquitoes produced a slightly, and significantly, lower number of eggs compared to L119F-RS and L119F-SS ($p = 0.003$) (Figure 1c). Concerning the viability of eggs laid, the hatch rate was (65.8 ± 5.6) for 119F-RR, (66.0 ± 2.9) for L119F-RS and (62.9 ± 2.3) for L119F-SS mosquitoes (Figure 1b). The mean number of larvae was not different between genotypes ($p = 0.18$) as well as for the hatch rate ($0.000 < X^2 < 0.80$; $0.79 < p < 0.98$) (Figure 1c).

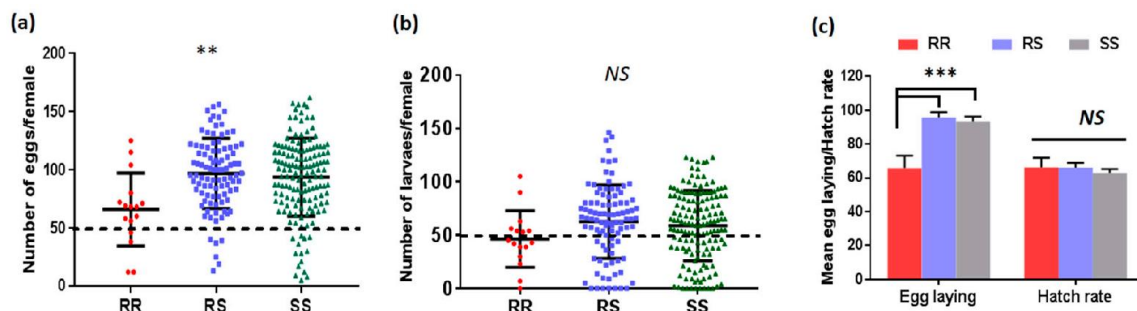


Figure 1. Fecundity and fertility of females with different genotypes at the L119F locus of the *GSTe2* gene: (A) Comparison of the number of eggs laid by field-collected female *Anopheles funestus* between the L119F-RR, L119F-RS and L119F-SS genotypes; (B) number of larvae produced by females from each genotype; (C) hatching rate between the three genotypes. Each dot represents a single egg-laying female. Median value with interquartile range is shown for each distribution. Dotted line indicates females for which at least 50 eggs or larvae were obtained. ** Difference between genotypes was significant ($p < 0.01$) in term of eggs laying by Kruskal–Wallis non-parametric test whereas the number of larvae produced and the hatch rate did not differed significantly. ***: significant difference at $p < 0.001$; NS: not significant.

3.4.2. Assessment of the Association between the L119F-GSTe2 Mutation and Larval Development

Egg-hatching occurred at 1–3 days (post-oviposition) and development time from the larvae to the pupae was 12.5 ± 4.5 days overall. Genotyping of 150 mosquitoes (50 per replicate) in each larval stage revealed that $4.9\% \pm 0.7\%$ of mosquitoes were 119F-RR mosquitoes represented in L1, $5.7\% \pm 0.02\%$ in L2, $6.3\% \pm 2.3\%$ in L3 and $5.6\% \pm 1.07\%$ in L4. L119F-RS mosquitoes were $34.8\% \pm 2.5\%$ of the mosquitoes in L1, $38.4\% \pm 1.2\%$ in L2, $33.8\% \pm 4.6\%$ in L3 and $35.6\% \pm 4.3\%$ in L4 and L119F-SS mosquitoes were $58.8\% \pm 6.5\%$ of the mosquitoes in L1, $51.2\% \pm 5.9\%$ in L2, $59.3\% \pm 4.9\%$ in L3 and $56.4\% \pm 5.4\%$ in L4. Comparison of genotype frequency from L1 to L4 larval stage showed no significant difference for 119F-RR ($X^2 < 0.27$; $p > 0.60$), L119F-RS ($X^2 < 0.30$; $p > 0.57$) and L119F-SS

mosquitoes ($X^2 < 1.21$; $p > 0.27$) (Figure 2a,b). Furthermore, there was no significant change in the allele frequency ($X^2 < 0.81$; $p > 0.36$) indicating that possessing the 119F resistant allele probably does not impact the larval development from L1 to L4 in this *An. funestus* population. Pupae were obtained from 9 days post-hatching (pupae D9) to 17 days (pupae D17) with most pupation (more than 75%) observed at 11 days post-hatching (pupae D11) (Figure 2d).

Assessment of the rate of pupae formation by comparing the frequency of the genotypes of the pupae obtained in D9, D11 and D13 showed that L119F-RS heterozygote mosquitoes developed significantly faster than homozygote resistant and homozygote susceptible mosquitoes ($X^2 = 11.052$; degree of freedom (df) = 4; $p = 0.02$) indicating a possible heterozygote advantage (Table S2; Figure 2c,d). Assessment of the OR for pupae formation further supported that L119F-RS developed significantly faster than L119F-RR (OR > 1.04; $p < 0.42$) and slightly faster than L119F-SS although not significant (OR > 1.38; $p < 0.08$). However, L119F-SS developed faster than 119F-RR (OR > 1.40; $p < 0.0001$) suggesting a potential fitness cost of the L119F-GSTe2 on the development of larvae (Table 2, Figure 2d).

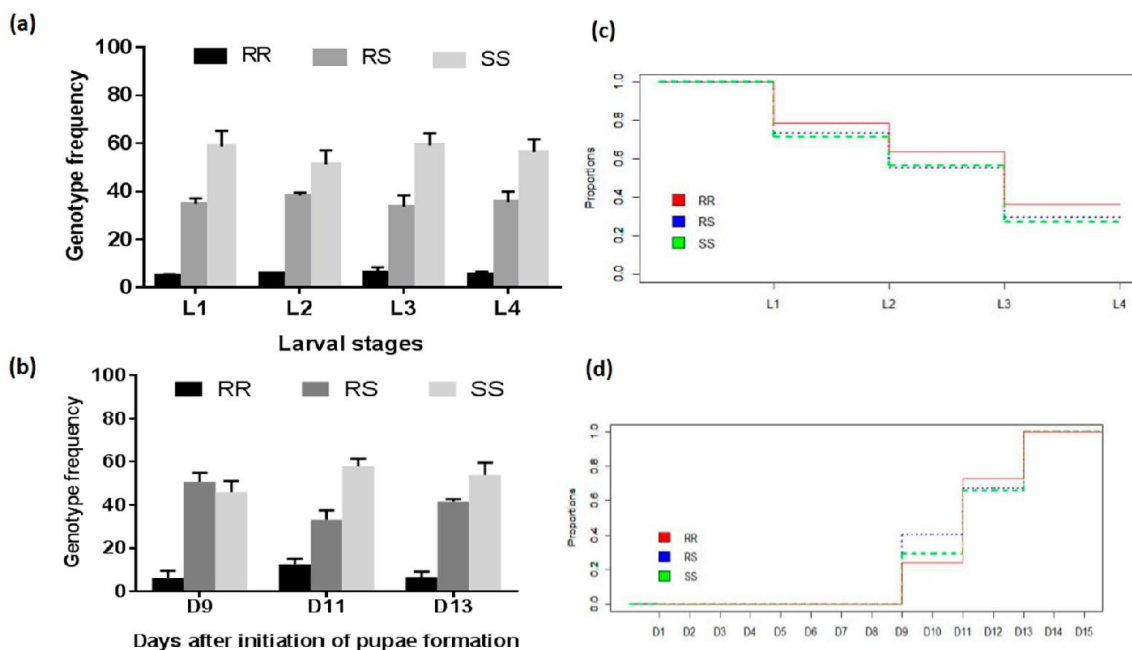


Figure 2. Distribution of the L119F-GSTe2 genotypes at different time-points of the development of immature stages. (a) Histogram of the variation in genotypes frequency during the development of larvae (L1, L2, L3, and L4 represent different larval stages) and pupae formation (b); (c) the proportion of larvae surviving at each developmental stage from hatching (D1) to formation of the pupae; (d) the proportion of pupae obtained in D9, D11 and D13 of development. Colored bars and lines indicate respectively 119F/F-RR, L119F-RS and L/L119-SS genotypes. Standard error ($n = 3$) are also indicated for the histograms.

Table 2. Association between L119F-GSTe2 genotypes and pupae formation. * significant difference

Genotypes	Pupae D9 vs. Pupae D11		Pupae D11 vs. Pupae D11	
	Odds Ratio	<i>p</i> -Value	Odds Ratio	<i>p</i> -Value
RS vs. RR	5.26 (2.24–12.34)	<0.0001 *	1.04 (0.73–1.49)	0.42
RS vs. SS	1.39 (0.89–2.17)	0.08	1.38 (0.98–1.87)	0.03 *
SS vs. RR	9.66 (4.17–22.40)	<0.0001*	1.40 (1.01–1.95)	0.02 *

3.4.3. Assessment of the Association between L119F-GSTe2 Mutation and Adult Longevity

The lifespan of adult female mosquitoes F_1 varied from 12 to 36 days for the three replicates. Comparison of the survival curve in term of adult mortality using a Log-rank (Mantel–Cox) test showed no difference between the three replicates ($X^2 = 0.2$; $p = 0.9$) (Figure 3a).

Fifty live mosquitoes were genotyped at D1, D10, D20 and D30 after the emergence of adults to assess the association between the L119F mutation and adult longevity. Comparison of genotypes frequency showed a decrease proportion of L119F-SS homozygote susceptible mosquitoes from D1 to D30 ($X^2 = 21.2$; $p = 0.0017$) (Figure 3b,d). Assessing the OR showed that mosquitoes with the 119F resistant allele lived longer compared to those with L119 susceptible allele (OR = 7.5; CI 95%: 1.04–21.3; $p < 0.001$), Table 3. This was supported by the variation in allele frequency after genotyping and sequencing (Figure 3e). In addition, mosquitoes with RR genotype had more chance to survive until D30 compared to RS (OR > 2.2; $p < 0.05$) and SS (OR > 2.1; $p < 0.05$) but no difference was observed between RS and SS. Evaluation of the expression level of *GSTe2* at the same time points showed also a significant level of expression of this gene in D30 (FC = 4.4 ± 2.7) than in D1 (FC = 2.5 ± 0.7), D10 (FC = 2.7 ± 0.8), D20 (FC = 2.8 ± 0.4) ($F = 8$; $df = 3$; $p = 0.008$) suggesting that mosquitoes expressing this gene live longer than those with lower expression (Figure 3c).

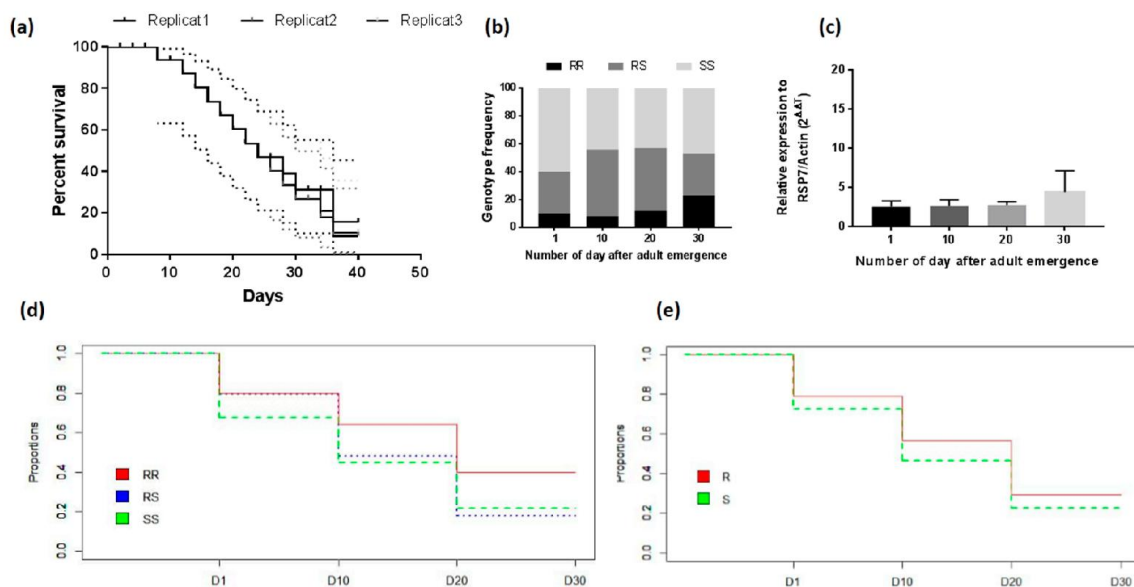


Figure 3. Influence of L119F-GSTe2 on the adult longevity of *An. funestus*. (a) Survival curve F_1 of adults from natural populations and maintained under laboratory conditions: Mean percentage of mortality and 95% confidence interval (CI) were presented; (b) distribution of L119F-GSTe2 genotypes at different time in the survived mosquitoes; (c) differential expression by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction of *GSTe2* genes in alive mosquitoes at different time points compared with the susceptible lab strain FANG. Error bars represent standard error of the mean; (d,e) Variation in the proportion of adults surviving at the different time points after the emergence into adult according to the L119F genotypes and alleles respectively.

Table 3. Association between L119F-GSTe2 genotypes and adult longevity.

Genotypes	D ₁ x D ₁₀		D ₁₀ x D ₂₀		D ₂₀ x D ₃₀	
	Odds Ratio	<i>p</i>	Odds Ratio	<i>p</i>	Odds Ratio	<i>p</i>
RR vs. RS	3.75 (1.21–11.29)	0.019	3.83 (1.56–9.41)	0.0023	2.2 (1.04–4.64)	0.050 ^S
RR vs. SS	7.5 (2.64–21.28)	0.000006	3.83 (1.56–9.41)	0.0059	2.1 (0.98–4.45)	0.13
RS vs. SS	1.30 (0.75–2.24)	0.41	1.04 (0.57–1.90)	1	1.61 (0.80–3.22)	0.22

3.4.4. Association between GSTe2 Polymorphism and Longevity

Genetic Diversity of the GSTe2

A total of 809 bp fragments of the full length of *GSTe2* were successfully sequenced in 48 mosquitoes from Mibellon (12 mosquitoes at each time point) but only 44 sequences were successfully analysed ($2n = 88$). The genetic diversity parameters of the full fragment of *GSTe2* sequences are given in Table 4 according to the different time point. Overall, 12 polymorphic sites (11 in the coding and one in the non-coding regions) defining 33 haplotypes were detected. Mosquitoes of D30 after the emergence of the adults showed a lower number of the polymorphic site (9) with a reduced haplotype diversity (hd; 10 haplotypes hd: 0.84). The overall nucleotide diversity was 0.004 with an average number of differences between nucleotides estimated at 3.21 showing no significant differences between the sequences examined ($p > 0.10$). However, at D30 the L119F mutation was detected at very high frequency compared to D1 and D10 where the mutant allele was present at low frequency (54% compared to 29% in D1, 24 in D10 and 50 in D20) ($X^2 = 23.53$ $p < 0.0001$), Figure 3d. This supports the assertion that the 119F resistant allele is associated with increased longevity in these field mosquitoes

Table 4. Genetic diversity parameters of *GSTe2* sequences according to the age of mosquitoes and the L119F genotypes.

	2n	S	h	hd	π	D	D*
D1	24	11	15	0.95	0.005	−0.11 ns	−0.96 ns
D10	24	10	11	0.79	0.003	−0.44 ns	0.97 ns
D20	16	11	14	0.98	0.006	0.21 ns	0.41 ns
D30	24	9	12	0.92	0.003	0.02 ns	0.28 ns
TOTAL	88	12	33	0.94	0.004	0.44 ns	1.55 ns

2n, number of sequences; D, Tajima's statistics; D, D* Fu and Li's statistics; h, number of haplotypes; hd, haplotype diversity; ns, not significant; π , nucleotide diversity; S, number of polymorphic sites.

3.4.5. Distribution of Haplotypes and Phylogeny

Analysis of the haplotype network of the *GSTe2* gene based on L119F alleles and adult longevity showed that there are five major haplotypes with a frequency $\geq 5\%$ (H1, H6, H8, H9 and H10) in this *An. funestus* field population (Figure 4a–c). Among the five major haplotypes, the ancestor haplotype (H6) belonged to the L119 susceptible allele and was shared between mosquitoes of D1, D20 and D30. The haplotype H1 with the highest frequency (14) belonged also to the susceptible allele and was common to D1, D10, and D30. H10 the second major haplotype was shared between mosquitoes of D1, D10, D20 and D30 and was specific to the 119F resistant allele. The H8 was specific to the L119 susceptible allele and the H9 was specific to the 119F resistant allele (Figure 4b,c). The analysis of the maximum likelihood phylogenetic tree between haplotypes identified did not reveal any haplotype clustering associated with a specific time point (Figure 4d). However, there was a trend of clustering according to the L119F mutation of the *GSTe2* gene (Figure 4e).

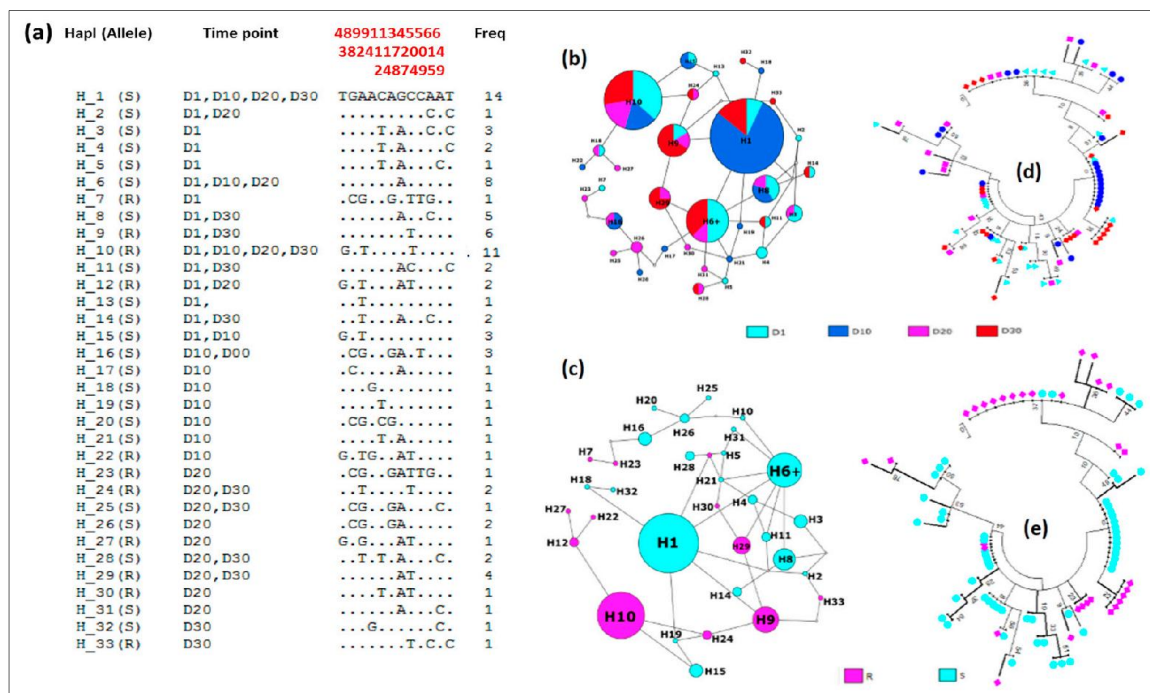


Figure 4. Genetic diversity parameters of *GSTe2* in *An. funestus* s.s. from Mibellon (Cameroon) in relation to the longevity of adult mosquitoes. (a–c) haplotype diversity in relation to the alleles at different time points; (d,e) phylogenetic trees (using a maximum likelihood method) between mosquitoes at the different time point after the emergence of F1 adult with respect to the alleles.

4. Discussion

Fitness costs incurred in the life-traits of resistant malaria mosquitoes through metabolic resistance have so far been difficult to establish due to lack of suitable molecular markers. Using the recent L119F-GSTe2 diagnostic tool for glutathione *S*-transferase metabolism of pyrethroids/DDT resistance in the resistant African malaria vector *An. funestus*, we showed in this study using mosquitoes collected in the same location that metabolic resistance could incur fitness costs in resistant mosquitoes but also provide a fitness advantage to resistant mosquitoes; although further work is needed to assess any possible effects associated with closely linked genes. This complex pattern offers a hope of managing such resistance if suitable resistance management strategies are implemented, but on the other hand it highlights the possible increase in malaria transmission risk as GSTe2-resistant adult mosquitoes live longer.

4.1. Association between L119F Resistance Marker and Adult Longevity

Longevity of adult vectors is a primary life trait for which a change due to fitness cost could impact the disease transmission risk as the vectors have to live sufficiently longer to be able to ingest the parasite, and harbor it while it develops until the infective stage [45]. Increased longevity was observed in this study in females possessing the 119F resistant allele. Such increased longevity is likely to increase the vectorial capacity of 119F-GSTe2 mosquitoes as the extrinsic incubation period of *Plasmodium* parasites is more likely to be completed and these females could take further blood meals with the infective sporozoite stage. However, such decreased mortality is not generally seen for other resistance markers in mosquitoes, such as the *kdr* in *Aedes aegypti* which instead was associated with decreased longevity [9]. A similarly reduced longevity is observed for the *RDL* dieldrin resistance marker in some strains of the malaria vectors *An. gambiae* and *Anopheles stephensi* resistant [7]. Increased longevity in mosquitoes with 119F resistant allele could be associated with the implication of *GSTe2* in oxidative stress. Previously, the *GST* resistance mechanism was shown to protect tissues from

oxidative damage in plant hoppers and increase longevity in fruit flies [46] which can be the case for *GSTe2* in this study. In fact, an enhanced ability of the insecticide resistant insects to tolerate oxidative stress has also been implied by the protective role of glutathione *S*-transferases [47]. A study of the *GST* expression in the Hessian fly also found that some *GSTs* could provide protection against toxic oxygen species generated endogenously during development [48]. This could be an explanation of the increased longevity in resistant mosquitoes due to *GSTe2* noticed in this study. This increased longevity of resistant 119F-*GTe2* mosquitoes could lead to an increase in malaria transmission in areas where this gene is over-expressed and with a high frequency of L119F-*GTe2* mutation. This could explain recent results showing an elevated *Plasmodium* infection in *An. funestus* populations with the high frequency of the 119F-*GTe2* allele such as in Benin [49], Cameroon [28,50] and Congo [51]. The increased longevity of resistant mosquitoes shows that insecticide could negatively impact the effectiveness of vector control and increase malaria transmission as recently shown for bed nets in Tanzania [52].

4.2. Association between L119F Resistance Marker and Larvae/Pupae Formation

Developmental time of the larvae is another key aspect of fitness cost in mosquito populations [53]. This is a very important aspect since, in the presence of natural predators or parasites, any delay in development has the potential to reduce the survival rate of larvae [54]. Here, we found a heterozygote advantage in term of developmental time compared to homozygote resistant and susceptible mosquitoes for the L119F-*GTe2* marker. Such heterozygote advantage was observed also in *kdr* target site resistance although for mating competitiveness in *An. gambiae* from Burkina-Faso [5]. Homozygous susceptible mosquitoes developed faster than homozygous-resistant showing a possible fitness cost of L119F-*GTe2* on the larval developmental time. It is possible that despite the fact that all three genotypes were reared in the same container, larvae with 119F resistant allele were less skilled to compete with those with L119F susceptible allele for food and space and the latter ended up developing faster. It is possible, as observed previously in a carboxylesterase-mediated metabolic resistant *Culex pipiens* [55], that over-expression of *GSTe2* is associated with a decreased locomotive performance limiting the ability of resistant mosquitoes to move to feed. This could explain the longer developmental time of resistant RR compared to susceptible SS mosquitoes. Brito et al. observed also that the resistant strain Rock-*kdr* took more time to develop when competing with the susceptible strain Rock [8]. Such fitness suggests that resistance management strategies such as insecticide rotation could help reverse the resistance if implemented early as homozygote resistant mosquitoes are more likely to be outcompeted by susceptible homozygous but also more exposed to predators in natural breeding sites.

4.3. Association between L119F Resistance Marker and Fecundity/Fertility

In this study, the fecundity rate was reduced for 119F-RR homozygous resistant mosquitoes compared to the heterozygotes and the susceptible genotype but no difference in the number of larvae per female was observed. This lower fecundity rate highlights another fitness cost associated with the 119F insecticide resistance allele. Reduction of the ability of resistant mosquitoes to lay eggs was also noted in *Ae. aegypti* [9]. In the same line, Brito et al. noticed that although a load of ingested blood did not differ between Rock and Rock-*kdr* *Ae. aegypti* females, and the latter displayed a reduction in the rate of insemination and the number of eggs laid [8]. Several factors could contribute to the lower fecundity in resistant females: either a lower fecundity rate or, a lower blood meal size of resistant mosquitoes. Alternatively, it could be due to decreased egg-laying ability. In nature, resistant females would be at a great fitness disadvantage if they spend less time searching for hosts or good oviposition sites or if they are less responsive to predators. In this study, lesser ability of resistant mosquitoes to lay eggs could be linked to lower insemination rates as observed for dieldrin resistant *An. gambiae* and *An. stephensi* females [7]. There are numerous reports describing the reduction in the number of eggs laid by insecticide resistant strains derived from controlled selection experiments.

This was the case of fenvalerate resistant *Spodoptera exigua* [56], deltamethrin and diflubenzuron resistant *Cydia pomonella* [57]. In this study, reduced larval hatching rate was not observed as reported by Mebrahtu et al. [58] in *Ae. aegypti* derived from permethrin-resistant specimens. As observed for the development of larvae, a fitness cost observed in term of fecundity could improve the success of potential resistance management strategies particularly if implemented before the frequency of L119F-GSTe2 allele become too high or fixed in a population.

5. Conclusions

This study has shown that L119F-GSTe2 mediated metabolic resistance to pyrethroids/DDT likely is associated with negative effects on some life-traits of *An. funestus* field mosquitoes. This supports the assumption that insecticide resistance is associated with a fitness cost showing that resistance management strategies such as insecticide rotation could help reverse resistance if implemented early. However, the increased longevity observed in resistant mosquitoes represents a serious threat for disease control, as increased longevity of 119F/F resistant mosquitoes could lead to an increased level of malaria transmission in areas where this resistance mechanism is predominant as suggested by recent studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/9/12/645/s1>, Table S1: Distribution of L119F-GSTe2 genotypes between oviposited and non-oviposited females; Table S2: Change in the distribution of L119F-GSTe2 genotypes and pupae formation.

Author Contributions: C.S.W. conceived and designed the study; M.T. carried out the sample collection; M.T., D.D., W.T. reared and maintained the strain in the insectary; M.T. and H.I. performed the molecular analyses; M.T., P.S.T., J.M.R. and C.S.W. analyzed the data; M.T. and C.S.W. wrote the manuscript with contributions from F.N. and J.M.R. All authors approved the manuscript.

Funding: This study was funded by the Wellcome Trust (Wellcome senior 101893/Z/13/Z) awarded to C.S.W.

Acknowledgments: The authors thank Michael Kusimo for helpful comments on this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. World Health Organization. *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM)*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012.
2. Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.E.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**, *526*, 207. [CrossRef] [PubMed]
3. Zaim, M.; Aitio, A.; Nakashima, N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med. Vet. Entomol.* **2000**, *14*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
4. Berticat, C.; Boquien, G.; Raymond, M.; Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet. Res.* **2002**, *79*, 41–47. [CrossRef] [PubMed]
5. Platt, N.; Kwiatkowska, R.M.; Irving, H.; Diabate, A.; Dabire, R.; Wondji, C.S. Target-site resistance mutations (*kdr* and *RDL*), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity* **2015**, *115*, 243–252. [CrossRef]
6. Rowland, M. Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Med. Vet. Entomol.* **1991**, *5*, 193–206. [CrossRef] [PubMed]
7. Rowland, M. Activity and mating competitiveness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Med. Vet. Entomol.* **1991**, *5*, 207–222. [CrossRef] [PubMed]
8. Brito, L.P.; Linss, J.G.; Lima-Camara, T.N.; Belinato, T.A.; Peixoto, A.A.; Lima, J.B.; Valle, D.; Martins, A.J. Assessing the effects of *Aedes aegypti kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60878. [CrossRef] [PubMed]

2- TCHOUAKUI, M., CHIANG, M.-C., NDO, C., KUICHEU, C. K., AMVONGO-ADJIA, N., WONDJI, M. J., TCHOUPPO, M., KUSIMO, M. O., RIVERON, J. M. & WONDJI, C. S. 2019. A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher *Plasmodium* infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Scientific reports*, 9, 5772.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher *Plasmodium* infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*

Magellan Tchouakui^{1,2,3}, Mu-Chun Chiang⁴, Cyrille Ndo^{1,2,5}, Carine K. Kuicheu^{1,2,3}, Nathalie Amvongo-Adja^{1,3,6}, Murielle J. Wondji^{1,2,4}, Micareme Tchoupo^{1,2}, Michael O. Kusimo², Jacob M. Riveron^{1,2,4} & Charles S. Wondji^{1,2,4}

Metabolic resistance to insecticides is threatening malaria control in Africa. However, the extent to which it impacts malaria transmission remains unclear. Here, we investigated the association between a marker of glutathione S-transferase mediated metabolic resistance and *Plasmodium* infection in field population of *Anopheles funestus* s.s. in comparison to the A296S-RDL target site mutation. The 119F-GSTe2 resistant allele was present in southern (Obout) (56%) and central (Mibellon) (25%) regions of Cameroon whereas the 296S-RDL resistant allele was detected at 98.5% and 15% respectively. The whole mosquito *Plasmodium* and sporozoite infection rates were 57% and 14.8% respectively in Obout (n = 508) and 19.7% and 5% in Mibellon (n = 360). No association was found between L119F-GSTe2 genotypes and whole mosquito infection status. However, when analyzing oocyst and sporozoite infection rates separately, the resistant homozygote 119F/F genotype was significantly more associated with *Plasmodium* infection in Obout than both heterozygote (OR = 2.5; P = 0.012) and homozygote susceptible (L/L119) genotypes (OR = 2.10; P = 0.013). In contrast, homozygote RDL susceptible mosquitoes (A/A296) were associated more frequently with *Plasmodium* infection than other genotypes (OR = 4; P = 0.03). No additive interaction was found between L119F and A296S. Sequencing of the *GSTe2* gene showed no association between the polymorphism of this gene and *Plasmodium* infection. Glutathione S-transferase metabolic resistance is potentially increasing the vectorial capacity of resistant *An. funestus* mosquitoes. This could result in a possible exacerbation of malaria transmission in areas of high GSTe2-based metabolic resistance to insecticides.

Malaria control in Africa mainly relies on insecticide-based interventions such as long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS)¹. A significant decrease in the incidence of malaria was reported between 2000 and 2015, with about 70% of this success credited to insecticide-based vector control tools¹. However, the emergence of insecticide resistance in vector populations resulting from widespread use of insecticides in public health, combined with pesticide use in agriculture, is a major problem that is jeopardizing the

¹Research Unit LSTM/OCEAC, P.O. BOX 288, Yaoundé, Cameroon. ²Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), P.O. BOX 13591, Yaoundé, Cameroon. ³Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon. ⁴Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, L35QA, Liverpool, UK. ⁵University of Douala, P.O. Box 2701, Douala, Cameroon. ⁶Centre for Medical Research, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), P.O. Box 13033, Yaoundé, Cameroon. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T. (email: mtchouakui@yahoo.fr) or C.S.W. (email: charles.wondji@lstmed.ac.uk)

control of malaria². The two main resistance mechanisms are target-site resistance (e.g. knockdown resistance, *kdr*) and metabolic resistance through over-expression of detoxification genes (e.g. cytochrome P450s, glutathione S-transferases and esterases)³. Insecticide resistance genes are often associated with pleiotropic effects on mosquito life-history traits^{4,5} which can modify their capacity to transmit parasites to different hosts^{4,6}. The fitness cost of resistant alleles could affect various vector life-history traits, such as adult longevity, biting behavior, and vector competence⁷, which are important components of the vectorial capacity to transmit pathogens. However, despite the widespread distribution of resistance, its impact on malaria transmission remains unclear in many malaria vectors including *Anopheles funestus*. This is particularly true for metabolic resistance mechanisms since no molecular markers were previously available to assess such an impact, in contrast to target-site resistance (such as knockdown resistance *kdr*) for which DNA-based diagnostic tools have been available for many years⁸.

A better understanding of resistance mechanisms including metabolic resistance and, more importantly, their impact on vector life traits and disease transmission, is essential to design successful resistance management strategies⁹. A decrease in the ability of resistant mosquitoes to transmit malaria may mean insecticide resistance is not detrimentally impeding the control of this disease⁷. Conversely, if insecticide resistance increased the ability of resistant mosquitoes to infect humans, this would lead to increased malaria transmission. Only a few studies mostly, in *An. gambiae* s.s., have investigated the impact of resistance on vectorial capacity^{4,6,10,11}. For example, the study of Kabula *et al.* (2016) in Tanzania based on the target-site resistance *kdr* marker¹¹, showed that the infection of field populations of *An. gambiae* s.s. by *Plasmodium* parasites was significantly associated with *vgsc-1014* point mutations. Insecticide resistance was recently shown to affect the vector competence of this same mosquito species for *P. falciparum* field isolates as a higher prevalence of infection was observed for mutations associated with insecticide resistance¹⁰. The impact of resistance on vectorial capacity has yet to be examined for metabolic resistance which is the most common resistance mechanism in mosquitoes. Metabolic resistance has consistently been reported to be the main driver of pyrethroids and DDT resistance in the malaria vector *An. funestus*. No *kdr* mutation has been detected so far in this species¹² despite the widespread report of insecticide resistance in *An. funestus* populations across Africa.

Indeed, pyrethroid resistance has been reported in various *An. funestus* populations including southern [Mozambique^{13,14}, Malawi^{15,16}], eastern [Uganda and Kenya^{17,18} and Tanzania¹⁹], central [Cameroon^{20,21}], and western Africa [Benin^{22,23}, Ghana^{24,25}, Senegal²⁶ and Nigeria²³]. Noticeably, resistance to pyrethroids and DDT in these populations is consistently conferred by detoxification enzymes including glutathione S-transferases (GSTs) and cytochrome P450s. The predominance of metabolic resistance in this species makes it suitable to investigate the impact of metabolic resistance on malaria transmission. The detection of a single amino acid change (L119F) in the glutathione S-transferase epsilon 2 (GSTe2) gene conferring DDT/pyrethroid resistance in *An. funestus*²⁷, further offers the opportunity to assess this impact. In addition, the presence of target site mutations in *An. funestus* such as the A296S-RDL associated with dieldrin resistance²⁰ and N485I-Ace1 mutation associated with bendiocarb resistance²⁸ also allows to compare the effect of metabolic resistance to that caused by target-site resistance on vectorial capacity of this vector.

Therefore, to assess the potential impact of metabolic resistance on malaria transmission, we investigated the association between the L119F-GSTe2 metabolic resistance marker and the natural infection of *Plasmodium* parasites in two pyrethroid and DDT resistant *An. funestus* populations from Cameroon. We established that the L119F-GSTe2 resistance allele is significantly associated with *Plasmodium* infection in resistant mosquitoes.

Results

Field collection and mosquito species identification. One thousand blood-fed female mosquitoes were collected in Obout and 1,147 in Mibellon after a week of collection in each site and in at least ten houses randomly selected in each village. Molecular identification of mosquitoes collected in both localities revealed that 95% of the mosquitoes belonged to the *An. funestus* group. The remaining 5% of mosquitoes were from *An. gambiae* species complex. Nearly all the *An. funestus* mosquitoes belonged to *An. funestus* s.s. as only one mosquito belonging to another species of the *An. funestus* group (*An. leesoni*) was detected in Mibellon.

Infection rate of *An. funestus* by *Plasmodium* parasites. In Obout, a total of 508 females (whole mosquitoes) randomly selected from the field collected individuals were tested for *Plasmodium* infection. The overall *Plasmodium* infection rate was very high in this locality with a total prevalence of 57.1% (Fig. 1a). Among the mosquitoes tested, 23% (119/508) were infected with *P. falciparum* (falcip+), 19% (95/508) were infected with *P. ovale/vivax/malariae* (OVM+), while 14.7% (76/508) were co-infected with both falcip+ and OVM+ (Table 1). In addition, the head plus thorax and abdomen were analyzed separately in 81 field-collected female mosquitoes to assess the proportion of mosquitoes harboring the infective stage of the parasite (sporozoite) and those having the oocysts. This is because sporozoites are predominantly present in the salivary glands of mosquitoes. TaqMan assay revealed a sporozoite infection rate of 14.8% (12/81) including 9.9% (8/81) falcip+, 2.5% (2/81) falcip+/OVM+ and 2.5% (2/81) OVM+. Oocysts were detected in 30.8% (25/81) mosquitoes including 19.7% (16/81) falcip+, 3.7% (3/81) falcip+/OVM+ and 7.4% (6/81) OVM+. The nested PCR performed on all the infected mosquitoes confirmed all the 16 falcip+ by Taqman (Figure S1a) whereas the three falcip+/OVM+ mosquitoes were co-infected with *P. falciparum* and *P. malariae*. Out of 18 OVM+ by Taqman, 14 were infected with *P. malariae* (Figure S1b) and the four remaining were not confirmed²⁹. This observation indicates that in this locality, *P. falciparum*, and *P. malariae* are in circulation.

In Mibellon, out of the 360 whole mosquitoes tested (randomly selected from the total mosquitoes collected), 19.7% (71/360) were infected with *Plasmodium* parasites including 10.8% (39/360) falcip+, 4.2% (15/360) OVM+ and 4.7% (17/360) co-infection falcip+/OVM+ (Fig. 1b). Among the 60 mosquitoes dissected for head/thorax and abdomen, 20% (12/60) were oocyst-positive and 5% (3/60) sporozoite-positive with 3.3% (2/60) falcip+, 0% (0/60) falcip+/OVM+ and 1.7% (1/60) OVM+. The nested PCR validation of the TaqMan assay for

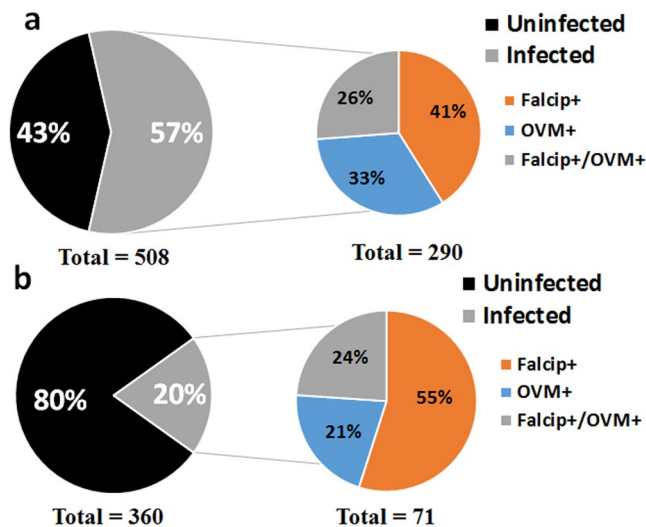


Figure 1. *Plasmodium* infection pattern in Obout (a) and Mibellon (b) falcip+, infection by *Plasmodium falciparum*; falcip+/OVM+, Co infection by *Plasmodium falciparum* and *P. ovale/vivax/malariae*; OVM+, infection by *P. ovale/vivax/malariae*.

Localities	N	<i>Plasmodium</i> infection			
		Falcip+	Falcip+/OVM+	OVM+	Total infection
Obout	508	119 (23%) [20–27%]	76 (15%) [12–18%]	95 (19%) [15–22%]	290 (57.1%) [52.7–61.3%]
Mibellon	360	39 (11%) [8–14%]	17 (5%) [3–7%]	15 (4%) [2–7%]	71 (19.7%) [15.9–24.1%]

Table 1. Status of infection by *Plasmodium* parasites in whole mosquitoes. Abbreviations: N, total number of mosquitoes tested; Falcip+, infection by *Plasmodium falciparum*; Falcip+/OVM+, Co-infection by *P. falciparum* and *P. ovale/vivax/malariae*; OVM+, infection by *P. ovale/vivax/malariae*.

	phenotype	N	L119F GSTe2 genotypes			Statistic test	p value
			RR	RS	SS		
Obout	Infected	89	30	42	17	$\chi^2 = 0.34$	0.82
	non infected	85	27	42	16		
	% infection		52.6%	50%	51.5%		
Mibellon	Infected	41	2	18	21	$\chi^2 = 0.11$	0.94
	non infected	143	8	59	76		
	% infection		20%	23.3%	21.6%		

Table 2. Distribution of L119F-GSTe2 genotypes according to *plasmodium* infection. N, total number of mosquitoes successfully genotyped; RR, homozygous resistant; RS, heterozygous; SS, homozygous susceptible.

oocyst positive mosquitoes confirmed all the six falcip+ whereas the two co-infected (falcip+/OVM+) were confirmed as *P. falciparum* and *P. malariae*-positive. From the four OVM-positive by Taqman assay, two were infected with *P. ovale* and two with *P. malariae* showing that *P. falciparum*, *P. ovale* (Figure S1c) and *P. malariae* are all present in Mibellon.

In both locations, a significant difference was found between mosquitoes harboring the oocyst stage of the parasite and those with the infective sporozoite stage ($\chi^2 = 5.82$; $P = 0.01$ in Obout and $\chi^2 = 6.12$; $P = 0.01$ in Mibellon).

Association between L119F-GSTe2 mutation and total *Plasmodium* infection. In total, 174 whole mosquitoes (infected and uninfected randomly selected from the 508 tested above) from Obout were genotyped for the L119F-GSTe2 mutation (Table 2). All genotypes were successfully detected and later validated by direct sequencing, supporting the robustness of the new designed Allele Specific-PCR assay (Fig. 2a,b). The 119F-GSTe2 resistant allele was found at a frequency of 56.8% when combining both infected and uninfected mosquitoes. For infected mosquitoes, 33.7% were 119F/F homozygous resistant, 47.2% L119F-RS heterozygote, and 19.1% L/L119 homozygote susceptible (Fig. 3a). A similar distribution of the three genotypes was observed

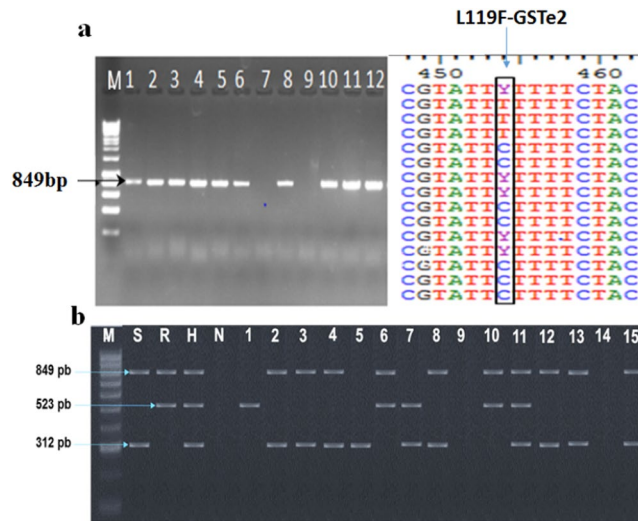


Figure 2. Design of a new AS-PCR for genotyping the L119F-GSTe2 mutation. (a) Amplification by PCR of *GSTe2* gene in *An. funestus* s.s. and an overview of the polymorphism of the *GSTe2* gene at the L119F point mutation where Y represents the heterozygote genotype C/T. (b) Agarose gel of AS-PCR to detect the L119F *gste2* mutation in *An. funestus* s.s. Top band 849 bp, fragment common of all genotypes; the middle (523 bp) and the bottom (312 bp), resistant and susceptible mosquitoes respectively; heterozygote mosquitoes, 523 bp and the bottom 312 bp fragments. M: Molecular ladder 100 bp; positive controls (S: homozygous susceptible, R: homozygous resistant and H: heterozygote); N: negative control; 1–15: samples genotyped (1, 6, 10: homozygous resistant; 7, 11: heterozygote; 2–5, 8, 12, 13, 15: homozygous susceptible; 9, 14: no amplification).

for uninfected mosquitoes ($\chi^2 = 0.34$; $P = 0.82$) with 31.7% for 119F/F, 49.4% for L119F-RS and 18.8% for L/L119 susceptible genotype. The lack of significant correlation between L119F-GSTe2 genotypes and whole mosquito *Plasmodium* infection was further supported by odds-ratio estimates (Table 2).

In Mibellon, 184 whole mosquitoes randomly selected out of the 360 field-collected females tested above were successfully genotyped. The overall frequency of 119F-GSTe2 resistant allele was 26.3% in both groups of mosquitoes (infected and uninfected). No difference was found in the distribution of the L119F-GSTe2 genotypes between infected and uninfected mosquitoes ($\chi^2 = 0.1$ $P = 0.95$) (Fig. 3b) (Table 2).

Association between L119F-GSTe2 and oocyst and sporozoite infection rates. In Obout, the distribution of L119F-GSTe2 genotypes in mosquitoes found positive for oocysts by TaqMan was as follows: 28% (7/25) homozygous resistant (119F/F), 40% (10/25) heterozygotes (L119F-RS) and 32% (8/25) homozygous susceptible (L/L119F) (Fig. 3c). No significant difference was observed in the distribution of L119F-GSTe2 genotypes between infected and uninfected mosquitoes ($\chi^2 = 3.58$ $P = 0.17$) (Table 3). At the sporozoite stage, 50% (6/12) of infected mosquitoes were homozygous resistant, 33% (4/12) were heterozygotes and 17% (2/12) were homozygous susceptible (Fig. 3d) (Table 3). Contrary to the oocyst stage, a significant difference was observed in the distribution of L119F-GSTe2 genotypes (using the proportions) between infected and uninfected mosquitoes ($\chi^2 = 9.79$ $P = 0.007$). Assessing the odds-ratio between sporozoite infected and uninfected mosquitoes showed that, homozygous resistant mosquitoes were significantly more likely to be infected with sporozoites compared to both heterozygote (OR = 2.10; IC 95%: 1.11–3.97; $P = 0.013$) and homozygous susceptible (OR = 2.46; IC 95%: 1.15–5.26; $P = 0.012$) mosquitoes. There was no difference between heterozygote and susceptible mosquitoes (OR = 1.17; $P = 0.41$) (Table 4).

In Mibellon, the 20% (12/60) of mosquitoes positive for oocysts were comprised of 8.3% (1/12) 119F/F homozygous resistant, 58.3% (7/12) L119F-RS heterozygotes and 33.3% (4/12) L/L119 homozygous susceptible (Fig. 3e). A significant difference was observed in the distribution of L119F-GSTe2 genotypes between infected and uninfected mosquitoes ($\chi^2 = 13.05$ $P = 0.001$) with L119F-RS heterozygote mosquitoes the most often infected (Table 3). Assessing the odd ratio showed no difference between the two groups (Table 4). At the sporozoite stage, only 5% (3/60) of mosquitoes were sporozoite positive and all were genotyped to be homozygous susceptible (Fig. 3f) (Table 3). No further comparisons were done because of low sample size.

Association between A296S-RDL mutation and *Plasmodium* infection. The RDL mutation was genotyped using gDNA extracted from 100 and 142 whole female mosquitoes from Obout and Mibellon respectively. In Obout, all mosquitoes carried the resistant allele with a very high frequency of homozygous resistant 296 S/S genotypes (97%). In contrast, in Mibellon, only 22 (15.5%) of the mosquitoes examined had the A296S-RDL mutation including 4 (2.8%) 296S/S homozygous resistant, 18 (12.7%) A296S-RS heterozygotes and 120 homozygote susceptible (Fig. 4a). In addition, the A/A296 homozygous susceptible were present in a higher proportion among the infected mosquitoes (90%) compared to uninfected mosquitoes (79%). Assessment of the odd ratio demonstrated that mosquitoes that were A/A296 homozygous susceptible were more likely to be *Plasmodium* positive compared to other genotypes (OR = 4; IC 95%: 1.24–12.86; $P = 0.03$) (Table S1).

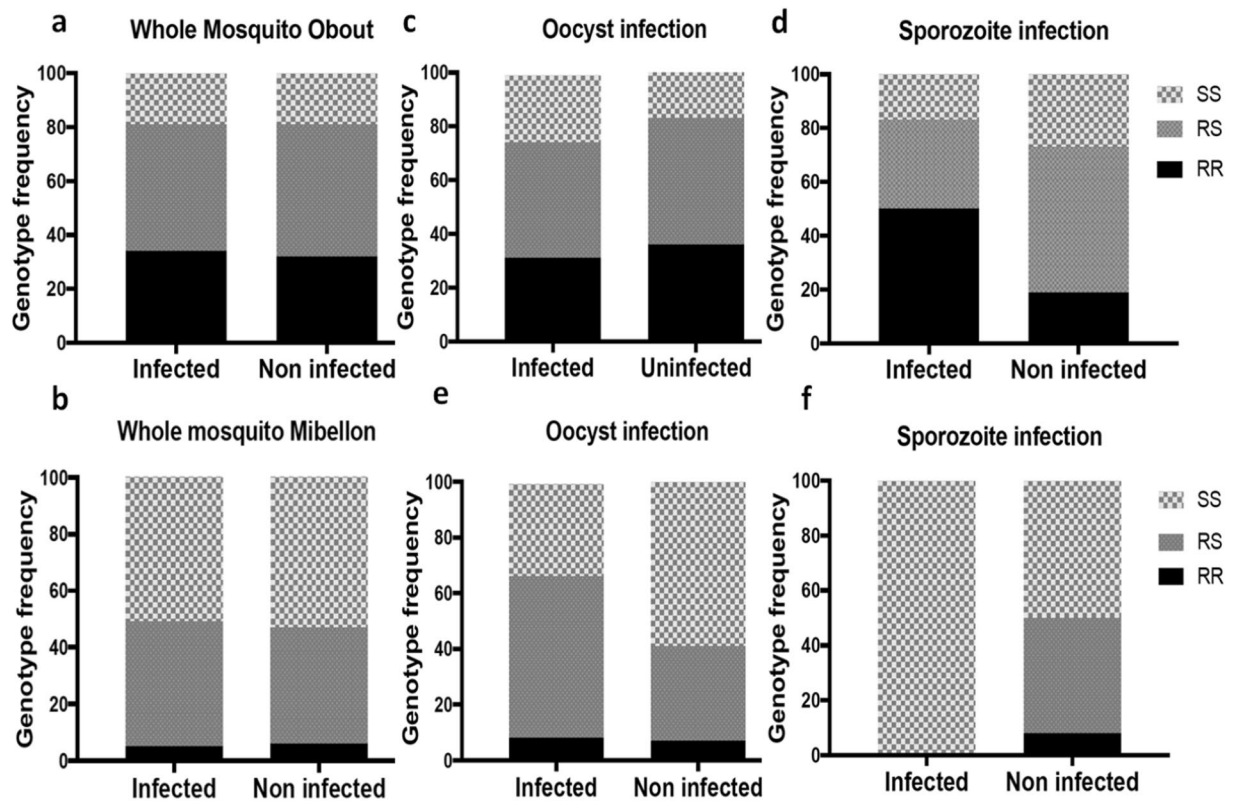


Figure 3. Impact of the GSTe2 glutathione S-transferase metabolic resistance (L119F-GSTe2) on the infection and transmission patterns of *Plasmodium* parasites in natural *Anopheles funestus* s.s. populations (a,c,d); are whole mosquitoes, oocyst and sporozoite infection respectively in southern Cameroon (Obout); (b,e,f); whole mosquitoes, oocyst and sporozoite infection respectively in Central (Mibellon).

	Phenotype	N	RR	RS	SS	Statistic test	P value
Obout							
Oocyst	Infected	25	7	10	8	$\chi^2 = 3.58$	0.17
	Uninfected	56	19	23	14		
% infection			29.9%	30.3%	36%		
Sporozoite	Infected	12	6	4	2	$\chi^2 = 9.79$	0.007*
	non infected	151	20	28	17		
% infection			23.1%	12.5%	10.5%		
Mibellon							
Oocyst	Infected	11	1	7	4	$\chi^2 = 13.05$	0.001*
	non infected	14	3	14	24		
% infection			10%	38.1%	18.75%		
Sporozoite	Infected	3	0	0	3	NA	NA
	non infected	49	4	21	25		

Table 3. Distribution of L119F-GSTe2 genotypes between mosquitoes infected with *Plasmodium* and the prevalence of infection at both oocyst and sporozoite stage in Obout and Mibellon (Fisher Exact probability test based on the proportions).

Combined impact of L119F-GSTe2 and A296S-RDL mutations on *Plasmodium* infection. In total, 46 samples of each batch (infected and uninfected mosquitoes) were used to assess the combined impact of the two resistance mechanisms on *Plasmodium* infection in in *An. funestus* mosquitoes (Fig. 4b). The most prevalent combinations between both groups were (SS/SS), (RR/SS), (RS/SS) for *GSTe2/RDL*. The SS/RR and RR/RR combinations were present only among the infected mosquitoes whereas the RR/RS and RS/RS combinations were observed only among the uninfected mosquitoes. Nevertheless, no statistically significant differences were detected ($\chi^2 = 10.5$; $P = 0.161$). A significant difference was observed when comparing the odds ratio at the sporozoite stage between RR/RR vs SS/RR (OR = INF; $P < 0.0001$) and RS/RR vs SS/RR (OR = INF; $P = 0.003$)

Genotypes	Whole mosquitoes		Oocyst infection		Sporozoite infection	
	Odds ratio	P-value	Odds ratio	P-value	Odds ratio	P-value
Obout						
RR vs RS	1.11 (0.59–2.07)	0.43	0.7 (0.41–1.52)	0.30	2.10 (1.11–3.97)	0.01*
RR vs SS	1.06 (0.48–2.36)	0.52	0.64 (0.18–2.19)	0.34	2.46 (1.15–5.26)	0.01*
RS vs SS	0.96 (0.45–2.03)	0.53	0.62 (0.31–1.25)	0.12	1.17 (0.54–2.51)	0.41
Mibellon						
RR vs RS	0.77 (0.22–2.740)	0.47	0.67 (0.22–2.01)	0.33	NA	—
RR vs SS	0.86 (0.25–3.01)	0.54	1.92 (0.66–5.95)	0.17	NA	—
RS vs SS	1.11 (0.63–1.92)	0.41	2.96 (1.62–3.58)	0.0002*	NA	—

Table 4. Assessment of the association of different L119F-GSTe2 genotypes with *Plasmodium* infection status in Obout and Mibellon.

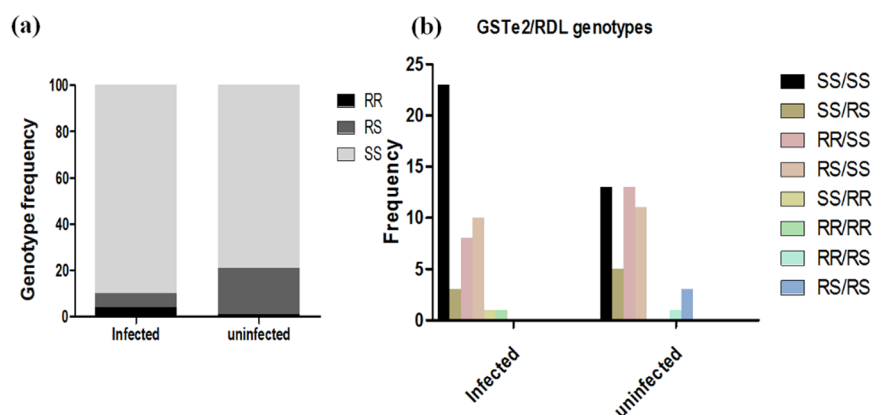


Figure 4. Impact of A296S-RDL target-site mutation on *Plasmodium* infection: distribution of genotype (a) RDL and (b) combinations GSTe2 /RDL)) between infected and uninfected whole mosquitoes.

indicating that double homozygote mosquitoes (RR/RR) were more likely to be infected. However, no significant difference was observed at oocyst stage ($P \geq 0.16$) (Table S2). This supports the role of the L119F-GSTe2 allele in the ability of the mosquitoes to develop the parasite until the infective stage.

Association between GSTe2 polymorphism and *Plasmodium* infection. *Genetic diversity of GSTe2.* The full length of the *GSTe2* gene (881 bp) was successfully sequenced in 26 whole mosquitoes from Mibellon including 11 infected and 15 uninfected (Fig. 5a). The genetic diversity parameters are given in Table S3, according to the status of infection and genotypes. Overall, 23 polymorphic sites defining 28 haplotypes were detected corresponding to the haplotype diversity of 0.96. Heterozygous and uninfected mosquitoes showed at lower number of polymorphic sites (3) with only 3 haplotypes (hd: 0.83). The overall nucleotide diversity was 0.005 with an average number of differences between nucleotides estimated at 4.19 showing less differences between the sequences examined. In addition, negative values were obtained for Fu and Li Tajima and F^* tests in many cases.

Distribution of haplotypes and phylogeny. Analysis of the haplotype network of the *GSTe2* gene based on L119F genotypes of the infection status shows that there are five major haplotypes (H1, H2, H3, H4 and H5) responsible for the differentiation of haplotypes in this *An. funestus* field population. The ancestral haplotype (H1) as well as the haplotypes (H2, H3 and H4) were identified in mosquitoes with 119 Resistant allele. However, haplotypes H1 and H2 were found only in uninfected mosquitoes whereas haplotypes H3 and H4 were present in both infected and uninfected mosquitoes (Fig. 5b,c). Moreover, the H5 haplotype was found to be specific for mosquitoes with the L119 susceptible allele for both infected and uninfected individuals (Fig. 5d,e). Similarly, analysis of phylogeny between the haplotypes identified did not reveal any haplotype groups associated with a specific infection status. However, there was a global clustering according to the alleles associated with the L119F mutation of the *GSTe2* gene (Table S3). This suggests that there is no association between the polymorphism of the *GSTe2* gene and infection by *Plasmodium* parasite.

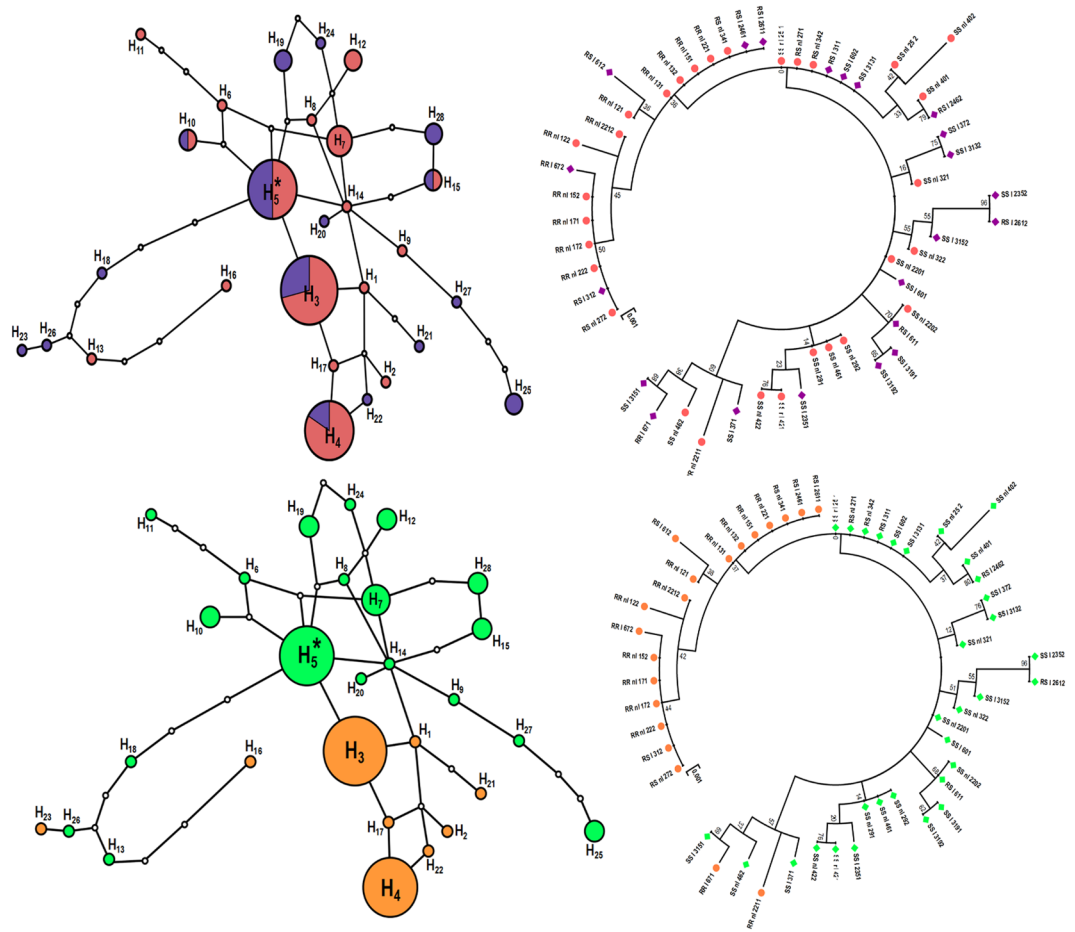


Figure 5. Genetic diversity parameters of *GSTe2* in *An. funestus* s.s. from Mibellon in relation to *Plasmodium* infection. (a) haplotype network and (b) phylogenetic tree (using a maximum likelihood method) between infected and uninfected mosquitoes; (c) haplotype network and (d) phylogenetic tree (using a maximum likelihood method) between 119F resistant allele and L19 susceptible allele.

Discussion

Little information exists on the impact of metabolic resistance on the ability of mosquitoes to transmit *Plasmodium* parasites. This study is among the first to assess the association between metabolic resistance and vectorial capacity of natural populations of malaria vectors. We took advantage of the recent detection of the glutathione S-transferase L119F-*GSTe2* marker in *An. funestus* to investigate the relationship between metabolic resistance and vectorial capacity in field collected mosquitoes. Mosquitoes used were collected from the same population at the same time for them to share a common genetic background but differ only by the presence of the resistant alleles to specifically discriminate this trait. Thus, any difference observed between the three genotypes would directly be associated with the insecticide resistance alleles.

Role of *An. funestus* in malaria transmission. *An. funestus* s.s. was found to be the most abundant mosquito species from the indoor collection in the two study sites correlating with the indoor feeding/resting behavior of this species and supported by the presence of permanent large pools of water in both locations. *An. funestus* s.s. is playing a major role in malaria transmission in these areas with a very high infection rate recorded at all stages including sporozoite infection rates (14.8% in Obout and 5% in Mibellon) in field collected females' mosquitoes. The high infection rate observed in Obout and Mibellon for *An. funestus* s.s. is similar to high levels of infection rates recorded previously for this species across the continent such as 20%³⁰ and 50%³¹ observed in Burkina Faso, 13.6%³² and 18%³³ observed in Benin and 12.5% in Ghana²⁵. Although, some of the variations between these rates could be attributed to the differences in the detection methods used (TaqMan, ELISA and Nested-PCR), the consistently high levels of infection support a high vectorial capacity of *An. funestus* across the continent. This is of great concern for malaria control as it shows that despite ongoing control interventions, the level of malaria transmission could remain high in areas where *An. funestus* is the dominant vector. In this study, we noticed that *P. falciparum* was the predominant malaria parasite in both study sites. However, the detection of other malaria parasites, although at lower frequencies, is an indication that control and elimination efforts should not ignore other *Plasmodium* species especially *P. malariae*.

Distribution of L119F-GSTe2 metabolic and A2926S target site resistance markers. It was previously demonstrated that a single amino acid change (L119F) in the over-expressed GSTe2 enzyme in *An. funestus* s.s. confers resistance against DDT and cross-resistance to permethrin in West Africa²⁷. The L119F mutation was detected in both localities with a higher frequency of the resistant allele in Obout. This resistance mechanism could have been selected in this population either by past DDT based IRS³⁴ or by the scale up of pyrethroid-based LLINs. The presence of this resistance marker at high frequency in Obout supports previous observation in northern Cameroon (Gounougou) by Menze *et al.*²¹ suggesting that this mutation is strongly associated with DDT and permethrin cross resistance in Western and Central Africa^{21,27,33}. In Mibellon, the 119F-GSTe2 mutation was found at a lower frequency for the 119F-GSTe2 resistant allele (26.3%). Two hypotheses may explain this: either the mutation was recently introduced in that population or that a recent insecticide selection pressure is favoring its presence now.

The A296S-RDL mutation in the GABA receptor gene associated with dieldrin resistance is fixed in the Obout population. In contrast, this mutation was found only at very low frequency in Mibellon. The high frequency of 296S resistant allele in *An. funestus* field populations from Obout is intriguing since cyclodienes are no longer used for vector control in Cameroon. It has previously been shown that dieldrin resistant mosquitoes exhibit significant fitness costs including behaviour and mating competitiveness^{35,36} that should lead to a decrease in the frequency of the resistant allele from the population overtime. Therefore, reversal of the resistance was expected in this field population in the absence of dieldrin selection pressure. The persistence of this dieldrin resistance marker in the *An. funestus* field population from Obout may be associated with the use of pesticides in the agricultural sector such as fipronil or lindane acting on same GABA receptor as dieldrin³⁷. A population of *An. gambiae* fully resistant to dieldrin (100% RR) was reported in 1961 in Mbalmayo, a location of south Cameroon close to Obout³⁸. This suggests also that the A296S resistant allele in *An. funestus* population in Obout could have become fixed before the removal of dieldrin as a vector control tool, thereby limiting the possibility of reversing dieldrin resistance.

Impact of L119F-GSTe2 metabolic and A2926S target site resistances on *Plasmodium* infection. We did not detect any significant differences between L/L119 homozygote susceptible, L119F-RS heterozygote and 119F/F homozygote resistant genotypes and *P. falciparum* oocyst infection. However, mosquitoes with the A/A296 RDL susceptible genotype were found to be more often infected with *Plasmodium* parasites. It has previously been demonstrated that insecticide resistance mechanisms may alter the vector competence of the mosquito by affecting parasite development or susceptibility of the host to infection. This trend was not observed in this study for the A296S-RDL mutation. In a study assessing the link between insecticide resistance and vector competence, Alout and collaborators demonstrated that target site mutations (*kdr* and *ace-1R*) increased the prevalence of *P. falciparum* infection in pyrethroid resistant *An. gambiae* compared to their susceptible counterparts¹⁰. However, despite a higher prevalence of infection, the *kdr* resistant mosquito strain was found to harbour lower malaria parasite (oocyst) load¹⁰. Many factors can influence the ability of mosquitoes to be successfully infected by *Plasmodium* and harbour the parasites throughout their developmental stages until the sporozoite stage. Therefore, pleiotropic effects of insecticide resistance, immunity activation and other fitness related traits may be altered. McCarroll *et al.* reported that insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes had negative effect on the parasitic worm *Wuchereria bancrofti*, which causes human lymphatic filariasis^{4,39}. Furthermore, vector immunity could also be affected by insecticide resistance⁷. A possible link between resistance and mosquito immunity was observed when a gene driving pyrethroid resistance was up-regulated in the mosquito mid-gut infected with malaria parasites⁴⁰. *An. gambiae* with metabolic resistance has also been shown to have increased infection rates compared to controls¹⁰. However, esterase metabolism or *ace-1* mutation (target site resistance) did not appear to effect the infection rates or parasitic load in *Culex pipiens* mosquitoes⁶. Oxidative stress is part of the mosquito's immune response against *Plasmodium* but may be neutralised by overproduction of GSTs. Previously, GST resistance mechanisms were shown to protect tissues from oxidative damage in plant hoppers and increase longevity in fruit flies⁴¹. Therefore, neutralising oxidative stress could potentially predispose mosquitoes to higher parasite infection.

Assessing the association between the L119F-GSTe2 mutation and the ability of mosquitoes to develop malaria parasites to the sporozoite stage. The high sporozoite infection rate of 14.8% observed in Obout was similar to recent observations in some GSTe2 related insecticide resistant populations of *An. funestus* in Benin³³ and in Democratic Republic of Congo⁴². On the other hand, it was higher than the infection rates recorded in other pyrethroid resistant *An. funestus* populations in southern Africa such as in Malawi (4.8%)⁴³ or in many African countries for other malaria vectors such as *An. gambiae*^{11,22}. This high *Plasmodium* infection rate in *An. funestus* highlights the active transmission of malaria in southern Cameroon by this species. Furthermore, a significant association was found between the 119F/F-GSTe2 resistant genotype and the presence of *P. falciparum* sporozoite in *An. funestus* in Obout. The sporozoite infection rate in 119F/F homozygous resistant mosquitoes was three times higher than that of the homozygous susceptible mosquitoes. This suggests that parasites developed better in resistant mosquitoes than in susceptible counterparts which should be a cause for concern as possession of this resistance allele may potentially be allowing higher malaria transmission. A similar result was previously found in *An. gambiae* s.s. for the target-site *vpsc-L1014S* mutation¹¹. The association between *Plasmodium* sporozoite infection and GSTe2-based resistant mosquitoes observed in this study could be due to three main possibilities. First, this could be caused by the phenotypic expression of L119F-GSTe2 such that the 119F/F homozygous resistant mosquitoes could live longer due to their ability to withstand exposure to insecticides in the field. In this case they are more likely to allow the *Plasmodium* parasites to complete their extrinsic incubation period compared to homozygous susceptible mosquitoes. This suggestion is supported by

the fact that glutathione S-transferases have been shown to be associated with resistance²⁷ and also to protect insect tissues from the damaging effects of oxidative stress and extend life span of insects by increasing solubility and excretion of free radicals^{7,44–46}. The second possibility of the higher likelihood of sporozoite infection in mosquitoes with GSTe2–119F/F genotype is that insecticide resistance could alter mosquito immunity. Indeed, it is possible as suggested previously⁷ that the over-expression of GSTs in homozygous mosquitoes could be protecting *Plasmodium* parasites against the damaging effects of reactive oxidative species (ROS). These ROS are known as key component of the mosquito immune responses against *Plasmodium* infection⁴⁷. It is likely that over-expression of GSTs may affect parasite development or susceptibility of the mosquito to infection by neutralizing the oxidative response of the 119F/F mosquitoes to *Plasmodium* and thus potentially increasing their susceptibility to infection. This will need to be fully established possibly through experimental infection studies. Thirdly, the higher *Plasmodium* infection rate seen in homozygous resistant 119F/F mosquitoes could be due the potential reduction of immune-competence through a resource trade-off between increased over-expression of GSTs and the mosquito's immune response. It has been shown that when certain energy resources are redirected towards the production of large amounts of detoxification enzymes such as GSTs, a resource-based trade-off is usually involved and affects the vector immuno-competence⁴⁸. As a result, there is likely to be a depletion of energy resources which limits the vector's ability to mount a sufficient immune response against *Plasmodium* leading to increased infection in those resistant mosquitoes as observed in our study. However, more studies are needed to establish the extent to which insecticide resistance affects the mosquito's vectorial capacity to confirm the impact of resistance on malaria transmission.

Conclusion

This study investigated the association between a molecular marker of GST-mediated metabolic resistance and *Plasmodium* infection in natural populations of a major malaria vector, *An. funestus*. The study revealed that mosquitoes that were homozygous for the resistance allele were more likely to harbor *Plasmodium* sporozoites. This suggests that the proliferation of this metabolic resistance marker could exacerbate malaria transmission in the field and thus have important public health consequences.

Methods

Study site and sample collection. Mosquito collections were performed in Cameroon in May 2016 and February 2017 in Obout (Southern Region, 3°28'17.0"N 11°44'09.4"E) and Mibellon (Adamaoua Region, 6°46'N, 11°70'E) for one week per site. Prior to mosquito collection, verbal consent was obtained from the village council chairpersons and from each household representative. Indoor resting female mosquitoes were collected using electric aspirators in both locations and transported to the insectary of LSTM Research Unit at OCEAC in Yaoundé, Cameroon.

DNA extraction. Genomic DNA (gDNA) was extracted via the LIVAK method⁴⁹. Following extraction, NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) was used to determine the concentration and purity of the extracted gDNA before storage at –20 °C.

Species identification. The females used for oviposition were morphologically identified using the key of Gillies and De Meillon⁵⁰. Molecular identification was achieved through a cocktail polymerase chain (PCR) reaction described by Koekemoer⁵¹ to determine species composition of *An. funestus* group in the two study sites.

Detection of *Plasmodium* parasites. A TaqMan assay described by Bass *et al.*²⁹ was used to establish the *Plasmodium* infection status of field collected mosquitoes. Two probes were used in this assay. The first, labelled with FAM, detects *P. falciparum*, and the second, labelled with VIC, to detect *P. vivax*, *P. ovale* and/or *P. malariae* (OVM). Firstly, gDNA was extracted from the whole mosquitoes to assess the overall proportion of *An. funestus* infected by *Plasmodium* parasites in the field. Secondly, another sets of field collected mosquitoes were dissected in two parts: the abdomens, used for the detection of *Plasmodium* infection at the oocyst stage, and the head plus thorax for the assessment of sporozoite infection rate. Results of TaqMan assay were confirmed by performing a nested PCR assay as previously described⁵².

Genotyping of the L119F-GSTe2 mutation. The L119F-GSTe2 mutation previously shown to play a major role in DDT and permethrin resistance in *An. funestus*²⁷ was genotyped in F₀ field-collected mosquitoes using a newly designed allele-specific PCR (AS-PCR) diagnostic assay. Two pairs of primers were needed for the AS-PCR (two outer and two inner primers). Specific primers were designed manually to match the mutation and an additional mismatched nucleotide was added in the 3th nucleotide from the 3' end of each inner primer to enhance the specificity. More details on the primer sequences are given in Table S4. PCR was carried out using 10 mM of each primer and 1 μl of genomic DNA as template in 15 μl reactions containing 10X Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U Kapa Taq (Kapa biosystems). The cycle parameters were: 1 cycle at 95 °C for 2 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were separated on 2% agarose gel by electrophoresis. This method detects homozygote resistant (119F/F) at 523 bp, homozygote susceptible (L119F-RS) at 312 bp, and heterozygote (L/L119) with both bands. Association between the GSTe2 mutation and malaria transmission potential was assessed by calculating the odds ratio of sporozoite infection rate between the homozygous resistant (119F/F), heterozygote (L119F-RS) and homozygous susceptible (L/L119) individuals compared to uninfected individuals, with statistical significance was computed based on the Fisher's exact probability test.

Association between the genetic diversity of the *GSTe2* gene and *Plasmodium* infection in *An. funestus*. The entire *GSTe2* gene of 881 bp in *An. funestus* was amplified in 26 whole mosquitoes [11 infected by *Plasmodium* parasites (both stages) and 15 non-infected]. Two primers; *GSTe2F*, 5'GGA ATT CCA TAT GAC CAA GCT AGT TCT GTA CAC GCT 3' and *GSTe2R*, 5' TCT AGA TCA AGC TTT AGC ATT TTC CTC CTT 3' were used to amplify the gene in 15 µl reaction containing 10 mM of each primer, 10X Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U Kapa Taq (Kapa biosystems). PCR conditions were 1 cycle at 95 °C for 5 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then final extension at 72 °C for 10 min. PCR product was firstly visualized on 1.5% agarose gel stained with Midori green dye (Nippon Genetics Europe, Germany) and then purified using ExoSAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturer recommendations and directly sequenced on both strands. Sequences were visualized and corrected using BioEdit v7.2.5 software⁵³. Alignment of these sequences was done using ClustalW Multiple Alignment integrated in BioEdit⁵⁴. Genetic diversity parameters were assessed using DnaSP v5.10.01⁵⁵ and MEGA v7.0.21⁵⁶ softwares.

Genotyping of the A296S-RDL GABA receptor mutation. To compare the role of metabolic resistance to that of target-site resistance mechanism, we genotyped the A296S-RDL mutation associated with dieldrin resistance²⁰ in *Plasmodium* infected and uninfected mosquitoes. The A296S-RDL mutation was genotyped using a protocol previously described by Riveron *et al.*⁴³. Furthermore, the combined effect of harboring both alleles of A296S-RDL and L119F-GSTe2 on the infection status of field collected mosquitoes was also assessed.

References

- Bhatt, S. *et al.* The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207 (2015).
- Ranson, H. & Lissenden, N. Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol* **32**, 187–196, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.010> (2016).
- Alout, H., Labbé, P., Chandre, F. & Cohuet, A. Malaria vector control still matters despite insecticide resistance. *Trends in parasitology* **33**, 610–618 (2017).
- McCarroll, L. & Hemingway, J. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Journal Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1345–1351 (2002).
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. & Chevillon, C. In *Microevolution Rate, Pattern, Process* 287–296 (Springer, 2001).
- Vezilier, J., Nicot, A., Gandon, S. & Rivero, A. Insecticide resistance and malaria transmission: infection rate and oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes infected with *Plasmodium relictum*. *Malaria Journal* **9** (2010).
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A. F. & Gandon, S. Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathog* **6**, e1001000, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000> (2010).
- Martinez-Torres, D. *et al.* Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* **7**, 179–184 (1998).
- WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). 2012. ISBN 978, 4 (2012).
- Alout, H. *et al.* Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS ONE* **8**, e63849 (2013).
- Kabula, B. *et al.* A significant association between deltamethrin resistance, *Plasmodium falciparum* infection and the Vgsc-1014S resistance mutation in *Anopheles gambiae* highlights the epidemiological importance of resistance markers. *Malar J* **15**, 289, <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1331-5> (2016).
- Irving, H. & Wondji, C. S. Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genet* **18**, 76, <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0539-x> (2017).
- Casimiro, S. L., Hemingway, J., Sharp, B. L. & Coleman, M. Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. *Malar J* **6**, 142, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-142> (2007).
- Cuamba, N., Morgan, J. C., Irving, H., Steven, A. & Wondji, C. S. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the Chokwe District in Mozambique. *PLoS One* **5**, e11010, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011010> (2010).
- Hunt, R. H., Edwardes, M. & Coetzee, M. Pyrethroid resistance in southern African *Anopheles funestus* extends to Likoma Island in Lake Malawi. *Parasites & Vectors* **3**, 122, <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-122> (2010).
- Wondji, C. S. *et al.* Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 19063–19070, <https://doi.org/10.1073/pnas.1217229109> (2012).
- Morgan, J. C., Irving, H., Okedi, L. M., Steven, A. & Wondji, C. S. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One* **5**, e11872, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011872> (2010).
- Mulamba, C. *et al.* Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PLoS One* **9**, e110058, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110058> (2014).
- Lwetoijera, D. W. *et al.* Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malar J* **13**, 331, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-331> (2014).
- Wondji, C. S. *et al.* Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochem Mol Biol* **41**, 484–491, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.03.012> (2011).
- Menze, B. D. *et al.* Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PLoS One* **11**, e0163261, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163261> (2016).
- Djouaka, R., Irving, H., Tukur, Z. & Wondji, C. S. Exploring Mechanisms of Multiple Insecticide Resistance in a Population of the Malaria Vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLoS One* **6**, e27760, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027760> (2011).
- Djouaka, R. J. *et al.* Evidence of a multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in South West Nigeria. *Malar J* **15**, 565, <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1615-9> (2016).
- Okoye, P. N., Brooke, B. D., Koekemoer, L. L., Hunt, R. H. & Coetzee, M. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 591–598, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.022> (2008).
- Riveron, J. M. *et al.* Multiple insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in southern Ghana: implications for malaria control. *Parasit Vectors* **9**, 504, <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1787-8> (2016).
- Samb, B. *et al.* Investigating molecular basis of lambda-cyhalothrin resistance in an *Anopheles funestus* population from Senegal. *Parasit Vectors* **9**, 449, <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1735-7> (2016).
- Riveron, J. M. *et al.* A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically-based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol* **15**, R27, <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27> (2014).
- Ibrahim, S. S., Ndula, M., Riveron, J. M., Irving, H. & Wondji, C. S. The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Mol Ecol* **25**, 3436–3452, <https://doi.org/10.1111/mec.13673> (2016).

29. Bass, C. *et al.* PCR-based detection of Plasmodium in Anopheles mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar. J.* **7**(177), 177 (2008).
30. Dabire, K. R. *et al.* Anopheles funestus (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol* **44**, 990–997 (2007).
31. Costantini, C., Sagnon, N., Ilboudo-Sanogo, E., Coluzzi, M. & Boccolini, D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in Anopheles funestus from Burkina Faso. *Parassitologia* **41**, 595–611 (1999).
32. Sandeu, M. M. *et al.* Optimized Pan-species and speciation duplex real-time PCR assays for Plasmodium parasites detection in malaria vectors. *PLoS One* **7**, e52719, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052719> (2012).
33. Djouaka, R. *et al.* Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector Anopheles funestus in Benin. *Parasit Vectors* **9**, 453, <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1723-y> (2016).
34. Antonio-Nkondjio, C. *et al.* Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors* **10**, 472, <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2417-9> (2017).
35. Rowland, M. Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female Anopheles gambiae and An.stephensi mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology* **5**, 193–206, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00542.x> (1991).
36. Rowland, M. Activity and mating competitiveness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female Anopheles gambiae and An.stephensi mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Med Vet Entomol* **5**, 207–222 (1991).
37. Tantely, M. L. *et al.* Insecticide resistance in Culex pipiens quinquefasciatus and Aedes albopictus mosquitoes from La Reunion Island. *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 317–324, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.005> (2010).
38. Gariou, J. & Mouchet, J. [Appearance of a dieldrin-resistant strain of Anopheles gambiae in the antimalaria campaign zone in southern Cameroon's]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **54**, 870–875 (1961).
39. McCarroll, L. *et al.* Insecticides and mosquito-borne disease. *Nature* **407**, 961 (2000).
40. Felix, R. C., Muller, P., Ribeiro, V., Ranson, H. & Silveira, H. Plasmodium infection alters Anopheles gambiae detoxification gene expression. *BMC Genomics* **11**, 312, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-312> (2010).
41. McElwee, J. J. *et al.* Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol* **8**, R132, <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r132> (2007).
42. Riveron, J. M., Watsenga, F., Irving, H., Irish, S. R. & Wondji, C. S. High Plasmodium Infection Rate and Reduced Bed Net Efficacy in Multiple Insecticide-Resistant Malaria Vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *The Journal of infectious diseases* **217**, 320–328, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix570> (2018).
43. Riveron, J. M. *et al.* Rise of multiple insecticide resistance in Anopheles funestus in Malawi: a major concern for malaria vector control. *Malar J* **14**, 344, <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0877-y> (2015).
44. Parkes, T. L., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in the oxygen defense system of Drosophila melanogaster. *Genome* **36**, 1007–1014 (1993).
45. Hayes, J. D. & McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* **31**, 273–300 (1999).
46. Vontas, J. G., Small, G. J. & Hemingway, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. *Biochem J* **357**, 65–72 (2001).
47. Kumar, S. *et al.* The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae. Vol. 100 (2003).
48. Després, L. *et al.* Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in Aedes aegypti mosquito. *Biology Letters* **10**, 20140716, <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0716> (2014).
49. Livak, K. J. Organization and mapping of a sequence on the Drosophila melanogaster X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* **107**, 611–634 (1984).
50. Gillies, M. & De Meillon, B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Inst Med Res* **54**, 343 (1968).
51. Koekemoer, L. L., Kamau, L., Hunt, R. H. & Coetzee, M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the Anopheles funestus (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* **66**, 804–811 (2002).
52. Snounou, G. *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* **61**, 315–320, [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90077-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90077-B) (1993).
53. Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98 (1999).
54. Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680 (1994).
55. Librado, P. & Rozas, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452 (2009).
56. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874 (2016).

Acknowledgements

This study was funded by a Wellcome Trust Senior Fellowship in Biomedical Sciences to CSW (101893/13/Z).

Author Contributions

C.S.W. conceived and designed the study; M.C.C., J.M.R. and M.T. carried out the sample collection and performed WHO susceptibility assays; M.T., M.C.C., M.J.W., C.K.K., M.K. and M.T. performed the Molecular analyses; M.T., N.A.A., C.K.K., C.N., J.M.R. and C.S.W. analyzed the data. M.T., J.M.R. and C.S.W. wrote the manuscript with contribution from other co-authors. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42015-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

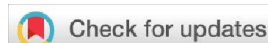
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

3- TCHOUAKUI, M., FOSSOG, B. T., NGANNANG, B. V., DJONABAYE, D., TCHAPGA, W., NJIOKOU, F. & WONDJI, C. S. 2019. Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector. *Wellcome Open Research*, 4.



RESEARCH ARTICLE

REVISED Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus* [version 2; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]

Previously titled: Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector

Magellan Tchouakui ^{1,2}, Billy Tene Fossog ², Brigitte Vanessa Ngannang ^{2,3}, Doumani Djonabaye ^{2,3}, Williams Tchapgá ², Flobert Njiokou ¹, Charles S. Wondji ^{2,4}

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

²Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases, Younde, 13591, Cameroon

³Department of Biochemistry, University of Yaoundé 1, Yaoundé, P.O. Box 812, Cameroon

⁴Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, L35QA, Liverpool, UK, UK

v2 First published: 24 Jan 2019, 4:13 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15013.1>)
Latest published: 21 Mar 2019, 4:13 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15013.2>)

Abstract

Background: Metabolic resistance is a serious challenge to current insecticide-based interventions. The extent to which it affects natural populations of mosquitoes including their reproduction ability remains uncharacterised. Here, we investigated the potential impact of the glutathione S-transferase L119F-GSTe2 resistance on the mating competitiveness of male *Anopheles funestus*, in Cameroon.

Methods: Swarms and indoor resting collections took place in March, 2018 in Tibati, Cameroon. WHO tube and cone assays were performed on F₁ mosquitoes from indoor collected females to assess the susceptibility profile of malaria vectors. Mosquitoes mated and unmated males collected in the swarms were genotyped for the L119F metabolic marker to assess its association with mating male competitiveness.

Results: Susceptibility and synergist assays, showed that this population was multiple resistant to pyrethroids, DDT and carbamates, likely driven by metabolic resistance mechanisms. Cone assays revealed a reduced efficacy of standard pyrethroid-nets (Olyset and PermaNet 2.0) with low mortality (<25%) whereas synergist PBO-Nets (Olyset Plus and PermaNet 3.0) retained greater efficacy with higher mortality (>80%). The L119F-GSTe2 mutation, conferring pyrethroid/DDT resistance, was detected in this *An. funestus* population at a frequency of 28.8%. In addition, a total of 15 mating swarms were identified and 21 *An. funestus* couples were isolated from those swarms. A comparative

Open Peer Review

Referee Status:

	Invited Referees		
	1	2	3
version 2 published 21 Mar 2019	 report	 report	 report
version 1 published 24 Jan 2019	 report	 report	


1 **Jacques D. Charlwood**, NOVA University Lisbon, Portugal

2 **Adriana E. Flores** , Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

genotyping of the L119F-GSTe2 mutation between mated and unmated males revealed that heterozygote males 119L/F-RS were less able to mate than homozygote susceptible (OR=7.2, $P<0.0001$). Surprisingly, heterozygote mosquitoes were also less able to mate than homozygote resistant (OR=4.2, $P=0.010$) suggesting the presence of a heterozygote disadvantage effect. Overall, mosquitoes bearing the L119-S susceptible allele were significantly more able to mate than those with 119F-R resistant allele (OR=2.1, $P=0.03$). **Conclusion:** This study provides preliminary evidences that metabolic resistance potentially exerts a fitness cost on mating competitiveness in resistant mosquitoes.

Keywords

Malaria, insecticides, metabolic resistance, Glutathione S-transferase, *Anopheles funestus*, mating competitiveness

3 **Basil D. Brooke** , National Health Laboratory Service (NHLS), South Africa
University of the Witwatersrand, South Africa

Any reports and responses or comments on the article can be found at the end of the article.

Corresponding authors: Magellan Tchouakui (mtchouakui@yahoo.fr), Charles S. Wondji (Charles.Wondji@lstmed.ac.uk)

Author roles: **Tchouakui M:** Data Curation, Formal Analysis, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing; **Fossog BT:** Formal Analysis, Methodology; **Ngannang BV:** Investigation, Methodology; **Djonabaye D:** Investigation; **Tchappa W:** Investigation, Methodology; **Njiokou F:** Data Curation, Formal Analysis, Writing – Review & Editing; **Wondji CS:** Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis, Funding Acquisition, Validation, Writing – Review & Editing

Competing interests: No competing interests were disclosed.

Grant information: This study was funded by the Wellcome Trust through a Senior Research Fellowship awarded to CSW [101893]. *The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.*

Copyright: © 2019 Tchouakui M *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Licence](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Tchouakui M, Fossog BT, Ngannang BV *et al.* **Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus* [version 2; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]** Wellcome Open Research 2019, 4:13 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15013.2>)

First published: 24 Jan 2019, 4:13 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15013.1>)

REVISED Amendments from Version 1

The main change in this version of the manuscript is only on the result of *Plasmodium* infection in *An. gambiae* s.l. Compared to the first version where we presented the infection rate in both *An. gambiae* and *An. coluzzii* combined, here the result is presented for each species. In addition we have corrected some English mistakes as suggested by the reviewer.

See referee reports

Background

Despite significant reduction of malaria burden in the past decade, this disease remains a major public health concern in Africa. Recent reports of increase cases of malaria¹ is a further indication that more is needed to control this disease. The scale up of vector control measures, in particular long-lasting insecticide treated nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS), has been the main driver of this reduction of malaria burden with about 78% of all gains achieved since 2000 attributed to these methods². However, resistance is spreading in malaria vectors in Africa including *Anopheles funestus* for the four classes of insecticides used in public health, compromising the effectiveness of these interventions³. Providing adequate information about the mechanisms of resistance and more importantly its impact on key traits of mosquito biology, ecology and behaviour such as their mating ability in the presence of resistance can help in planning and implementing suitable insecticide resistance management strategies.

Insecticide resistance management strategies including rotation of insecticide rely on the assumption that insecticide resistance alleles are very often detrimental in the absence of insecticide selection pressure^{4,5}. The adaptive allele in this case might be associated with modification of physiological processes or resource availability⁶ which can lead to decreased performance and fitness disadvantage of resistant mosquitoes⁷⁻⁹ and therefore, a reversal to susceptibility is expected in the absence of selection pressure from the specific insecticide. However, little is currently known on such fitness costs in field populations of malaria vectors notably for metabolic resistance mechanism because of a lack of DNA-based markers. A previous study using a laboratory strains of *An. gambiae*, demonstrated fewer copulations in dieltrid resistant males when compared with their susceptible counterparts⁶. Berticat *et al.* demonstrated also the disadvantage in competitive mating ability of *Culex pipiens* males with the target-site resistance *Ace1R* genotype, when compared with susceptible males, pointing to its potential impact on the spread and persistence of resistant alleles. In contrast, for malathion resistance in the beetle *Tribolium castaneum* it was noticed that resistance enhanced male reproductive success. If this last case is observed in malaria vectors, it will be a great concern for control program as it will prevent the implementation of resistance management strategies based on the rotation of insecticides. Currently, there is little information on the impact of metabolic insecticide resistance on the mating ability of natural populations of major malaria vectors in Africa. So far the only study on this topic reported a lack of impact of metabolic resistance on male competitiveness of *An. gambiae* field population in Burkina

Faso¹⁰. The study assessed only the global transcription profiling of mated and unmated mosquitoes since a lack of DNA marker for metabolic resistance prevented a direct genotyping correlation with mating status. However, recent progress made in elucidating the molecular basis of metabolic resistance had identified a single amino acid change (L119F) in the glutathione S-transferase epsilon 2 (GSTe2) conferring pyrethroid/DDT resistance in *An. funestus*¹¹. This new marker now provide the opportunity to directly investigate the impact of metabolic resistance on mating male competitiveness. However, assessing the impact of resistance on the mating of malaria vectors through swarm's collection in natural populations of mosquitoes requires a good knowledge of the mating places and also the mating behaviour of these vectors.

Concerning the mating behaviour of insects, it was reported that most of them mate in swarms, whereby dispersed populations aggregate at specific times and places^{12,13}. In mosquitoes including malaria vectors, swarming occur very often around visual markers such as vegetation and brick piles on the ground¹⁴⁻¹⁶. This knowledge on mating places and behaviour can also help to reduce mosquito densities or interrupt the mating thus helping to reduce pathogen transmission in vector populations¹⁷. This technique has been effective against some *Anopheles* mosquitoes in Burkina Faso but on a limited scale¹⁸. Little information is currently available for other vector species like *An. funestus*. In *An. gambiae* s.s. mating is limited to a very short period at dusk. In this species, males always swarming before and disbanding after copulation¹⁹. Females approach a swarm, promptly acquire a male and leave in copula^{19,20}. Mating behavior, which is one of the most important aspects of reproduction²¹, remains widely under-investigated in many malaria vectors. While many studies were conducted on *An. gambiae* swarms in Western Africa^{10,20,22,23}, observations have rarely been reported in Eastern, Southern and Central Africa. Prior to this current report, there has been little information available on the swarms in Cameroon. Improved understanding of mosquito mating systems, and more importantly how insecticide resistance mechanisms affects the mating success in field population of malaria vectors such as *An. funestus*, could possibly give new tools for vector control implementation.

In this study, after characterizing the mating swarms of *An. funestus*, we investigated the resistance profiling and molecular basis of insecticide resistance in a natural populations of *An. funestus* in Cameroon. Furthermore, we investigated the potential impact of metabolic resistance on mating male competitiveness by assessing the association between the L119F-GSTe2 metabolic resistance marker and the mating success of *An. funestus* mosquitoes in field conditions.

Methods**Study area**

Initially, the surveys covered two villages, Tibati (6°28' N, 12°37' E) and Mibellon (6°46' N, 11° 70' E) (Adamawa Region, Cameroon) but we eventually focused on just one village (Tibati) according to the density of the swarms. The main malaria vectors in Tibati are *An. funestus* during the dry season and *An. gambiae* s.l during the rainy season, whereas in Mibellon

An. funestus is the predominant species²⁴. The dominance of *An. funestus* in these areas is due to the presence of multiple lakes known as suitable breeding sites for this species. LLINs is the main vector control approach in Cameroon. The villages included in this study benefited from universal LLIN distribution in 2011 and 2016. Because of high selection pressure of insecticide contained in the LLINs, the main malaria vectors have developed resistance to pyrethroids used in the nets²⁵. The communities rely mainly on substance farming, agriculture but also fishing.

Detection and collection of *An. funestus* swarms

Swarm collections were undertaken on 12 evenings in February and March 2018. The search for potential swarms in each village started in the first evening at sunset around 5.30 pm, and then each swarm located were characterized and/or collected throughout the study. Swarms were searched in various places (around the potential breeding sites, closer to habitations, the farms, on the street) with the presence of potential markers assessed. For all swarms identified, different characteristics such as i) heights ii) starting time of swarming, iii) time at night when the swarms became invisible and iv) the behaviour of mosquitoes in the swarms were recorded. Swarms were then sampled using sweep nets as described previously^{10,20,23}. All couples of *An. funestus* (mated) were extracted from the swarms and each couple manually transferred into a clean cartoon cup. Samples of the remaining males that did not mate in the same swarms were collected. All mosquitoes sampled were separated into unmated males, mated males and mated females and stored in RNA-later solution for further analysis.

Indoor female collections and F₁ rearing

For the purpose of assessing the susceptibility profile to various public health insecticides and WHO recommended bed nets, F₁ females were generated from indoor-resting blood-fed (F₀) females collected using electric aspirators. Collected mosquitoes were morphologically identified using the key of Gillies and De Meillon (1968). After sampling, female mosquitoes were transferred to the insectary of the Centre of Research in Infectious diseases (CRID) in Yaoundé, Cameroon. Female mosquitoes collected were kept in standard insectary conditions of 25 ± 2°C, 80 ± 10% relative humidity and fed with 10% sugar solution for at least four days and then left to oviposit using the forced-egg laying method²⁶. F₁ larvae were reared to adults using the protocol previously described²⁶.

Species identification

Genomic DNA was extracted from 40 F₀ *An. gambiae* s.l. and 102 F₀ *An. funestus* s.l. female mosquitoes (head and thorax) using the Livak protocol²⁷ which includes grinding of mosquito in a Livak buffer, followed by a 65°C incubation for 30 min and then centrifugation. Further steps involved an incubation on ice (30min) followed by centrifugation steps, precipitation with alcohol (100% and 70%)²⁷. Mosquito species was identified using the Koekomoer cocktail Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for *An. funestus* group and the SINE PCR assay for *An. gambiae* s.l.^{28,29}.

Infection of malaria vectors by *Plasmodium* parasites

Plasmodium infection rate was estimated by Taqman (401400, Santa Clara, CA, USA) assay using the head and thorax of F₀ field-collected mosquitoes as previously described³⁰. 102 females *An. funestus* sensu stricto (s.s.) and 40 *An. gambiae* s.l. were used for the detection of *Plasmodium falciparum* (falcip+) and/or *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium malariae* (OVM+) sporozoites.

Insecticide susceptibility assays

Susceptibility profiles to insecticides using WHO bioassays were assessed using the F₁ generation of *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* s.s. according to WHO procedures³¹. Insecticides tested for *An. funestus* included permethrin (0.75%) (PE 452), deltamethrin (0.05%) (DE 609), bendiocarb (0.1%) (BE 172), propoxur (0.1%), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (4%) (DD 226), malathion (5%) (MA 215), fenitrothion (1%) (FE 205) and dieldrin (4%) (DI 094) (VCRU, Penang, MALAYSIA). Due to a limited number of F₁ *An. gambiae* s.l. from field collected mosquitoes, only females were tested for DDT, permethrin and deltamethrin. Control mosquitoes were exposed to non-impregnated papers. The mortality rates were determined 24h post-exposure to insecticide. In addition to the 60 min exposure described above, mortality after 30 min, 90min, 2h and 3h exposures to DDT, deltamethrin and bendiocarb was also assessed in order to evaluate the intensity of resistance of *An. funestus* s.s. from Tibati.

Synergist assays

To assess the contribution of cytochrome P450 and GST enzymes in the resistance profile, synergist assays were performed with PBO (Piperonyl Butoxide) and DEM (Diethyl Maleate) with *An. funestus* s.s. Four replicates of 20–25 adult mosquitoes (2–5 day old) were immediately exposed to permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%), or DDT (4%) for 60 minutes after pre-exposed to PBO or DEM impregnated papers (4 %) for 1 hour. In addition, control assays using only the synergist impregnated papers for 60 minutes were also performed and mortality recorded 24 hours after. The mortality rate obtained were compared with those without synergist's exposure using a chi square test.

Assessment of bed net efficacy using cone assays

In order to assess the impact of resistance on insecticide-based interventions against the malaria vectors of this location, we checked the efficacy of common bed nets recommended by WHO against the Tibati's *An. funestus* population. 3 minute cone bioassays were carried out following the WHO guidelines³¹. Five batches of ten F₁ females (2–5 days old) were placed in plastic cones attached to 5 commercial nets: PermaNet[®] 2.0 (deltamethrin 1.8 g/kg) (Vestergaard, Lausanne, Switzerland), PermaNet[®] 3.0 (side of the net; deltamethrin 2.8g/kg) (Vestergaard, Lausanne, Switzerland), PermaNet[®] 3.0 (top of the net; deltamethrin 4.0 g/kg plus 25g/kg piperonyl butoxide (PBO)) (Vestergaard, Lausanne, Switzerland), Olyset[®] (2 % permethrin) (Sumitomo Chemical UK PLC, London, UK) and Olyset[®] plus (2 % permethrin plus 1 % PBO) (Sumitomo Chemical UK PLC, London, UK).

Genotyping of resistance marker and assessment of the impact on the mating male competitiveness of *An. funestus* field population

L119F-GSTe2 metabolic and A296S-RDL target-site resistance markers, involved in DDT/permethrin and dieldrin resistance in *An. funestus* respectively were genotyped in order to assess the effect of these resistance mechanisms on the mating ability of *An. funestus* field population as there is no evidence of *kdr* in *An. funestus*³². The L119F-GSTe2 was genotyped using an allele-specific (AS)-PCR and the A296S-RDL by TaqMan assay (Santa Clara, CA, USA). A296S-RDL TaqMan reaction was performed as previously described³³ PCR reactions (10 µl) contained 1 µl of genomic DNA, 5µl of SensiMix DNA kit (catalog: SM2-717104), 0.125µl of the A296S-RDL probe and 3.875 µl of sigma water. Samples were run on a Mx3000P™ (Stratagene) using the temperature cycling conditions of: 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 10 seconds and 60°C for 45 seconds. We designed a new allele specific PCR to genotype the L119F-GSTe2 mutation⁹. Two pairs of primers were used for the AS-PCR (two outer and two inner primers, Table 1). Specific primers were designed manually to match the mutation and an additional mismatched nucleotide was added in the 3rd nucleotide from the 3' end of each inner primer to enhance the specificity. PCR was carried out using 10 mM of each primer and 1ul of genomic DNA as template in 15 µl reactions containing 10X Kapa Taq buffer A (KB 1003), 0.2 mM dNTPs (DM-516404), 1.5 mM MgCl₂ (KB 1001), 1U Kapa Taq (KE 1000) (Kapa biosystems). The cycle parameters were: 1 cycle at 95°C for 2 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 1min and then a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were separated on 2% agarose gel by electrophoresis.

Furthermore, in an effort to characterize the broad dynamic of resistance to insecticides in this location, we also genotyped the L1014F target-site knockdown resistance (Kdr w) associated with DDT/pyrethroid resistance in *An. gambiae* using a Taqman (Santa Clara, CA, USA) method as previously described³⁴. PCR reactions (10 µl) contained 1 µl of genomic DNA, 5µl of SensiMix DNA kit (catalog: SM2-717104), 0.125µl of the L1014F-kdrw probe and 3.875 µl of sigma water. Samples were run on a Mx3000P™ Multiplex quantitative PCR system (Stratagene) using the temperature cycling conditions of: 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 10 seconds and 60°C for 45 seconds.

Statistical analysis

Association between the *GSTe2* mutation and mating success was assessed by calculating the odds ratio of mating between

the homozygous resistant, heterozygous and susceptible for each gene in mated males compared to unmated group with statistical significance based on the Fisher's exact probability test. All analyses were conducted using [GraphPad Prism](#) version 7.00.

Results

Mosquito composition at Tibati

A total of 1021 blood fed female of *An. funestus* s.l. were collected indoors. Molecular identification on 102 *An. funestus* s.l. mosquitoes confirmed that they were all *An. funestus* s.s. Only 40 *An. gambiae* s.l. were collected and molecular identification revealed that the majority was *An. gambiae* s.s. at 82.5% (33/40) whereas 17.5% (7/40) were *Anopheles coluzzii*.

Plasmodium infection rate

Out of the 102 *An. funestus* s.s. tested by Taqman, 2.94% (3/102) mosquitoes were sporozoite infected with *P. falciparum*. Due to low sample size, *Plasmodium* infection rate in *An. gambiae* s.l. was assessed in both species combined (*An. gambiae* (n= 33) and *An. coluzzii* (n=7)). This revealed that 12.5% (5/40) *An. gambiae* s.l. mosquitoes were infected with sporozoites predominantly with *falciparum* (falcip+; 10% [4/40]), whereas one mosquito was *P. ovale/vivax/malariae* infected (OVM+; 2.5% [1/40]). Two out of the five infected *An. gambiae* s.l. were *An. coluzzii* [2/7 infected (28.5%)] and three were *An. gambiae* [3/33 infected 9.1%]. However, the low sample size of *An. coluzzii* means that this rate is not comparable.

Collection of the *An. funestus* swarms

15 swarms with considerably large size (more than 100 mosquitoes/swarm) were observed in Tibati, while very few swarms (with small size, less than 50 mosquitoes/swarm) were observed in Mibellon. Most mating swarms were located close to human habitations compared to other places and swarming started with two to three mosquitoes congregating after sunset around 6.05pm, and flying above a swarm place. The number of mosquitoes increased in the swarms over the next 5 to 10 minutes and slowly decreased in size then disappeared after 30 minutes when the sky became dark. Flying mosquitoes were observed by viewing them against the sky after sunset. Males of *An. funestus* swarmed at the height of 2.5m from the ground. Concerning the mating behaviour, when a female coupled with a male, they immediately left the swarms, flying at 1.5m from the ground. It is at that moment that the couples were extracted from the swarms using the sweep nets. There was no clear physical marker for *An. funestus* swarm's position in Tibati but the commonest place for swarming were just an empty space close to

Table 1. Details of primer sequences used to analyse the L119F GSTe2 mutation.

Primers	Sequence (5' to 3')
NdeI_Gste2F	GGAATTCCATATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT
XbaI_Gste2 R	TCTACATCAAGCTTTAGCATTTCCTCCTT
L119F-Res	CGGGAATGTCCGATTTTCCGTAGAa AA
L119-F-Sus	CATTTCTATTCTCATTACAGGAGCGT AaTC

habitations and most of the swarm locations remained the same for several days. Throughout this survey, we observed and collected a total of 21 copulation events in Tibati. Furthermore, we collected more than 1000 male mosquitoes from those remaining in the swarms after a mating period (that most likely did not mate). The low number of collected couples suggests a low number of females in these swarms but could also indicate that mating was also taking place in other swarms not detected in this study.

Resistance profile of malaria vectors in Tibati

An. funestus s.s exhibited full susceptibility to organophosphates (malathion and fenitrothion) and to dieldrin (organochlorine) with 100% mortality rate. This population showed high level of resistance to pyrethroids with low mortality rates in females including permethrin (type I; 26.6% \pm 2.6 mortality) and deltamethrin (type II; 12.0% \pm 2.3 mortality). Resistance was observed against the organochlorine DDT (46.8% \pm 5.9 mortality), but only a moderate resistance was recorded against the

carbamates bendiocarb (86.1% \pm 5.5% mortality) and propoxur (87.2% \pm 0.8 mortality) (Figure 1A). The males also exhibited similar susceptibility patterns to the females (Figure 1A). Due to the high resistance observed for pyrethroids and DDT insecticides, the intensity level of this resistance was assessed by performing bioassays with higher exposure times of 90min, 120min and 180min for deltamethrin and DDT, and also for bendiocarb (Figure 2A). After 2h and 3h exposure to deltamethrin, mosquitoes still exhibited a mortality rate of <80% (2 hours: 67.4% \pm 4.5; 3 hours: 76.4% \pm 3.6). In contrast, mortality rates close to 100 were observed with DDT aft 2h and 3h exposure (2h: 96.7% \pm 1.7; 3 h: 100% \pm 00), and for bendiocarb (90 min: 93.1% \pm 1.6; 2 hours: 100% \pm 00).

Analysis of *An. gambiae* s.l. mosquitoes revealed that this population was generally more resistant than *An. funestus* with lower mortality rates observed for DDT (23.6% \pm 2.6 mortality), permethrin (1.75% \pm 1.75) and deltamethrin (10.0% \pm 5.8%) (Figure 1C).

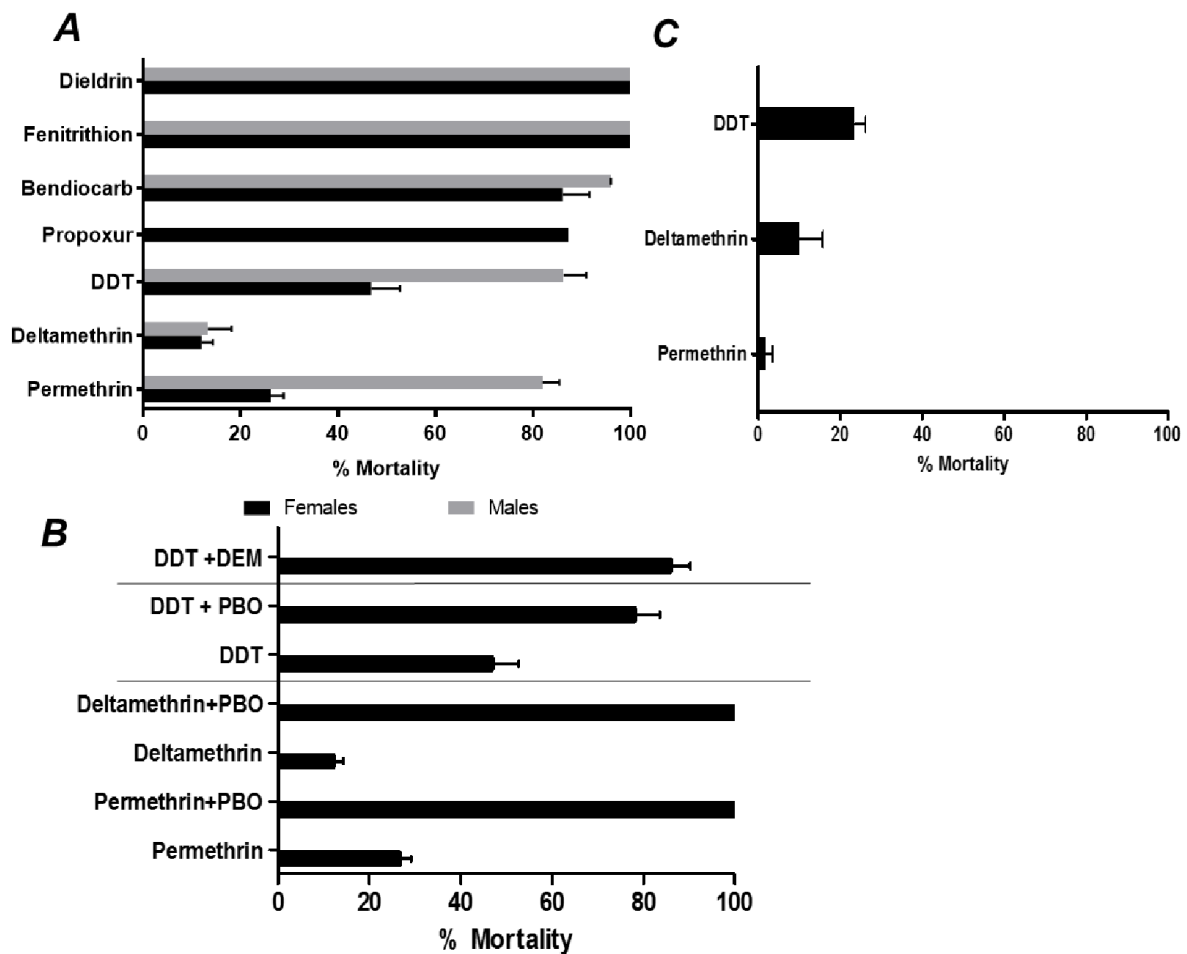


Figure 1. Susceptibility profile to main insecticides of malaria vectors in Tibati. (A) Susceptibility profile of *Anopheles funestus sensu stricto* and (B) susceptibility profile of *Anopheles funestus* s.s females after synergist assay with PBO and DEM whereas (C) susceptibility profile of *Anopheles gambiae* s.l. population. Error bars represent standard error of the mean. Abbreviations: DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; PBO, piperonyl butoxide; DEM, diethyl maleate.

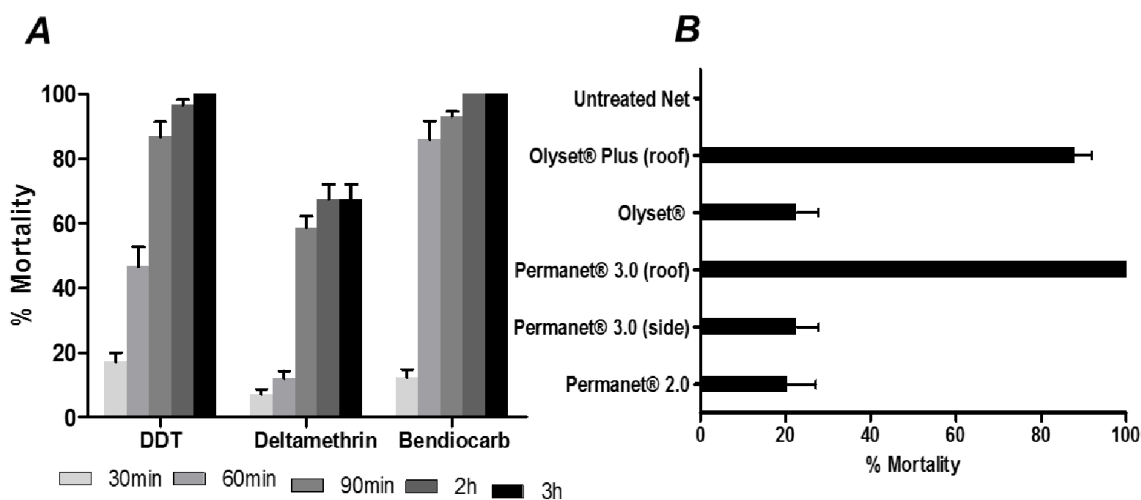


Figure 2. Exploration of resistance intensity in *An. funestus* and impact on LLINs. (A) Susceptibility profile at different time point exposure to DDT, deltamethrin and bendiocarb. (B) Bioefficacy of different commercial long-lasting insecticidal nets against *Anopheles funestus* s.s. using cone assays. Error bars represent standard error of the mean.

Synergist assays

Synergist assays showed a full recovery to susceptibility after PBO pre-exposure for both type I and II pyrethroids tested (permethrin: no PBO pre-exposure [26.6% ± 2.6] mortality vs PBO pre-exposure [100.0% ± 0.0], $X^2 = 73.9$; $P < 0.0001$); deltamethrin: no PBO pre-exposure [12.0% ± 2.3%] vs PBO pre-exposure [100% ± 0.0], ($X^2 = 107.30$; $P < 0.0001$), suggesting that cytochrome P450 enzymes may be playing a major role in pyrethroid resistance in *An. funestus* s.s. from Tibati (Figure 1B). Tests with DDT also revealed the impact of PBO pre-exposure although the susceptibility was not fully recovered (DDT: no PBO pre-exposure [46.78% ± 5.95%] vs PBO pre-exposure [78.1% ± 5.6%], $X^2 = 13.4$; $P = 0.0003$) suggesting that other gene families or mechanisms contribute to DDT resistance. For this reason, we assessed the implication of GSTs enzymes by performing a bioassay with 1h pre-exposition to DEM (inhibitors of GSTs). This revealed a recovery, although only partial (DDT: no DEM pre-exposure [46.8% ± 5.9%] vs DEM pre-exposure [85.9% ± 4.3%], ($X^2 = 22.36$; $P < 0.0001$), showing that GSTs, probably GSTe2¹¹, is contributing synergistically with cytochrome P450 enzymes to the resistance to DDT in this *An. funestus* population.

Bio-efficacy of commercialized nets against *An. funestus* in Tibati

A low efficacy of standard nets (Olyset and PermaNet 2.0) was observed against *An. funestus* s.s.: Olyset: 22.6 ± 5.1% mortality, PermaNet 2.0: 20.4 ± 6.7%. In contrast PBO-based nets (OlysetPlus, and PermaNet 3.0) showed an increased efficacy (OlysetPlus: 87.9 ± 3.9% mortality; PermaNet 3.0-side: 64.2 ± 6.9%, PermaNet 3.0-roof: 100.0 ± 0.0%) (Figure 2B).

Frequency of knockdown resistance (*knr*) in *An. gambiae*

Taqman genotyping of L1014F target-site resistance mutation in *An. gambiae* s.l revealed that the frequency of 1014F *knr*

resistant allele was high (72.7% [48/66]) in Tibati in accordance with high pyrethroid and DDT resistance. 66.7% [22/33] were homozygote resistant, 12.1% [4/33] heterozygote whereas 21.2% [7/33] were homozygote susceptible.

Genotyping of L119F-GSTe2 metabolic resistance and impact on the mating success of *An. funestus* s.s field population

Genotyping of L119F-GSTe2 mutation in indoor collected females revealed a frequency of 28.8%, comprising 10.2% (13/127) 119F/F-RR homozygous resistant, 33.1% (42/127) 119L/F-RS heterozygotes and 56.7% (72/127) L/L119-SS homozygous susceptible (Table 2; Figure 3A). Moderate frequency of the 119F resistant allele in all samples, was recorded in mated (23.8%) compared to unmated males (33.5%) (Table 2). Direct comparison of the frequency of each genotype between mated and unmated males revealed no significant differences between all groups of mosquitoes ($P \geq 0.16$). However, an assessment of the association of each genotype with mating success using odds ratio (OR) revealed that the heterozygote genotype (L119F-RS) showed a significantly lower chance of mating than both homozygous resistant (OR = 4.2 IC: 1.49- 11.9; $P < 0.01$) and homozygous susceptible mosquitoes (OR = 7.2 IC: 3.1 - 16.8; $P < 0.0001$) (Table 3; Figure 3A). In contrast, no significant difference was observed between Homozygote resistant and homozygote susceptible mosquitoes (OR=1.77; IC 0.77-3.7; $P=0.22$). The impact of the resistant allele 119F on the mating competitiveness was also supported by the significantly greater likelihood of not mating when possessing this resistant allele than the susceptible L119 (OR=2.1; CI 1.1-4.0; $P=0.03$) (Table 4).

Genotyping of A296S-RDL target-site resistance in *An. funestus* s.s

Genotyping of A296S-RDL mutation associated with diieldrin resistance in mated and unmated males revealed that the 296S

resistant allele is almost absent in this location (Table 2, Figure 3B). These results were confirmed by the full susceptibility observed with dieldrin in the bioassay test. For this reason, no further comparison was performed for this mutation about its impact on mating success.

Discussion

Elucidating the malaria vector ecology and behaviour is crucial for the implementation of alternative control measures in order to achieve the aim of malaria elimination. Mating is one component of mosquito behaviour that remains poorly characterized. After characterizing an *An. funestus* population in Cameroon including insecticide resistance profiling and swarm patterns, we took advantage of the recent detection of the glutathione S-transferase L119F-GSTe2 marker in *An. funestus*¹¹ to investigate the potential influence of metabolic resistance on mating competitiveness of male *An. funestus* mosquitoes.

Table 2. Distribution of L119F-GSTe2 genotypes between mated males, mated females and unmated males compared to indoor collected females.

Phenotypes	Genotypes		
	119F/F-RR	119L/F-RS	L/L119-SS
Mated	4 (19%)	2 (10%)	15 (71%)
Unmated males	14 (16%)	33 (36%)	44 (48%)
Mated females	7 (33%)	4 (19%)	10 (48%)
Indoor females	13 (10%)	42 (33%)	72 (57%)
Allele	119F		L119
Mated males	23.8%		76.2%
Unmated males	33.5%	/	66.5%
Mated females	42.9%		57.1%
Indoor females	26.8%		73.2%

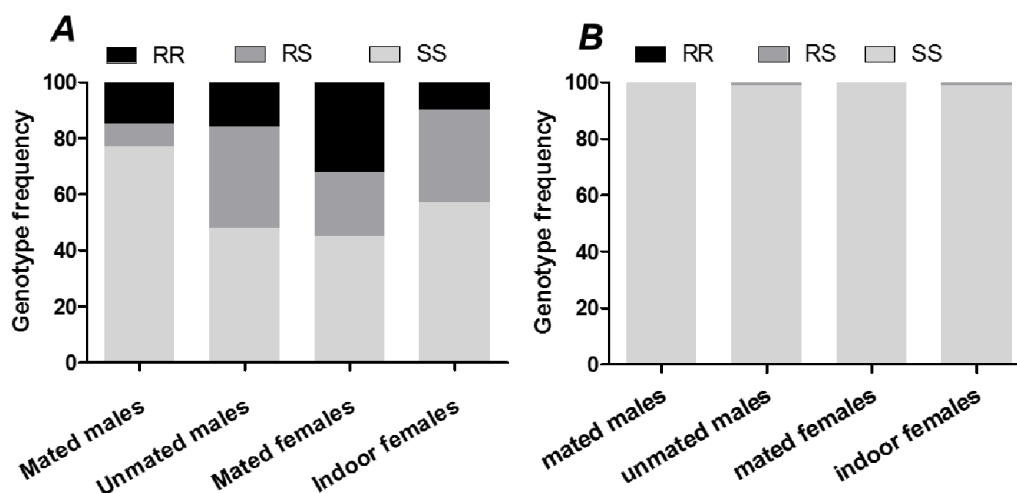


Figure 3. Distribution of resistance markers in *An. funestus* in Tibati between coupled males, uncoupled males and coupled females. (A) L119F-GSTe2 genotypes and (B) A296S-RDL genotypes.

Species composition and their contribution to malaria transmission in Tibati

An. funestus s.s was the dominant vector in during the study coinciding with the dry season where the presence of large and permanent breeding sites as the lakes and the rivers facilitate the proliferation of this species contrary to *An. gambiae s.l*³⁵. A contrasted sporozoite infection rate between both species was noticeable with high rates in *An. gambiae s.l* (12.5%), but low for *An. funestus s.s* (2.9%). The significant difference between the two species is not commonly seen in Cameroon^{35,36} or DR Congo³⁷, as both species tend to present similar infection rates. It could be that the difference observed here is due to the ecological dynamic between the two species as it is possible that due to favorable conditions for *An. funestus*, there is an expansion of the populations of this species with more young individuals, whereas *An. gambiae s.l* population is made of older individuals in which the *Plasmodium* parasite has already completed its full extrinsic cycle since collection was done during the dry season.

High level of insecticide resistance in malaria vectors in Tibati

This study revealed a high level of resistance to multiple insecticide classes in *An. funestus s.s* and *An. gambiae s.l* which, together with their high level of *Plasmodium* infection rate, calls for urgent actions to be taken to control malaria in this region as in Cameroon. Both malaria vectors were highly resistant to pyrethroids, the only insecticide class recommended for bed nets³. *An. gambiae* were also found to be resistant to pyrethroids and DDT. This resistance profile is similar to that observed in Cameroon^{25,38}, and in Central Africa as recently reported in DR Congo³⁷. Similar observations were also reported in Kenya, Madagascar, Tanzania and Uganda³⁹⁻⁴² where this species was highly resistant to these insecticides. The Tibati *An. funestus* population was also resistant to pyrethroids and DDT, almost at the same level as *An. gambiae*. *An. funestus* mosquitoes

Table 3. Distribution of A296S-RDL between mated males, mated females and unmated males compared to indoor collected females.

Phenotypes	Genotypes		
	296S/S-RR	A296S -RS	A/A296 -SS
Mated males	0	0	21
Unmated males	0	1	95
Mated females	0	0	17
Indoor females	0	1	126
Allele	296S		A296
Mated	0%		100%
Unmated males	0.52%	/	99.48%
Mated females	0%		100%
Indoor females	0.40%		99.60%

Table 4. Assessment of the association of different genotypes at L119F-GSTe2 mutation with mating success; *, significant difference.

Genotypes	L119F-GSTe2	
	Odds ratio	P-value
SS vs RR	1.77 (0.77–3.77)	0.22
SS vs RS	7.2 (3.1–16.8)	<0.0001*
RR vs RS	4.2 (1.49–11.9)	0.010*
S vs R	2.1 (1.1–4.0)	0.03*

showed some level of resistance to carbamates: bendiocarb and propoxur similar to reports in Northern Cameroon⁴³. The common used Olyset and Permanet 2.0 LLINs presented a very low bioefficacy against *An. funestus* in cone assays. The low efficacy of this two nets, treated with permethrin and deltamethrin only, is wide-spread in *An. funestus* populations across the continent^{33,37,44}. This loss of efficacy of these pyrethroid-only nets correlates well with the very high permethrin and deltamethrin resistance observed for this species. However, the greater efficacy with PBO-based nets (OlysetPlus and PermaNet 3.0) possibly provides an alternative solution to control this species for which resistance is mainly metabolic with an important role played by cytochrome P450 as shown by the synergist PBO assay. However, the spread or increased frequency of GSTe2-mediated resistance could limit the efficacy of such PBO-nets in the future. This is supported by the only partial recovery of susceptibility observed with (Olyset Plus), coupled with the increased mortality with the DEM synergist assay. The impact of GST-mediated resistance on efficacy of PBO-based nets will need to be assessed particularly in situations where such mechanism become predominant, as reported in Benin^{11,45}.

Swarming habits and behaviour of *An. funestus*

We observed in both Mibellon and Tibati that the heights of swarms were around 2.5m from the ground. This is in line with findings of Charlwood *et al.* in Mozambique⁴⁶, and Zawada in Zambia⁴⁷ where they noticed that *An. funestus* swarmed 2–4m from the ground. However, Harper in one study observed that *An. funestus* swarms occur immediately inside the threshold of a hut, and swarming occurred a foot off the ground⁴⁸. Since molecular analysis were not conducted in the study of Harper, it's possible that mosquitoes he collected in the swarms was another member of the *An. funestus* group. There is also the possibility that depending on environmental conditions, *An. funestus* have changed its swarming behaviour and position. However, future studies in other locations are required to address this variation in *An. funestus* mating behaviour.

Swarming behaviour of *An. funestus* in this study was also different to that reported for *An. gambiae*. It is reported that members of the *An. gambiae* complex swarm around markers such as brick piles, rice fields, banana trees, burnt ground, garbage heaps and ant hills^{49,50}, however, *An. funestus* swarms we observed in this study appeared to avoid ground markers. As observed in Nchelenge, Zambia⁴⁷, there was no clear physical marker for *An. funestus* swarm's position in Tibati, but the most common place for swarming were empty spaces close to habitations, and most of the swarm locations remained the same for several days. This supports the suggestion of Charlwood *et al.* that mosquitoes of *An. gambiae* complex and *An. funestus* have different swarm markers.

As reported in other studies^{12,50}, mosquito swarms in Tibati occurred perpetually in the same locations at approximately the same time each day. This phenomenon needs to be assessed in other parts of Africa, which may allow the swarm to be targeted as an alternative control measure for malaria prevention. It is also unknown if *An. funestus* mate in fewer large swarms or in multiple small swarms. The number of mosquitoes in swarms as reported by Charlwood *et al.*⁴⁶ were also relatively low, and on average less than 50 adults/swarm in Mibellon. In contrast, as reported by Harper⁴⁸, about 300–500 mosquitoes were present in each swarm in Tibati during the collecting period.

Association between GSTe2-mediated metabolic resistance and mating success of *An. funestus*

This study revealed a negative impact of L119F-GSTe2 DDT/pyrethroid resistance on the mating competitiveness of males *An. funestus* as possessing the 119F resistant allele reduced the likelihood of mating. This is the first report of such negative impact of metabolic resistance on the mating success of field malaria vectors. The reduced fitness of L119F resistant mosquitoes observed in this study may suggests that the L119F mutation in the *GSTe2* gene potentially affects some physiological traits in resistant mosquitoes including mobility, perception of stimuli or even the olfactory system as the target site resistance^{4,5}. However, heterozygote mosquitoes were more affected by this negative impact than homozygote resistant individuals suggesting a heterozygote disadvantage effect. In contrast, the study conducted in Vallée du Kou in Burkina Faso on the male

of *An. coluzzii* mosquitoes reported a heterozygote advantage for the target site resistance mechanisms. It was observed that *kdr* heterozygote males were more likely to mate than homozygote resistant counterparts and heterozygote RDL_R/RDL_S were also more likely to mate than homozygote-resistant males. It may be that heterozygote individuals are not affected in the same way by target site mutation and metabolic resistance driven by *GSTe2* enzymes. To confirm the lower mating ability of heterozygote mosquitoes compared to other genotypes as observed in this study, more work is needed in other locations to confirm such heterozygote disadvantage effect as the low sample size of L119F-RR homozygote resistant mosquitoes here could have impacted the assessment. Various studies conducted in other insect species on the impact of resistance on mating competitiveness showed that this trait of mosquitoes is not affected similarly. Resistant males displayed either a similar [e.g. *Metaseiulus occidentalis*:⁵¹], a lower [(e.g. *Anopheles gambiae*:⁶)] or a higher [(e.g. *Anopheles albimanus*:⁵²; *Tribolium castaneum*:⁵³] mating success when compared to the susceptible counterparts. Platt *et al.* (2015) also revealed an additive mating disadvantage in male homozygotes for both *kdr*/RDL-resistant alleles. However, because of the low frequency of RDL it was not possible to assess the cumulative impact of target site (RDL) with metabolic (*GSTe2*), although this could be interesting to do in the future in populations where both types of mechanisms co-exist.

It has previously been reported that metabolic resistance mechanisms, such as the overproduction of carboxylesterases as observed in resistant *C. pipiens*, could confer a significant fitness cost on mosquitoes life-traits. It was noticed in this species that resistant individuals displayed a reduced locomotive performance compared to the susceptible ones. It was suggested that such reduced performance was caused by a resource depletion linked to the overproduction of carboxylesterases⁵⁴. Prior to this study the only report of the impact of metabolic resistance on mating ability of malaria vector was conducted in 2015 in *An. gambiae*. Mating competitiveness in this species was not found to be significantly influenced by metabolic resistance mechanisms. However, that study¹⁰ did not use a molecular marker for metabolic resistance, but a genome-wide microarray-based transcription analysis. The reduced performance of resistant mosquitoes in mating could contribute to slow the speed of increase in the frequency of resistant alleles in

the wild, and will also prevent or delay the fixation of the resistance genes in the population. It is thus necessary that such studies are extended for other metabolic resistance mechanisms and in other locations with larger sample sizes in order to help implement successful management strategies.

Conclusion

This study revealed a high and multiple resistance to insecticides, coupled with low efficacy of LLINs without PBO in *An. Funestus*, highlighting the threat that insecticide resistance poses on the efficacy of existing vector control tools. Interestingly, this study revealed that *An. funestus* swarms can be detected and characterized in the field providing the opportunity for mating swarms of this species to be targeted to implement alternative vector control strategies. Furthermore, this study provides preliminary evidences that metabolic resistance potentially exerts a fitness cost on mating competitiveness in resistant mosquitoes. As a negative fitness costs could influence the evolution of insecticide resistance in field populations of mosquitoes like the speed of increase or reversal to susceptibility in vector populations it is crucial that such impacts are understood and taken into consideration when designing and implementing future insecticide resistance management strategies.

Data availability

Underlying data

Underlying data is available from Open Science Framework

OSF: Dataset 1. Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/QD8P955>

Licence: [CC0 1.0 Universal](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Grant information

This study was funded by the Wellcome Trust through a Senior Research Fellowship awarded to CSW [101893].

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- World Health Organization: **World Malaria report 2018**. 2018. [Reference Source](#)
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, *et al.*: **The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015**. *Nature*. 2015; **526**(7572): 207–211. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- WHO: **Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM)**, 2012. [Reference Source](#)
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, *et al.*: **Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?** *PLoS Pathog*. 2010; **6**(8): e1001000. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Alout H, Dabiré RK, Djogbénu LS, *et al.*: **Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae***. *Sci Rep*. 2016; **6**: 29755. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Rowland M: **Activity and mating competitiveness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and**

- An.stephensi** mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Med Vet Entomol.* 1991; 5(2): 207–22.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
7. Arnaud L, Haubruge E: Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution.* 2002; 56(12): 2435–44.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 8. Higginson DM, Morin S, Nyboer ME, et al.: Evolutionary trade-offs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: fitness cost affecting paternity. *Evolution.* 2005; 59(4): 915–20.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 9. Tchouakui M, Riveron JM, Djonabaye D, et al.: Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles Funestus*. *Genes (Basel).* 2018; 9(12): pii: E645.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 10. Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, et al.: Target-site resistance mutations (*kdr* and *RDL*), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity (Edinb).* 2015; 115(3): 243–52.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 11. Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, et al.: A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol.* 2014; 15(2): R27.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 12. Downes JA: The Swarming and Mating Flight of Diptera. *Annu Rev Entomol.* 1969; 14(1): 271–98.
[Publisher Full Text](#)
 13. Yuval B: Mating systems of blood-feeding flies. *Annu Rev Entomol.* 2006; 51: 413–40.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 14. Charwood JD, Pinto J, Sousa CA, et al.: The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from São Tomé Island. *J Vector Ecol.* 2002; 27(2): 178–83.
[PubMed Abstract](#)
 15. Diabate A, Baldet T, Brengues C, et al.: Natural swarming behaviour of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97(6): 713–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 16. Assogba BS, Djogbénou L, Saizonou J, et al.: Characterization of swarming and mating behaviour between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles melas* in a sympatric area of Benin. *Acta Trop.* 2014; 132 Suppl: S53–63.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 17. Kaindoa EW, Ngowo HS, Limwagu A, et al.: New evidence of mating swarms of the malaria vector, *Anopheles arabiensis* in Tanzania [version 1; referees: 1 approved, 2 approved with reservations]. *Wellcome Open Res.* 2017; 2: 88.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 18. Sawadogo SP, Niang A, Bilgo E, et al.: Targeting male mosquito swarms to control malaria vector density. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0173273.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 19. Charwood JD, Jones MDR: Mating in the mosquito, *Anopheles gambiae* s.l. II. Swarming behaviour. *Physiol Entomol.* 1980; 5(4): 315–20.
[Publisher Full Text](#)
 20. Diabaté A, Dabire RK, Kengne P, et al.: Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J Med Entomol.* 2006; 43(3): 480–3.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 21. Howell RT, Pchelin P, Iyer R: The preference for experiences over possessions: Measurement and construct validation of the Experiential Buying Tendency Scale. *J Posit Psychol.* 2012; 7(1): 57–71.
[Publisher Full Text](#)
 22. Dabiré KR, Baldet T, Diabaté A, et al.: *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol.* 2007; 44(6): 990–7.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 23. Dabiré KR, Sawadogo PS, Hien DF, et al.: Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso City, Burkina Faso, West Africa. *Acta Trop.* 2014; 132 Suppl: S35–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 24. Cohuet A, Dia I, Simard F, et al.: Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon, Central Africa, and its relevance in malaria fighting. *Genetics.* 2005; 169(1): 301–11.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 25. Antonio-Nkondjio C, Sonhafouo-Chiana N, Ngadjieu CS, et al.: Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1): 472.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 26. Morgan JC, Irving H, Okedi LM, et al.: Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One.* 2010; 5(7): e11872.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 27. Livak KJ: Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics.* 1984; 107(4): 611–34.
[PubMed Abstract](#) | [Free Full Text](#)
 28. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, et al.: Insertion polymorphisms of *SINE200* retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008; 7: 163.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 29. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, et al.: A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(6): 804–11.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 30. Bass C, Nikou D, Blagborough AM, et al.: PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J.* 2008; 7: 177.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 31. WHO: Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2013.
[Reference Source](#)
 32. Irving H, Wondji CS: Investigating knockdown resistance (*kdr*) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genet.* 2017; 18(1): 76.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 33. Riveron JM, Chiumia M, Menze BD, et al.: Rise of multiple insecticide resistance in *Anopheles funestus* in Malawi: a major concern for malaria vector control. *Malar J.* 2015; 14: 344.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 34. Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, et al.: Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J.* 2007; 6: 111.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 35. Cohuet A, Simard F, Wondji CS, et al.: High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol.* 2004; 41(5): 901–5.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 36. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, et al.: High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol.* 2002; 39(2): 350–5.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 37. Riveron JM, Watsenga F, Irving H, et al.: High *Plasmodium* Infection Rate and Reduced Bed Net Efficacy in Multiple Insecticide-Resistant Malaria Vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J Infect Dis.* 2018; 217(2): 320–8.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 38. Fossog Tene B, Poupardin R, Costantini C, et al.: Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61408.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 39. Wanjala CL, Mbugi JP, Ototo E, et al.: Pyrethroid and DDT Resistance and Organophosphate Susceptibility among *Anopheles* spp. Mosquitoes, Western Kenya. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(12): 2178–81.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 40. Rakotoson JD, Fornadel CM, Belemvire A, et al.: Insecticide resistance status of three malaria vectors, *Anopheles gambiae* (s.l.), *An. funestus* and *An. mascarensis*, from the south, central and east coasts of Madagascar. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1): 396.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 41. Kisinza WN, Nkya TE, Kabula B, et al.: Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from Tanzania: a major concern for malaria vector control. *Malar J.* 2017; 16(1): 439.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 42. Okia M, Hoel DF, Kirunda J, et al.: Insecticide resistance status of the malaria mosquitoes: *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in eastern and northern Uganda. *Malar J.* 2018; 17(1): 157.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 43. Menze BD, Riveron JM, Ibrahim SS, et al.: Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PLoS One.* 2016; 11(10): e0163261.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 44. Riveron JM, Osae M, Egyir-Yawson A, et al.: Multiple insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in southern Ghana: implications for malaria control. *Parasites Vectors.* 2016; 9(1): 504.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 45. Djouaka R, Riveron JM, Yessoufou A, et al.: Multiple insecticide resistance in an infested population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasit Vectors.* 2016; 9: 453.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 46. Charwood JD, Thompson R, Madsen H: Observations on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* from southern Mozambique. *Malar J.* 2003; 2: 2.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 47. Zawada JW, Dahan-Moss YL, Muleba M, et al.: Molecular and physiological

- analysis of *Anopheles funestus* swarms in Nchelenge, Zambia. *Malar J.* 2018; 17(1): 49.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
48. Harper J: Note on the swarming of males of *Anopheles funestus* Giles in East Africa. *E Afr Med J.* 1944; 21: 150–1.
[Reference Source](#)
49. Diabaté A, Yaro AS, Dao A, *et al.*: Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol Biol.* 2011; 11(1): 184.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
50. Sawadogo PS, Namountougou M, Toé KH, *et al.*: Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 2014; 132 Suppl: S42–52.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
51. Roush RT, Hoy MA: Laboratory, Glasshouse, and Field Studies of Artificially Selected Carbaryl Resistance in *Metaseiulus occidentalis*. *J Econ Entomol.* 1981; 74(2): 142–7.
[Publisher Full Text](#)
52. Gilotra SK: Reproductive Potentials of Dieldrin-Resistant and Susceptible Populations of *Anopheles Albimanus* Wiedemann. *Am J Trop Med Hyg.* 1965; 14(1): 165–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
53. Arnaud L, Haubruge E: Mating Behaviour and Male Mate Choice in *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Behaviour.* 1999; 136(1): 67–77.
[Publisher Full Text](#)
54. Berticat C, Boquien G, Raymond M, *et al.*: Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res.* 2002; 79(1): 41–7.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
55. Tchouakui M, Wondji CS: Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males *Anopheles funestus*, African malaria vector. 2019. <http://www.doi.org/10.17605/OSF.IO/QD8P9>

- 4- TCHOUAKUI, M., MIRANDA, J. R., MUGENZI, L. M., DJONABAYE, D., WONDJI, M. J., TCHOUPPO, M., *et al.* **2020**. Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Heredity*, 124, 621-632.



Cytochrome P450 metabolic resistance (*CYP6P9a*) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*

Magellan Tchouakui^{1,2} · Jacob Riveron Miranda^{1,3} · Leon M. J. Mugenzi^{1,4} · Doumani Djonabaye^{1,5} · Murielle J. Wondji^{1,3} · Micareme Tchoupo¹ · Williams Tchappa¹ · Flobert Njiokou² · Charles S. Wondji^{1,3} 

Received: 21 October 2019 / Revised: 26 February 2020 / Accepted: 27 February 2020

© The Author(s), under exclusive licence to The Genetics Society 2020

Abstract

Metabolic resistance threatens the sustainability of pyrethroid-based malaria control interventions. Elucidating the fitness cost and potential reversal of metabolic resistance is crucial to design suitable resistance management strategies. Here, we deciphered the fitness cost associated with the *CYP6P9a* (P450-mediated metabolic resistance) in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. Reciprocal crosses were performed between a pyrethroid susceptible (FANG) and resistant (FUMOZ-R) laboratory strains and the hybrid strains showed intermediate resistance. Genotyping the *CYP6P9a*-R resistance allele in oviposited females revealed that *CYP6P9a* negatively impacts the fecundity as homozygote susceptible mosquitoes (*CYP6P9a*-SS) lay more eggs than heterozygote (OR = 2.04; $P = 0.01$) and homozygote resistant mosquitoes. *CYP6P9a* also imposes a significant fitness cost on the larval development as homozygote resistant larvae (*CYP6P9a*-RR) developed significantly slower than heterozygote and homozygote susceptible mosquitoes ($\chi^2 = 11.2$; $P = 0.0008$). This fitness cost was further supported by the late pupation of homozygote resistant than susceptible mosquitoes (OR = 2.50; $P < 0.01$). However, *CYP6P9a* does not impact the longevity as no difference was observed in the life span of mosquitoes with different genotypes ($\chi^2 = 1.6$; $P = 0.9$). In this hybrid strain, a significant decrease of the resistant *CYP6P9a*-RR genotype was observed after ten generations ($\chi^2 = 6.6$; $P = 0.01$) suggesting a reversal of P450-based resistance in the absence of selection. This study shows that the P450-mediated metabolic resistance imposes a high fitness cost in malaria vectors supporting that a resistance management strategy based on rotation could help mitigate the impact of such resistance.

Associate editor: Gerald Heckel

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41437-020-0304-1>) contains supplementary material, which is available to authorised users.

✉ Magellan Tchouakui
magellan.tchouakui@crid-cam.net

✉ Charles S. Wondji
charles.wondji@lstmed.ac.uk

¹ Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), P.O. Box 13501, Yaoundé, Cameroon

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

Background

Malaria control relies mainly on insecticide-based interventions, notably pyrethroid-based long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS). Significant efforts have been made globally to eliminate malaria leading to consistent reduction in malaria cases and mortality in Africa by 42% and 66%, respectively (Bhatt et al. 2015; Riveron et al. 2018). However, increasing insecticide

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

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, University of Buea, P.O. Box 63, Buea, Cameroon

⁵ Pharmacology and Toxicology Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

resistance in malaria vector species presents a major challenge to these vector control interventions and likely contributed to the increase in malaria incidence in the last 2 years (WHO 2018). To sustain the effectiveness of these interventions it is imperative to implement suitable insecticide resistance management (IRM) strategies to reduce the negative impact of such resistance. IRM strategies such as rotation of insecticide classes, rely on resistance alleles having a fitness cost inducing a selection against resistance alleles in the absence of insecticide selection pressure. Therefore, understanding the fitness cost that selection can act against mosquitoes is a key pre-requisite to effective IRM. Since pyrethroids are by far the most widely used insecticide class and the main one recommended for the impregnation of bed nets, elucidating the fitness costs of molecular mechanisms conferring pyrethroid resistance in mosquitoes could guide suitable control measures for malaria prevention.

The two main mechanisms driving pyrethroid resistance are target-site resistance (e.g., knockdown resistance, *kdr*) and metabolic resistance through over-expression of detoxification enzymes (e.g., cytochrome P450s, glutathione S-transferases and esterases) (Ranson et al. 2011; Riveron et al. 2018). Target-site resistance through *kdr* is well characterised, and the DNA-based diagnostic tools, were designed in the late 1990s (Martinez-Torres et al. 1998; Ranson et al. 2000). This allowed studying the fitness cost of target-site resistance on different life traits in a range of mosquito species including their reproduction, developmental time of immature stages, adult longevity and vector competence (Alout et al. 2016; Alout et al. 2014; Assogba et al. 2015; Brito et al. 2013; Martins et al. 2012). These studies highlighted that resistant vectors may have lower mating success, lower fecundity and fertility, higher developmental time and reduced longevity. The presence of such fitness costs that can impact the spread and persistence of resistance alleles in the vector populations is a pre-requisite for the implementation of most IRM strategies including rotation of insecticides. In contrast, metabolic resistance, a very common resistance mechanism in mosquitoes and considered to be more likely to cause control failure (Hemingway 2014), still had no molecular diagnostic tools, despite progress made in elucidating its molecular basis (Edi et al. 2014; Ibrahim et al. 2015; Mitchell et al. 2012; Riveron et al. 2013). This has prevented assessment of the fitness cost associated with this resistance mechanism and consequently hampered the design of suitable resistance management strategy to control malaria vectors. However, recent progress has been made in detecting key markers of metabolic resistance in major malaria vectors including for glutathione S-transferase mediated resistance such as the L119F-GSTe2 marker in *Anopheles funestus* (Riveron et al. 2014) and the

I114T-GSTe2 in *An. gambiae* (Mitchell et al. 2012). The design of the L119F-GSTe2 diagnostic tool recently allowed assessment of the fitness cost of GST-based metabolic resistance revealing significant cost in the GST-resistant mosquitoes, although also revealing that they live longer (Tchouakui et al. 2018) and are more infected with *Plasmodium* (Tchouakui et al. 2019). Recently, major progress was also made in detecting molecular marker for cytochrome P450-based resistance with the detection of *cis*-regulatory variants driving the expression of the major pyrethroid resistance gene *CYP6P9a* in *An. funestus* (Weedall et al. 2019). The simple PCR-RFLP assay designed has already helped to demonstrate that pyrethroid resistance is reducing the efficacy of LLINs as resistant mosquitoes were shown to significantly survive exposure to these nets and also blood fed more than the susceptible ones (Weedall et al. 2019). This diagnostic tool also provides an opportunity to assess the fitness cost of P450-mediated metabolic resistance in malaria vectors. *An. funestus* is particularly a suitable vector for assessing the impact of metabolic resistance as this mechanism is the main cause of pyrethroid resistance with the absence of *kdr* mutations consistently reported in populations of this malaria vector throughout Africa (Amenya et al. 2008; Okoye et al. 2008; Wondji et al. 2011; Riveron et al. 2013; Irving and Wondji 2017). One of the limitation of the studies on fitness cost is the use of resistant and susceptible strains from different geographical origins as they may differ in many other genes than those involved in resistance. For this reason, to minimise the effect of the genetic background on related fitness parameters, we proceeded by a crossing between the resistant and the susceptible strains so that the genetic background of the resistant strain is shared with that of the susceptible one as described elsewhere (Amin and White 1984; Argentine et al. 1989).

We elucidated the fitness cost of P450-based metabolic resistance on life traits of the malaria vector *An. funestus*, to better inform the design of suitable resistance management strategies against malaria vectors. This revealed a significant negative impact on fecundity and larval development of resistant mosquitoes *CYP6P9a-RR* while demonstrating a significant reduction of the frequency of resistant allele in the absence of selection.

Methods

Establishment of the mosquito strains

Reciprocal crosses were performed in January 2017 between FANG and FUM0Z-R, two *An. funestus* laboratory strains for several generations in order to bring the *CYP6P9a* resistance into a susceptible genetic background.

FUMOSZ-R is a pyrethroid (permethrin) resistant selected strain originates from southern Mozambique (FUMOSZ-R) (Hunt et al. 2005) and kept in colony since July 2001. This strain was selected based on its resistance status after 1 h exposure to permethrin after WHO bioassays (WHO 1998) and currently exhibits 0% mortality at 0.75% permethrin exposure. The FANG strain originates from southern Angola and kept in colony since January 2003 and is fully susceptible to all major vector control insecticides. Previous studies have shown that the *CYP6P9a* alleles conferring resistance in southern Africa is fixed in the FUMOSZ-R strain, whereas it is absent in FANG (Weedall et al. 2019). To perform the crossing, pupae of each strain were collected and put individually in 15 ml falcon tubes for individual emergence then, the males of the resistant strain were mixed into a same cage with the females of the susceptible colony (and reciprocally) for random mating to generate the first generation.

Mosquito's rearing

In each generation, eggs obtained from the crosses between both strains were transferred in paper cups containing mineral water for hatching. These eggs were flushed each day with mineral water and 2–3 days post-hatching, larvae obtained were transferred in larvae bowl and reared in mineral water with Tetramin® baby fish food everyday as described previously (Morgan et al. 2010). Water of each larvae bowl was changed every 2 days. The F_1 adults generated were randomly mixed in cages and fed with 10% sugar solution for crossing and production of the next generation. In each generation, after emergence of the adults, mosquitoes were let to randomly mate in cages for 5 days and blood fed three times before been allowed to lay eggs for the next generation. After the initial F_1 generation obtained from the reciprocal crosses, the hybrid strain FANG/FUMOSZ-R (hybrid stain from female FANG and males FUMOSZ-R) was reared till F_{10} generation in order to assess the fitness cost and a potential reversal of resistance.

Susceptibility profile of the hybrid FANG/FUMOSZ-R strain and validation of the implication of *CYP6P9a* in the resistance

WHO bioassays were carried out to assess the susceptibility profile of the two reciprocal hybrid strains for pyrethroids (0.75% permethrin and 0.05% deltamethrin), DDT (4%) and the carbamate bendiocarb (0.1%). The bioassays were performed according to WHO protocol (WHO 2013). In order to investigate the correlation between the *CYP6P9a* marker and pyrethroid resistance, additional bioassays were conducted with permethrin and deltamethrin for 30 min and 90 min. Alive mosquitoes after 90 min of exposure and

those dead after 30 min of exposition were then genotyped to establish the association between the *CYP6P9a-R* resistant allele and the ability of mosquitoes to survive to these insecticides.

Life traits experiments

All parameters were evaluated by simultaneously comparing fitness parameters between homozygotes resistant (*CYP6P9a-RR*), heterozygotes (*CYP6P9a-RS*) and homozygote susceptible (*CYP6P9a-SS*), reared together in the same containers and under the same environmental conditions such as larval density and feeding, temperature and light cycle.

Fecundity and fertility

In the 4th generation (F_4), after 4–5 days of mating in cages, females were blood fed three times and given 4 days to become fully gravid. Fully gravid-females were put individually in 1.5 ml Eppendorf tubes with damp filter paper to enable them to lay eggs as previously described (Morgan et al. 2010). The number of eggs laid per female and the number of larvae obtained after hatching were recorded. As a Shapiro–Wilk normality test showed non-normal distribution of eggs, the impact of resistance on fecundity was assessed by comparing the median number of eggs laid by different genotypes using a Kruskal–Wallis non-parametric test. In addition, odds ratio for oviposition between *CYP6P9a-RR*, *CYP6P9a-SS* and *CYP6P9a-RS* was also assessed using a statistical significance calculation based on the Fisher's exact probability test. The impact of resistance on fertility was assessed by comparing the hatch rate between the *CYP6P9a* genotypes using a Chi square test.

Larval and pupal development

After recording the total number of larvae produced per female, all larvae comprising the three *CYP6P9a* genotypes were pooled and reared together in the same larvae bowl, thus avoiding variation in environmental conditions. This experiment was performed in three replicates of ten trays per replicate and all immature stages were reared in the standard insectary condition. In order to prevent overcrowding and competition for food, larval bowls used were large enough to accommodate all larvae. The number of larvae varied between 200 and 300 per tray and water was changed every 2 days in each tray to minimise the effect of pollution from the food according to Morgan et al. (2010). Changes in the time of development of immature stages and mortality rates was equally assessed by genotyping about 100 larvae at different stages (L1, L2, L3 and L4). For this purpose, genotype frequency was monitored in each stage

of development. The dynamic of pupae formation was evaluated by comparing the genotype and allele frequencies from the first day of pupation (pupae day 9), in the third day of pupation (pupae day 11) and in the fifth day of pupation (pupae day 13). Chi-squared and odds ratio with Fisher's exact test were used to assess significance of the difference in genotype distribution between larval stages and pupae obtained at different time-points.

Adult longevity

After emergence of adults, a set of about 150 mosquitoes was removed from the cages at different time-points (day 1, 10, 20 and 30 after emergence). On average, 100 mosquitoes were used for genotyping whereas three pools of ten mosquitoes each were used to assess the gene expression level of *CYP6P9a* at each time-point. The life span of homozygous resistant adult mosquitoes was compared with that of susceptible and heterozygotes (RS) mosquitoes by assessing the frequency of *CYP6P9a* genotypes/alleles and the expression level of *CYP6P9a* (qRT-PCR) at different time-points.

Population cage experiments to assess a potential reversal to susceptibility

The dynamics of *CYP6P9a*-R resistant allele frequency in the absence of insecticide pressure was assessed using cage experiments. After crossing between female FANG and male FUMOZ-R, the progeny obtained were let in cages for intercrosses for ten generations. In each generation, all mosquitoes irrespective of their genotypes were randomly mixed in cages for intercrossing to generate the next generation. Each generation consisted in about three cages of at least 200 mosquitoes/cage of mixed genotypes. In the first generation, the frequency of the *CYP6P9a*_R resistant allele was assessed and then monitored in following generations by genotyping a set of about 75 females aged between 2 and 5 days old.

Genotyping of the *CYP6P9a* resistance allele using PCR-RFLP

Genomic DNA was extracted from adult mosquitoes and all larval and pupal stages using the Livak method (Livak 1984). The genotyping of *CYP6P9a* resistance allele was done using PCR-RFLP method as recently described (Weedall et al. 2019). The RFLP6P9aF forward primer, 5'-TCC CGA AAT ACA GCC TTT CAG-3' and RFLP6P9aR 5'-ATT GGT GCC ATC GCT AGA AG-3' reverse primers are used in the first step amplification of the partial *CYP6P9a* upstream region. PCR reactions were carried out on genomic DNA from individual mosquitoes.

The final 15 μ l PCR mixture contained 1.5 μ l of 10X KAPA Taq buffer A (KAPA Biosystems), 0.12 μ l of 5 U/ μ l KAPA Taq polymerase, 0.12 μ l of 25 μ M dNTP, 0.75 μ l of 25 μ M MgCl₂, 0.51 μ l of each primer, 10.49 μ l of dH₂O, and 1 μ l of genomic DNA. The PCR parameters were 95 °C for 5 min and 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, followed by a final extension step of 72 °C for 10 min. The size of PCR products was obtained on 1.5% agarose gel stained with Midori Green Advance DNA Stain (Nippon genetics Europe GmbH, Dueren, Germany) and visualised using a gel imaging system to confirm the product size (450 bp). For the second step, the TaqI enzyme (restriction site (5'-TCGA-3')) was used to digest the PCR product and detect the *CYP6P9a*_R resistant allele as previously described (Weedall et al. 2019). For this second step, 10 μ l of the digestion mix is made using 1 μ l of CutSmart buffer, 0.2 μ l of 2 units of TaqI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 5 μ l of PCR product, and 3.8 μ l of dH₂O. The mix was incubated at 65 °C for 2 h and the product separated on 2.0% agarose gel stained with Midori Green. After this second step, *CYP6P9a*-RR displays one band at 350 bp, the *CYP6P9a*-SS showed one band as well at 450 bp whereas heterozygotes individuals present both bands.

Expression profile of *CYP6P9a* and adult longevity using qRT-PCR

The quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) was performed to assess the expression level of *CYP6P9a* from day 1 to day 30. Total RNA from three biological replicates (ten mosquitoes each) from day 1, day 10, day 20 and day 30 after adult emergence was extracted using the Picopure RNA Isolation Kit (Arcturus). One micrograms of RNA from each of the three biological replicates at each time-point, and FANG (full susceptible strain) was used as a template for cDNA synthesis using the superscript III (Invitrogen) with oligo-dT20 and RNase H, following the manufacturer's instructions. The qRT-PCR was carried out in a MX3005 real-time PCR system (Agilent) using Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent). A total of 10 ng of cDNA from each sample was used as template in a three-step programme involving a denaturation at 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 10 s at 60 °C and a last step of 1 min at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 95 °C as previously described (Kwiatkowska et al. 2013; Riveron et al. 2013). The relative expression level and fold-change (FC) of *CYP6P9a* in each time-point relative to the susceptible strain was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen and Livak 2008) after normalisation with the housekeeping genes ribosomal protein S7 (RSP7; AFUN007153) and actin 5C (AFUN006819).

Results

Susceptibility profiles of the FUMOZ-R/FANG and FANG/FUMOZ-R strains

Bioassays conducted on the F₄ mosquitoes from the reciprocal crosses between females FANG/males FUMOZ-R (FANG/FUMOZ-R) and females FUMOZ-R/males FANG (FUMOZ-R/FANG) strains revealed that both hybrid strains were resistant to pyrethroids and carbamates as previously described by Weedall et al. (2019). Both strains were moderately resistant to DDT (93% mortality). For deltamethrin, a higher mortality rate was recorded for the strain generated from the crossing between females FUMOZ_R and males FANG (48.5% mortality) compared with the strain obtained from females FANG and males FUMOZ_R (77.3%) (Fig. S1). For bendiocarb (carbamate), the resistance pattern was similar in both reciprocal strains (Weedall et al. 2019).

Validation of the role of the *CYP6P9a* metabolic resistance in the observed pyrethroid resistance

Assessment of the differential expression of *CYP6P9a* in the hybrid strain after exposure to permethrin and deltamethrin revealed that the expression level of this gene was as followed: permethrin alive: FC = 16.6 ± 4.7 , $P = 0.01$; deltamethrin alive: FC = 8.8 ± 4.7 , $P = 0.04$ and unexposed mosquitoes FC = 7.9 ± 2.12 , $P = 0.01$. For both groups, this level of expression was significantly high compared with the susceptible strain FANG supporting that *CYP6P9a* plays a role in the resistance observed (Fig. 1b). Furthermore, the level of expression did not differ significantly between exposed and unexposed mosquitoes (Fig. 1a) showing that the gene is constitutively expressed in this line. To validate the role of the recently discovered CYP6P9a_R resistant

allele in the observed pyrethroid resistance we assessed the correlation between this allele and the ability of mosquitoes to survive after exposure. Mortality rates of 39.0% and 42.3% after 3-min exposure and mortality of 81.3% and 86.3% after 90-min exposure were obtained for permethrin and deltamethrin, respectively (Fig. 1c). Genotyping of the dead mosquitoes after 30-min exposure and the alive after 90-min exposure to these insecticides as previously described showed that the ability of homozygotes resistant mosquitoes to survive after exposition was higher compared with the homozygous susceptible (SS) as recently also described (Weedall et al. 2019).

Influence of the CYP6P9a_R on the fecundity/fertility of female mosquitoes

No significant difference was observed in the distribution of genotypes between females which have successfully laid eggs after blood feeding and those which did not laid eggs ($\chi^2 = 4.3$; $df = 2$; $p > 0.1$). However, a higher but not significant ($\chi^2 = 1.65$; $p = 0.19$) frequency of CYP6P9a_R resistant allele was observed in non-oviposited females (39%) compared with the oviposited females (33%). Assessment of the odd ratio (OR) for oviposition between homozygote resistant (RR) mosquitoes, SS and RS mosquitoes using Fisher's exact probability test revealed that the ability of SS mosquitoes to lay eggs was higher compared with RS (OR = 2.04; confidence interval (CI) 95%: 1.1–3.8; $p = 0.01$). The same trend was observed when compared with RR although not significant (OR = 2.0; CI 95%: 0.7–5.7; $p = 0.15$) (Fig. 2a, b) suggesting that mosquitoes harbouring the resistant allele have less chance to lay eggs compared with those with the susceptible allele. RS mosquitoes displayed the same ability of oviposition than RR (OR = 1; CI 95%: 0.4–2.6; $p = 0.57$)

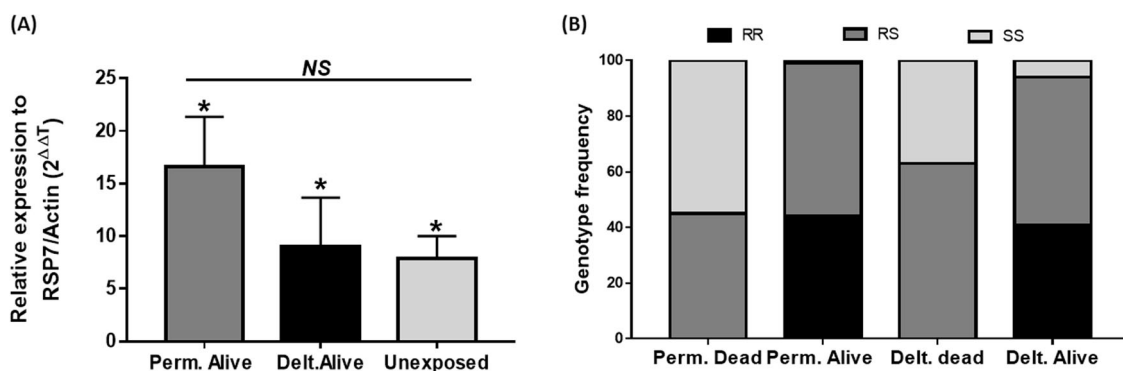


Fig. 1 Validation of the implication of *CYP6P9a* in the resistance to pyrethroids. **a** Differential expression by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction of *CYP6P9a* in the hybrid strain after exposition to permethrin and deltamethrin compared with the susceptible strain FANG; An asterisk indicates significant high differential expression of *CYP6P9a* gene in comparison with

susceptible strain, NS not significant. **b** Distribution of the *CYP6P9a* genotypes according to resistance phenotypes. FANG/FUMOZ-R represents a line obtained from the crossing between female FANG and male FUMOZ-R whereas FUMOZ-R/FANG represents a line obtained from the crossing between female FUMOZ-R and male FANG; Perm permethrin, Delt deltamethrin.

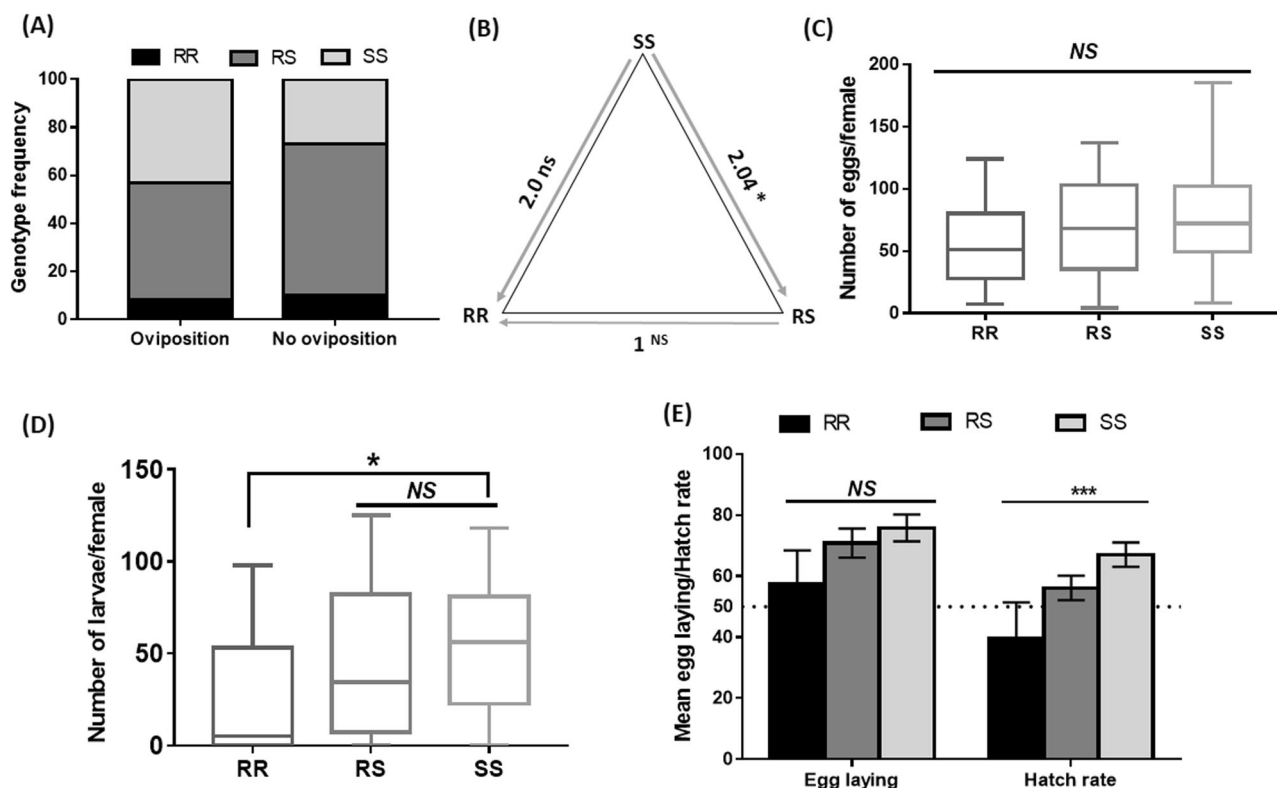


Fig. 2 Fecundity and fertility of females with different genotypes of the *CYP6P9a* gene. **a, b** Schematic representation of the impact of *CYP6P9a* genotypes on egg-laying success with odd ratio (OR). **c** Number of eggs laid by the *CYP6P9a*-RR, *CYP6P9a*-RS and *CYP6P9a*-SS genotypes. **d** Number of larvae generated by females from each genotype. **e** Comparison of the mean number of eggs laid and hatching rate between the three genotypes. Median value with

interquartile range is shown for each distribution. Dotted line indicates females for which at least 50 eggs or larvae were obtained. Difference between genotypes was not significant in term of eggs laying by Kruskal–Wallis non-parametric test whereas the number of larvae produced, and the hatch rate differed significantly. ***Significant difference at $p < 0.001$; *significant difference at $P < 0.05$; NS not significant.

Table 1 Assessment of the association between *CYP6P9a* genotypes and the ability of females to lay eggs.

Combination of genotypes at the <i>CYP6P9a</i> locus	Level of association	
	Odds ratio	<i>p</i> value
SS vs. RR	2.0 (0.7–5.7)	0.15
SS vs. RS	2.04 (1.1–3.8)	0.01*
RS vs. RR	1 (0.4–2.6)	0.57
S vs. R	1.4 (0.8–2.6)	0.1

SS homozygote susceptible, RR homozygote resistant, RS heterozygote.

An asterisk indicates significant difference $p < 0.05$.

(Table 1 and Fig. 2b) suggesting a non-additional burden of the *CYP6P9a*_R allele on fecundity.

Furthermore, the median number of eggs laid per female for *CYP6P9a*_RR was 53.7 ± 10.05 (min = 7; max = 124). The median was 69.58 ± 5.04 (ranged from 4 to 137) for *CYP6P9a*_RS while *CYP6P9a*_SS laid 74.52 ± 4.06 eggs per female (ranged from 8 to 185) (Fig. 2c). However, a Kruskal–Wallis non-parametric test showed no statistical

difference ($p = 0.2$) (Fig. 2e). Concerning the viability of eggs laid, RR mosquitoes produced 28.0 ± 10.31 larvae (min = 0; max = 98) corresponding to a hatch rate of $39 \pm 11.86\%$. For RS mosquitoes the mean number of larvae was 43.7 ± 4.9 larvae (min = 0; max = 125) corresponding to a hatch rate of $56.1 \pm 4.0\%$ while SS mosquitoes produced 52.6 ± 4.0 larvae (min = 0; max = 118) corresponding to a hatch rate of $67.0 \pm 3.9\%$ (Fig 2d). The mean number of larvae was lower in RR ($P = 0.02$) compared with other genotypes as well as for the hatch rate ($p < 0.04$) (Fig. 2e).

Level of association between the *CYP6P9a*_R resistant allele and larval development

Egg-hatching occurred 2 days post-oviposition and development time from the larvae to the pupae was 12.5 ± 4.5 days overall (Fig. 3). Genotyping of 100 randomly collected larvae for each L1, L2, L3 and L4 stages at F_8 generation revealed a significant and consistent decrease of the resistant allele *CYP6P9a*-R from L1 to L4, indicating greater mortality or slower development of the resistant mosquitoes during this immature stage. A reduction of RR

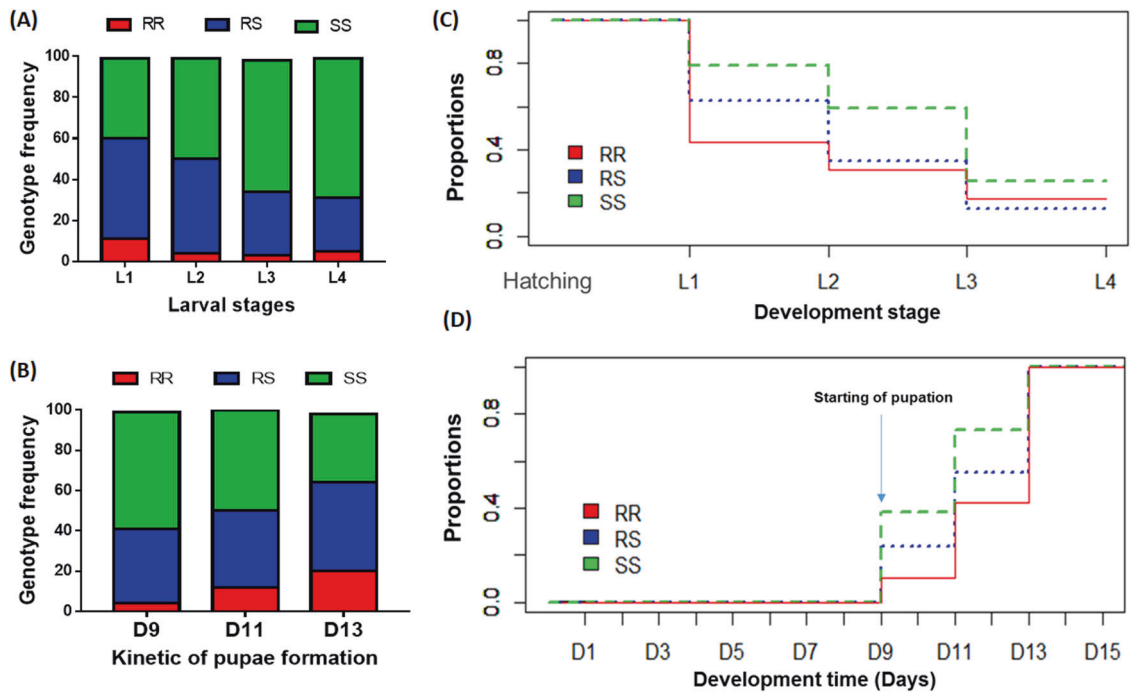
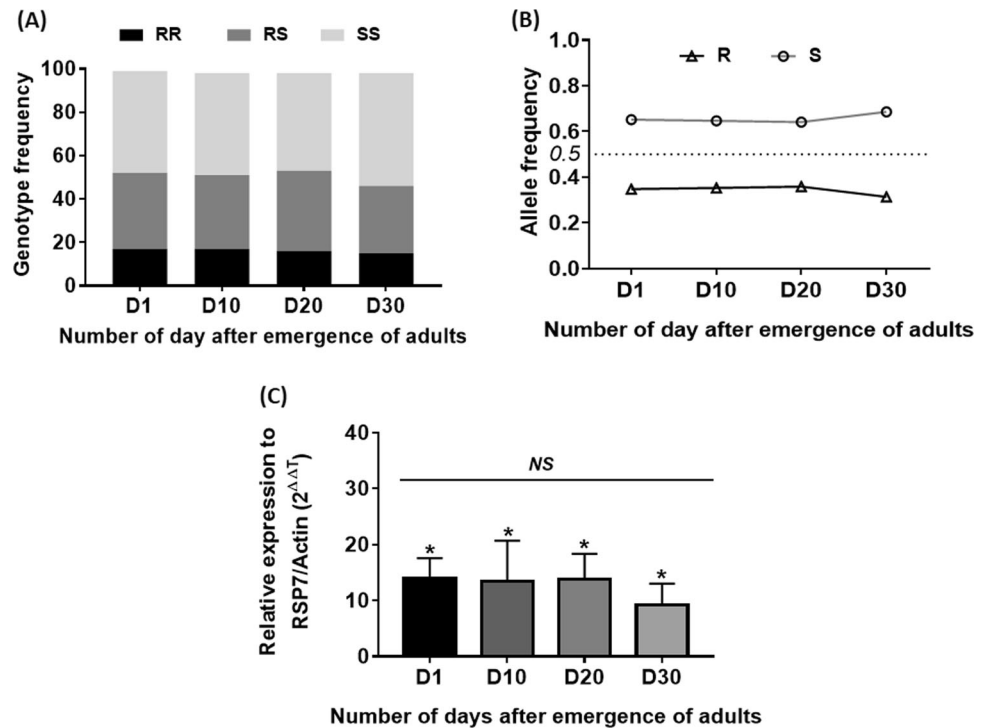


Fig. 3 Distribution of the *CYP6P9a* genotypes at different time-points of the development of immature stages. **a** Stacked bar plot of the variation in genotypes frequency during the development of larvae (L1, L2, L3, and L4 represent different larval stages) and pupae formation (**b**); **c** the proportion of larvae surviving at each developmental

stage from hatching (day 1) to formation of the pupae; **d** the proportion of pupae obtained in day 9, day 11 and day 13 of development. Coloured bars and lines indicate respectively *CYP6P9a*-RR, *CYP6P9a*-RS and *CYP6P9a*-SS genotypes.

Fig. 4 Influence of *CYP6P9a* on the adult longevity of *An. funestus*. Distribution of *CYP6P9a* genotypes (**a**) and alleles (**b**) at different time in the survived mosquitoes; dotted line indicates a frequency of 50% for the resistant and susceptible alleles. **c** Differential expression by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction of *CYP6P9a* genes in alive mosquitoes at different time-points compared with the susceptible lab strain FANG. Error bars represent standard error of the mean; An asterisk indicates statistically significant differential expression of the gene in comparison with susceptible strain; NS not significant.



was observed from L1 (11%) to L4 (5%) although this was not significant, possibly due to the low number of RR ($\chi^2 = 1.7$; $P = 0.2$) (Fig. 4a, b). A statistically significant decrease

of the RS genotype was consistently observed from L1 (49%) to L4 (27%) ($\chi^2 = 7.2$; $P = 0.007$) together with a significant increase of the homozygote susceptible genotype

Table 2 Association between *CYP6P9a* genotypes/alleles and pupae formation.

Combination of genotypes at the <i>CYP6P9a</i> locus	Day 9, Day 11		Day 9, Day 13		Day 11, Day 13	
	Odds ratio	<i>p</i> value	Odds ratio	<i>p</i> value	Odds ratio	<i>p</i> value
SS vs. RR	3.0 (0.5–16.3)	0.2	7.5 (1.5–34.4)	0.007*	2.5 (0.6–1.9)	0.1
SS vs. RS	1.2 (0.9–2.2)	0.08	2.03 (0.9–4.9)	0.08	1.7 (0.7–3.9)	0.2
RS vs. RR	2.5 (0.5–14.3)	0.3	3.7 (0.7–18.7)	0.09	1.4 (0.5–4.5)	0.5
S vs. R	1.5 (0.8–2.8)	0.1	2.5 (1.4–4.6)	0.002*	1.7 (0.9–3.0)	0.05*

An asterisk indicates significant difference.

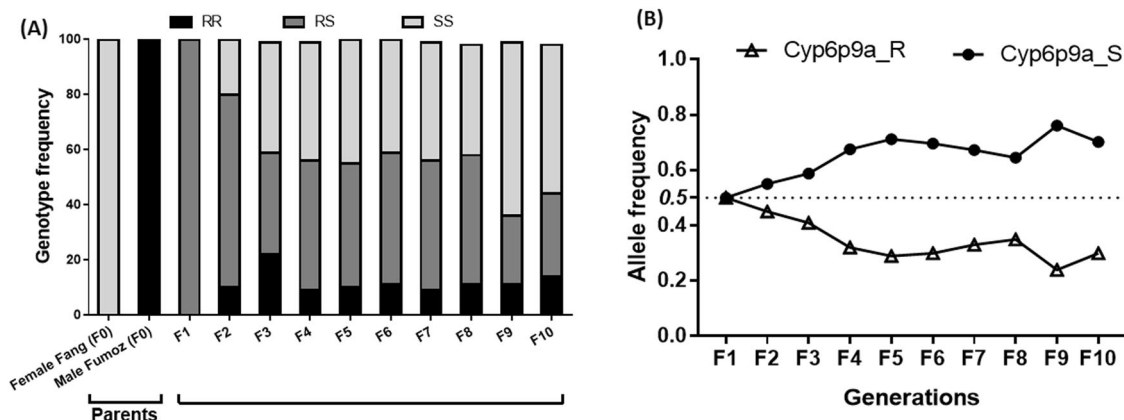


Fig. 5 Evaluation of the reversal to susceptibility in the hybrid colony FANG/FUMOZ-R. Changes in the *CYP6P9a* genotypes (a) and allele (b) for ten generations in the insecticides free environment.

SS from L1 (40%) to L4 (68%) ($\chi^2 = 12.15$; $P = 0.0004$) supporting a significant fitness cost of *CYP6P9a* on the larval development of resistant mosquitoes.

Pupae were obtained from 9 days post-hatching (pupae day 9) to 17 days (pupae day 17) with most pupation (more than 75%) observed at 11 days post-hatching (pupae day 11). Assessment of the rate of pupae formation by comparing the frequency of the *CYP6P9a* genotypes in the pupae obtained in day 9, day 11 and day 13 showed a consistent decrease of the homozygote susceptible SS genotype from day 9 (58%) to day 11 (34%) ($\chi^2 = 1.73$; $P = 0.19$) together with a significant increase of the RR genotype and RS from day 9 to day 13 ($\chi^2 = 11.17$; $P = 0.0008$) confirming that homozygote susceptible mosquitoes developed significantly faster than RR and RS mosquitoes (Fig. 4c, d). Assessment of the OR for pupae formation further supported that *CYP6P9a*-SS mosquitoes developed significantly faster than *CYP6P9a*-RR (OR = 2.50; $p < 0.01$) whereas there was no difference with *CYP6P9a*-RS (OR = 1.18; $p < 0.6$) (Table 2).

Assessment of the association between *CYP6P9a*-R allele and adult longevity

In average 100 alive mosquitoes were genotyped at day 1, day 10, day 20 and day 30 after the adult emergence to assess the association between the *CYP6P9a*-R allele and

F represents each generation; dotted line indicates a frequency of 50% for the resistant and susceptible alleles.

adult longevity. Comparison of genotypes frequency showed no difference in the distribution of genotypes ($\chi^2 = 1.6$; $p = 0.9$) (Fig. 4a) and alleles ($\chi^2 = 0.65$; $p = 0.88$) from day 1 to day 30 (Fig. 4b). In addition, assessment of the OR showed no difference in the life span of SS compared with RR (OR < 1.1; $p > 0.4$) and RS (OR < 1.1; $p > 0.2$) (Table S1). Evaluation of the expression level of *CYP6P9a* at the same time-points showed no significant difference of the level of expression of this gene in day 1 (fold-change (FC) = 14.03 ± 3.50), day 10 (FC = 13.4 ± 7.2), day 20 (FC = 13.7 ± 4.6), day 30 (FC = 9.2 ± 3.8) ($F = 1.08$; $df = 3$; $p = 0.4$) suggesting that over-expression of this P450 gene is not affecting the longevity of female mosquitoes (Fig. 4c).

Assessment of the reversal to susceptibility

The fitness cost of the *CYP6P9a*-R was also investigated in cage experiments to assess a potential reversal to susceptibility by examining the changes in the frequency of this allele over ten generations in the absence of insecticide selection pressure. A frequency of 50% of the resistant allele was confirmed in the F₁ generation of the FANG/FUMOZ-R as well as a 50% for the susceptible allele. A significant and consistent increase in the proportion of homozygote susceptible mosquitoes was observed from F₂ (20%) to F₁₀ (54%) ($\chi^2 = 6.2$; $P = 0.01$) (Fig. 5a) suggesting a reversal to susceptibility. This was supported by

an increase in the frequency of the susceptible allele from F_1 (50%) to F_{10} (70%) ($\chi^2 = 4.3$; $P = 0.03$) (Fig. 5b and Table S2).

Discussion

In this study, using the recently designed diagnostic assay for *CYP6P9a* gene, we investigated the fitness cost associated with P450-based resistance on various life traits of malaria vectors using laboratory strains of *An. funestus* revealing a significant cost imposed by P450-mediated resistance.

Association between the *CYP6P9a*-based resistance and fecundity/fertility

The results obtained in this study suggest that *CYP6P9a* induces a reduction in mosquitoes' fecundity and fertility. Same observation of reduced fecundity caused by metabolic based resistance was recently reported for the L119F-GSTe2 marker (Tchouakui et al. 2018). This reduced performance of RR mosquitoes in laying eggs could be associated to a reduction in the rate of insemination of resistant mosquitoes compared with the susceptible as previously reported (Brito et al. 2013). Several studies have previously reported a reduction in the number of eggs laid by insecticide resistant strains when compared with the susceptible strain (Brewer and Trumble 1991; Bouvier et al. 2001). In this study, homozygotes resistant mosquitoes displayed a significant lower viability of eggs compared with other genotypes as observed in *Ae. aegypti* (Mebrahtu et al. 1997).

Effect of the *CYP6P9a*-R resistant allele on the developmental time of the larvae

The developmental time of the larvae is a primary aspect of fitness in disseminating mosquito populations (Charlesworth 1994) as the survival rate of larvae or pupae might be reduced in the presence of natural predators or parasites (Agnew and Koella 1999). We observed a greater mortality/slower development of the resistant mosquitoes during larval development compared with the susceptible ones. This is a clear evidence of fitness cost imposed by P450-based metabolic resistance in mosquitoes. A range of environmental factors can affect the developmental time and survivorship of larvae and pupae including temperature, nutrition and larval density (Lyimo et al. 1992; Reisen 1995). In our study, temperature was controlled (25 ± 2 °C), nutrition and larval density as well. In addition, mosquitoes of the three genotypes were maintained together in the same containers thus limiting all the confounding factors from

environmental conditions. A greater mortality associated with a slower development of mosquitoes with the *CYP6P9a*-R resistant allele could be linked to the competition for food. Probably, despite the fact that all the three genotypes were maintained in the same larval bowl, larvae with *CYP6P9a*-R resistant allele were less competitive for food and space compared with those with the susceptible allele and therefore, developed significantly slower. As observed previously in resistant *Culex pipiens* for carboxylesterase-mediated metabolic resistance (Foster et al. 2003), the over-expression of *CYP6P9a* is probably linked with a decreased locomotive performance limiting the ability of mosquitoes with the resistant allele to move faster to feed. All this together could explain the longer developmental time observed in *CYP6P9a*-RR mosquitoes compared with RSs *CYP6P9a*-RS and *CYP6P9a*-SS susceptible mosquitoes. A similar high fitness cost was previously reported for target-site resistance such as *kdr* in the dengue vector *Aedes aegypti* (Brito et al. 2013) but this study provides the first evidence that cytochrome P450-based metabolic resistance induces a significant fitness cost on larval development in malaria vectors. The high fitness cost of the *CYP6P9a*-R resistance allele on the larval mortality and/or time of development of immature stages of resistant mosquitoes suggests that a resistance management strategy implemented before the allele becomes fixed in the population could effectively reduce P450-mediated metabolic resistance in the field. In contrast, a recent study on the impact of GST-based metabolic resistance on larval development found a RS advantage in term of developmental time compared with RR and susceptible mosquitoes for the L119F-GSTe2 marker (Tchouakui et al. 2018). This indicates that the cost of metabolic resistance on the physiological traits of mosquitoes can vary from one enzyme family to another and highlights the necessity to avoid extrapolation and to analyse such fitness cost in more metabolic resistance genes.

Association between the *CYP6P9a* resistance marker and female longevity

In contrast with other life traits, there was no association between the *CYP6P9a*-R resistant allele and adult longevity. Although this need to be assessed in field condition, this observation may suggest that the impact of *CYP6P9a*-R on the vectorial capacity of resistant mosquitoes might be less pronounced than that observed for the L119F-GSTe2 mutation which was shown to increase the longevity of resistant mosquitoes (Tchouakui et al. 2018). Because the vectors have to live sufficiently longer to allow the parasite to develop until the infective stage (McCarroll and Hemingway 2002), longevity of adult vectors is a key life-trait for which a change due to fitness cost could impact the

disease transmission. Rivero et al. reported that P450 monooxygenases and the GSTs particularly could drastically alter ROS levels in insects, albeit in radically opposite ways (Rivero et al. 2010). GSTs are known to protect mosquitoes against oxidative stress which results in the increase longevity whereas the increased activity of monooxygenases is associated with increase oxidative stress in mosquitoes (de Montellano 2015). The increase oxidase stress due to overproduction of monooxygenases could therefore reduce the longevity of insects although no such impact was seen in this study. Further studies with field populations will help further assess the extent of the effect of *CYP6P9a* gene on the life span of resistant mosquitoes in natural conditions.

Monitoring the reversal to susceptibility

Reversion to susceptibility is expected if the resistant gene harbours a fitness cost in an insecticide-free environment. Therefore, once insecticide pressure ceases, the frequency of the resistant allele, and consequently insecticide resistance, will decrease because of the fitness cost of insecticide resistance on mosquito's life traits. Knowledge of the reversal rate for insecticides such as pyrethroids is therefore crucial before implementing any resistance management strategy in the field. In this study, significant decrease in the frequency of the CYP6P9a-R resistant allele was observed after ten generations in the insecticide-free environment, which correspond to around 1 year. As previously observed (Saavedra-Rodriguez et al. 2012), this reduction in the resistant allele frequency could be attributed either to the accumulation of deleterious effects observed in some life traits of the vector as noticed for fecundity and larval development here or to the pleiotropic effect of other genes very close to *CYP6P9a* such as *CYP6P9b* since this gene is duplicated in *An. funestus*. Mating, copulation and insemination efficiency are other key factors which were not assessed in this study but which could have contributed to the reversal observed since female anopheles are inseminated only once during their life span. In these latter cases, males must be able to compete for copula, as the first to inseminate the female will increase the chance of propagating its genes. In the mosquito *Culex pipiens* males from a susceptible strain showed an advantage when competing for mating compared with males bearing three distinct organophosphate resistant genotypes (Berticat et al. 2002). Similarly, *kdr* and *Rdl* resistant males *An. gambiae* were shown to exhibit a lower mating competitiveness than susceptible ones (Platt et al. 2015). If such reduced mating competitiveness is also observed for this *An. funestus* strain, this could have contributed to the reversal noticed here. Such reversal to susceptibility suggests that resistance management strategies such as insecticide rotation could help to

reverse CYP6P9a-mediated metabolic resistance if implemented early. However, reversal rates can vary and may be very slow or impossible, particularly when an insecticide has been used for several years. For example, in Sri Lanka, the extensive use of DDT for malaria control for about 20 years up to the 1960s selected a resistance in *An. culicifacies* s.l. and *An. subpictus*. For this reason, DDT was replaced by malathion in the early 1970s and DDT resistance reverted very slowly towards susceptibility from 80% resistance in the 1970s to about 50% in the 1990s (Corbel and N'Guessan 2013). The same pattern of result was obtained in West Africa where a reversion of the resistance was observed in Northern Nigeria 6 years after the discontinuation of dieldrin spraying in *An. gambiae* population (Hamon and Garrett-Jones 1963). In Northern Nigeria, after 20–24 month of massive used of dieldrin, RR mosquitoes was the only ones remaining in the *An. gambiae* population with only few RSs. But, after 6 months in the absence of dieldrin, the homozygote susceptible genotype took over. Similar results were reported for *An. culicifacies* in India (Bhatia and Deobhankar 1963). However, the same allele at the *rdl* locus has been reported to be maintained in field populations in Sri Lanka despite the withdrawal of cyclodiene insecticides for mosquito control for more than 30 years (Roush and McKenzie 1987). Altogether these variations indicate that knowledge of the reversal rate of an insecticide is crucial for implementing any resistance management strategy in the field based on rotation of insecticides.

Conclusion

This study has investigated the fitness cost of P450-based metabolic resistance to pyrethroids in a major malaria vector revealing significant fitness cost for fecundity, fertility and the larval development of resistant mosquitoes. This fitness cost was further supported by the observation of a return to susceptibility in the absence of insecticide over ten generations (around 1 year) showing that if suitable resistance management strategies such as rotation was implemented, P450-based resistance could be managed. This should encourage future strategies using non-pyrethroid-based LLINs to reduce the selection pressure and allow such rotation to slow the spread of pyrethroid resistance.

Data availability

Underlying data is available here DOI (<https://doi.org/10.5061/dryad.pnvx0k6j4>).

Funding This study was funded by the Wellcome Trust (Wellcome senior 101893/Z/13/Z) awarded to CSW.

Author contributions CSW conceived and designed the study; MaT carried out the sample collection; MaT, DD and WT reared and maintained the strain in the insectary; MaT, MiT, LMJM and MJW performed the molecular analyses; MaT, JMR and CSW analysed the data; MaT and CSW wrote the paper with contributions from FN. All authors read and approved the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Agnew P, Koella JC (1999) Life history interactions with environmental conditions in a host–parasite relationship and the parasite's mode of transmission. *Evol Ecol* 13(1):67–91
- Alout H, Dabire RK, Djogbenou LS, Abate L, Corbel V, Chandre F et al. (2016) Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci Rep* 6:29755
- Alout H, Yameogo B, Djogbenou LS, Chandre F, Dabire RK, Corbel V et al. (2014) Interplay between *Plasmodium* infection and resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J Infect Dis* 210:1464–1470
- Amenya DA, Naguran R, Lo TC, Ranson H, Spillings BL, Wood OR et al. (2008) Over expression of a cytochrome P450 (CYP6P9) in a major African malaria vector, *Anopheles Funestus*, resistant to pyrethroids. *Insect Mol Biol* 17:19–25
- Amin A, White G (1984) Relative fitness of organophosphate-resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 74:591–598
- Argentine J, Clark JM, Ferro D (1989) Relative fitness of insecticide-resistant Colorado potato beetle strains (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ Entomol* 18:705–710
- Assogba BS, Djogbenou LS, Milesi P, Berthomieu A, Perez J, Ayala D et al. (2015) An ace-1 gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in *Anopheles gambiae*, the main malaria mosquito. *Sci Rep* 5:14529
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79:41–47
- Bhatia S, Deobhankar R (1963) Reversion of dieltrin-resistance in the field population of *A. culicifacies* in Maharashtra State (erstwhile Bombay State), India. *Indian J Malariol* 17:339–351
- Bhatt S, Weiss D, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U et al. (2015) The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526:207–211
- Bouvier JC, Bues R, Boivin T, Boudinhon L, Beslay D, Sauphanor B (2001) Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87:456–462
- Brewer MJ, Trumble JT (1991) Inheritance and fitness consequences of resistance to fenvalerate in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 84(6):1638–1644.
- Brito LP, Linss JG, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JB et al. (2013) Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS ONE* 8:e60878
- Charlesworth B (1994) Evolution in age-structured populations. Cambridge University Press, Cambridge
- Corbel V, N'Guessan R (2013) Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In: *Anopheles mosquitoes-new insights into malaria vectors*. IntechOpen
- de Montellano, PRO (2015) Substrate oxidation by cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*. Springer, Cham, pp. 111–176
- Edi CV, Djogbenou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MA, Poupardin R et al. (2014) CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet* 10:e1004236
- Foster SP, Young S, Williamson MS, Duce I, Denholm I, Devine GJ (2003) Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* 91:98–106
- Hamon J, Garrett-Jones C (1963) Resistance to insecticides in the major malaria vectors and its operational importance. *Bull World Health Organ* 28:1
- Hemingway J (2014) The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130431
- Hunt R, Brooke B, Pillay C, Koekemoer L, Coetzee M (2005) Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Med Vet Entomol* 19:271–275
- Ibrahim SS, Riveron JM, Bibby J, Irving H, Yunta C, Paine MJ et al. (2015) Allelic variation of cytochrome P450s drives resistance to bednet insecticides in a major malaria vector. *PLoS Genet* 11:e1005618
- Irving H, Wondji CS (2017) Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC Genet* 18:76
- Kwiatkowska RM, Platt N, Poupardin R, Irving H, Dabire RK, Mitchell S et al. (2013) Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallée du Kou, Burkina Faso. *Gene* 519:98–106
- Livak KJ (1984) Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* 107:611–634
- Lyimo E, Takken W, Koella J (1992) Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. *Entomologia experimentalis et applicata* 63:265–271
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL et al. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7:179–184
- Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB (2012) Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS ONE* 7:e31889
- McCarroll L, Hemingway J (2002) Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol* 32:1345–1351
- Mebrahtu YB, Norem J, Taylor M (1997) Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am J Trop Med Hyg* 56:456–465
- Mitchell SN, Stevenson BJ, Muller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG et al. (2012) Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6147–6152
- Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS (2010) Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS ONE* 5:e11872

- Okoye PN, Brooke BD, Koekemoer LL, Hunt RH, Coetzee M (2008) Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:591–598
- Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, Diabaté A, Dabire R, Wondji CS (2015) Target-site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity* 115:243
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 9:491–497
- Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27:91–98
- Reisen WK (1995) Effect of temperature on *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) from the Coachella and San Joaquin valleys of California. *J Med Entomol* 32:636–645
- Rivero A, Vezilier J, weill M, Read AF, Gandon S (2010) Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6:e1001000
- Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD, et al. (2014) A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol* 15:R27
- Riveron JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, Paine MJ et al. (2013) Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:252–257
- Riveron JM, Watsenga F, Irving H, Irish SR, Wondji CS (2018) High *Plasmodium* infection rate and reduced bed net efficacy in multiple insecticide-resistant malaria vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J Infect Dis* 217(2):320–328
- Roush RT, McKenzie JA (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol* 32:361–380
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H, Hemingway J et al. (2012) Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 21:61–77
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
- Tchouakui M, Chiang M-C, Ndo C, Kuicheu CK, Amvongo-Adjia N, Wondji MJ et al. (2019) A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher *Plasmodium* infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Sci Rep* 9:5772
- Tchouakui M, Riveron JM, Djonabaye D, Tchagga W, Irving H, Takam PS et al. (2018) Fitness costs of the glutathione S-transferase epsilon 2 (L119F-GSTe2) mediated metabolic resistance to insecticides in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Genes* 9:645
- Weedall GD, Mugenzi LM, Menze BD, Tchouakui M, Ibrahim SS, Amvongo-Adjia N et al. (2019) A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Sci Transl Med* 11:eaaf7386
- WHO (1998) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces: report of the WHO informal consultation, WHO, Geneva
- WHO (2013) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. World Health Organization, Rep Ser
- WHO (2018) World malaria report 2018
- Wondji CS, Dabire RK, Tukur Z, Irving H, Djouaka R, Morgan JC (2011) Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochem Mol Biol* 41:484–491