



Résistance du moustique *Anopheles gambiae* à Fludora® Fusion, une nouvelle combinaison d'insecticides à double mode d'action utilisable en pulvérisation intra domiciliaire. Réponse adaptative et interactions gènes-environnement

Gonsé Marius Zoh

► **To cite this version:**

Gonsé Marius Zoh. Résistance du moustique *Anopheles gambiae* à Fludora® Fusion, une nouvelle combinaison d'insecticides à double mode d'action utilisable en pulvérisation intra domiciliaire. Réponse adaptative et interactions gènes-environnement. Biodiversité. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV030 . tel-03708133

HAL Id: tel-03708133

<https://theses.hal.science/tel-03708133>

Submitted on 29 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biodiversité, Ecologie, Environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Gonse Marius ZOH

Thèse co-dirigée par

M. Stéphane REYNAUD et M. Jean-Philippe DAVID

Préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie Alpine**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Résistance du moustique *Anopheles gambiae* à Fludora® Fusion, une nouvelle combinaison d'insecticides à double mode d'action utilisable en pulvérisation intra domiciliaire. Réponse adaptative et interactions gènes-environnement.

Thèse soutenue publiquement le **28 juin 2021**, devant le jury composé de :

M. Vincent CORBEL

Directeur de recherche, l'IRD-MIVEGEC, France (Rapporteur)

M. Raphaël N'GUESSAN

Professeur assistant, LSHTM, UK (Rapporteur)

Mme. Gaëlle Le Goff

Chargée de recherche, INRA, France (Examinatrice)

M. Charles WONDJI

Professeur, LSTM, UK (Examineur)

M. Frédéric SCHMITT

Docteur, Financeur Bayer, France (invité)

M. Stéphane REYNAUD

Professeur, Université Grenoble Alpes (co-directeur de thèse)

M. Jean Philippe DAVID

Chargé de recherche, CNRS (co-directeur de thèse)

M. François POMPANON

Professeur, Université de Grenoble Alpes (Président du jury)



Remerciements

En 2017 je débutais ma thèse au LECA dans la « Team moustique » sans toutefois me douter de l'ampleur de la tâche qui m'attendait, ni de l'impact que ce travail réflexif aurait sur ma personne. Tout ceci a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes en qui j'ai un profond respect.

Pour commencer j'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à mes directeurs de thèse qui ont rendu cette thèse possible. **Stéphane Reynaud** et **Jean-Philippe David** merci pour cette confiance placée en moi dès le début de ce projet. Je vous remercie pour ces 3 années d'encadrement et de m'avoir accompagné à chaque étape de ce travail ce qui m'a permis d'apprendre beaucoup à vos côtés. Vos soutiens, disponibilités et valeurs personnelles m'ont aidé à vite m'adapter dans le début et à surmonter plusieurs difficultés. A mon humble avis tout thésard rêverait d'avoir des encadrants comme vous.

Je remercie également les financeurs de ce projet notamment **Justin McBeath**, **Sebastian Horstmann** et **Frederic Schmitt** de la société Bayer pour cette belle collaboration durant ces 3 années.

J'adresse un sincère remerciement aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : **Vincent Corbel**, **Raphaël N'guessan**, **Gaëlle Le Goff**, **Charles Wondji**, **Frederic Schmitt** et **François Pompanon**. C'est un honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer mon travail.

Un grand merci à **Fabrice Chandre**, **Pierrick Labbe** et **Muriel Raveton** qui m'ont apporté de précieux conseils et critiques scientifiques pendant ces 3 années à travers le comité de suivi de cette thèse.

Mes sincères remerciements aux chercheurs qui m'ont ouvert les portes de l'entomologie : Drs **Tia Emmanuel**, **Florence Fournet**, **Raphaël N'guessan** et **Chouaibou Mouhamadou**, merci pour tout ce que vous faites pour les jeunes en Côte d'Ivoire et en Afrique.

J'ai eu une chance au cours de cette thèse de côtoyer de formidables personnes au Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) : **Thierry Gaude**, merci pour ta simplicité, ta générosité et ta disponibilité. **Frederic Laporte**, une personne formidable que j'ai rencontrée à mes débuts au LECA. Merci pour ton soutien et ta disponibilité en biologie moléculaire et

surtout pour tous ses moments partagés sur le terrain de foot après le travail. **Jordan Tutagata**, merci pour ton aide aux insectariums, sans toi cette fin de thèse aurait été très difficile pour moi. **Jean-marc Bonneville**, merci d'avoir accepté de participer à ce travail à travers les différentes analyses statistiques et les explications sur R que tu me donnais pour m'aider. Je tiens donc à remercier également tout le personnel du LECA qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à mes collègues de bureau **Joaquim Germain, Sylvie Veyrenc, Marie Usal** et **Adeline Stewart** pour ces 3 années de bonne ambiance dans le bureau.

Je remercie également ces jeunes docteurs qui n'ont jamais arrêté de m'encourager et m'apporter des conseils depuis le début de cette aventure : **Julien Cattel, Behi Fodjo, André Sagna** merci pour votre soutien et vos conseils. Une pensée particulière pour **Lucrèce**, merci pour tout et reçois à travers ces quelques lignes ma profonde reconnaissance pour ton aide.

Merci à mes amis qui ont été d'un grand soutien moral durant toutes ses années surtout pendant le confinement : **Ghislain**, « frère sang » je te suis reconnaissant pour tout ce que tu as fait, le meilleur reste à venir. **Eric, Corine, Christabelle, Alain** merci de m'avoir adopté comme votre frère, vous êtes ma famille de Grenoble. Merci également à **Marie** et **Binta** pour ses moments de gaieté à « Adjamé madina ». Un grand merci à **Dennis, John, Nathan et Mélissa**, grâce à vous mon intégration à Grenoble a été très facile. Merci à mes amis en Côte d'Ivoire **Gilles, Nathan, Timac, Nina, Pap** qui ont été également d'un grand soutien moral.

Une pensée pour **Mr Nestor Kesse (In Memoriam †)** du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS), qui m'a beaucoup appris sur les techniques d'élevage des anophèles et m'a permis d'être autonome dans un insectarium. Une pensée également pour mon amie **MARINA KOUADIO (In Memoriam †)**, de là où tu te trouves, sache que cette thèse est aussi la tienne je ne t'oublierai jamais.

A mes parents, je vous remercie pour vos prières qui m'ont toujours accompagné depuis l'enfance. Une pensée profonde va à l'endroit de mon père **ZOH ROBERT (In Memoriam †)**, merci pour tout ton amour pour nous. Je sais que tu aurais été le plus heureux et sache qu'on ne t'oubliera jamais « papa ». A ma mère **GOUALOU MAHOUA**, merci pour tes prières et pour tous les sacrifices consentis pour nous. Nous t'aimons très fort et que Dieu te garde longtemps auprès de nous.

A mes sœurs **Virginie, Danielle, Rachelle** et **Sadia** (et oui tu l'es maintenant) je vous remercie pour votre soutien et pour tout l'amour que vous me portez. Je tiens à remercier également mes oncles **Zoh Lucien** et **Zoh Alain** pour leurs soutiens.

A ma fiancée **Stéphanie Davilla**, je tiens à te remercier pour tes sacrifices pendant toutes ces années, à supporter ma longue absence et à toujours m'encourager à aller de l'avant.

A vous tous y compris ceux que je n'ai pas pu citer, je vous dis MERCI et sollicite la grâce et la bénédiction de DIEU sur vous. Nous rendons toute la gloire à DIEU pour le souffle de vie et le soutien qu'il nous accorde.

Merci Seigneur

Table des matières

Remerciements	II
Table des matières	V
Abreviations	VIII
Liste des tableaux	X
Liste des figures	X
Résumé	XII
Abstract	XIII
Préambule (bayer).....	XV
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1. MOUSTIQUES ET IMPACT SOCIETAL	1
1.1.1. Bio-Écologie des moustiques	1
1.1.2. Nuisance et impact sur la santé humaine	4
1.2. CONTROLE DES <i>ANOPHELES</i> EN AFRIQUE	9
1.2.1. Lutte mécanique	9
1.2.2. Lutte biologique	10
1.2.3. Lutte génétique	11
1.2.4. La lutte chimique contre le paludisme	12
1.2.5. La place des insecticides dans le contrôle du paludisme en Afrique	18
1.3. RESISTANCE DES VECTEURS DU PALUDISME AUX INSECTICIDES	20
1.3.1. Mécanismes de résistances	20
1.3.2. Bases moléculaires de la résistance métabolique	34
1.4. DETECTION, SUIVI ET GESTION DE LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES.....	37
1.4.1. Détection et suivi spatio-temporel de la résistance	37
1.4.2. Stratégies de gestion de la résistance	44
1.4.3. Statuts et mécanismes de résistance de <i>An. gambiae s.l</i> aux insecticides en Afrrique	47
1.5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	49
1.5.1. Contexte d'étude	49
1.5.2. Les moustiques du genre <i>Anopheles</i> peuvent-ils développer une résistance à Fludora® Fusion ?	50

1.5.3. La présence de produits agrochimiques dans les gîtes à <i>An. gambiae</i> localisées en bordure des zones à forte activité agricole peut-elle affecter la tolérance à la formulation Fludora® Fusion ?	51
CHAPITRE 2. Réponse adaptative du vecteur du paludisme <i>An. gambiae</i> à Fludora® Fusion, une nouvelle combinaison d'insecticides associant différents modes d'action. Étude par sélection contrôlée et transcriptomique.	54
2.1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	54
2.2. OBJECTIFS DE L'ETUDE ET APPROCHES UTILISEES	55
2.3. MODELES BIOLOGIQUES	56
2.4. PRINCIPAUX RESULTATS	58
2.4.1. Dynamique de la résistance.....	58
2.4.2. Résistance croisée des différentes lignées aux insecticides	58
2.4.3. Fréquences des mutations de cible	59
2.4.4. Variations des niveaux de transcription des gènes chez les lignées sélectionnées	59
2.4.5. Variations de polymorphisme associées à la résistance	61
2.4.6. Rôle des CYP6M dans la résistance à la clothianidine	62
2.5. DISCUSSION.....	64
2.6. CONCLUSION	67
CHAPITRE 3. Impact des polluants agrochimiques sur la réponse d'<i>An. gambiae</i> à Fludora® Fusion et à ses différents composants	72
3.1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	72
3.2. OBJECTIFS DE L'ETUDE ET APPROCHES UTILISEES	73
3.3. PRINCIPAUX RESULTATS	74
3.4. DISCUSSION.....	76
3.5. CONCLUSION	80
CHAPITRE 4. Discussion générale	106
4.1. REPONSE ADAPTATIVE D' <i>AN. GAMBIAE</i> A LA COMBINAISON D'INSECTICIDES FLUDORA® FUSION AINSI QU'À SES DIFFERENTS CONSTITUANTS	107
4.1.1. Synthèse des résultats obtenus	107
4.1.2. Evolution de la résistance à la combinaison Fludora® Fusion chez les vecteurs du paludisme en Afrique.....	108
4.1.3. Résistance aux néonicotinoïdes chez les moustiques.....	112

4.2.	IMPACT DES COMPOSES AGROCHIMIQUES SUR L'EFFICACITE DE FLUDORA® FUSION CHEZ <i>AN. GAMBIAE</i>	114
4.3.	LA PLACE DE FLUDORA® FUSION DANS LE FUTUR DE LA LUTTE ANTIVECTORIELLE	116
Conclusion et perspectives.....		119

Abréviations

7-EC	7-éthoxycoumarine
7-OHC	7-hydroxycoumarine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
An	Anopheles
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CARB	Carbamate
CDC	Center for Disease Control
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CSRS	Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire
CT	Cycle Threshold
DDT	Dichloro-Diphényle-Trichloro-éthane
DEF	S,S,S,-tributylphosphorotrithioate
DEM	diethyl maléate
DNA-seq	séquençage de l'ADN
ECOD	éthoxycoumarine-O-dééthylase
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GSTs	glutathione S-transferases
IGR	Insect growth regulators
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
kdr	knock down resistance
LAV	Lutte antivectorielle
MII	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MIILDA	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
NGS	Next Generation Sequencing
OGM	Organisme Génétiquement Modifié

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Organophosphoré
PBO	Piperonyl butoxide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PID	Pulvérisation Intra-Domiciliaire
PYR	Pyréthrinoïdes
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAD-seq	séquençage de l'ADN associé à un site de restriction
RNA-seq	séquençage de l'ARN
SOLiD	Sequencing by Oligo Ligation Detection
TIS	Technique d'Insecte Stérile
VGSC	Voltage gated sodium channels
WHO	World Health Organization
CRISPR-Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas

Liste des tableaux

Tableau 1 : P450s impliqués dans la résistance aux insecticides chez <i>Anopheles</i>	30
---	----

Liste des figures

Figure 1 : Exemple des trois principaux genres d'espèces vectrices. <i>An. gambiae</i> (a) ; <i>Culex pipiens</i> (b) ; <i>Ae. aegypti</i> (c)	2
Figure 2 : Cycle biologique du moustique	4
Figure 3 : Cycle biologique des Plasmodium.....	7
Figure 4 : Distribution géographique des vecteurs majeurs du paludisme à travers le monde	8
Figure 5 : Structure chimique du DDT.....	13
Figure 6 : Structure chimique du Carbamate	14
Figure 7 : Structure chimique du Malathion	15
Figure 8 : Structure chimique de la Deltamethrine	16
Figure 9 : Structure chimique de la Clothianidine	17
Figure 10 : Récepteur cible des insecticides chimiques classiquement utilisés en lutte antivectorielle.....	18
Figure 11 : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez le moustique	21
Figure 12 : Mécanismes de résistance cuticulaires	22
Figure 13 : Détection de la mutation kdr.....	24
Figure 14 : Détection de la mutation ACE-1.....	25
Figure 15 : Schéma simplifié de la réaction d'oxydation d'un xénobiotique (RH) par les CYPs .	28
Figure 16 : La répartition géographique de la résistance métabolique liée au P450 basée sur une surexpression significative de gènes fonctionnellement validés.....	29
Figure 17 : Réaction d'hydrolyse d'un substrat par les carboxylestérases	31
Figure 18 : Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisé par une GST	32
Figure 19 : Distribution de la résistance aux différentes classes d'insecticides en Afrique subsaharienne.	48
Figure 20 : Schéma synthétique du dispositif expérimental utilisé.....	56

Figure 21 : Création de la lignée Tiassalé-S	57
Figure 22 : Potentielles perspectives de recherche.....	120

Résumé

Afin de lutter contre la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes, le groupe Bayer a récemment développé une nouvelle formulation d'insecticides (Fludora® Fusion) combinant la deltaméthrine (pyréthrinoïdes de classe II) et la clothianidine (néonicotinoïde) pour une utilisation en pulvérisation intra-domiciliaire. Bien que cette combinaison montre une bonne efficacité opérationnelle, son efficacité à long terme n'a pas été évaluée. Dans ce contexte, ce travail de thèse visait à étudier, au laboratoire sur plusieurs générations, la dynamique d'apparition de la résistance à Fludora® Fusion et à ses deux composants chez le moustique *An. gambiae* ainsi qu'à caractériser les mécanismes de résistance associés par une approche de transcriptomique. En parallèle une étude de l'impact de la présence à faible dose de pesticides agrochimiques dans les gîtes larvaires sur la tolérance des adultes à Fludora® Fusion et à ses deux composants a été réalisée.

Une lignée d'*Anopheles gambiae* portant des allèles de résistance à plusieurs familles d'insecticides à basse fréquence a été sélectionnée sur plusieurs générations avec la deltaméthrine seule, la clothianidine seule ou bien la combinaison Fludora® Fusion. Cette étude a confirmé le potentiel de Fludora® Fusion à retarder la sélection de la résistance par rapport à ses deux composants utilisés seuls. Les résultats obtenus montrent que la sélection avec la deltaméthrine seule a engendré une augmentation rapide de la résistance, principalement associée à la mutation de cible Kdr L1014F. La sélection avec la clothianidine seule a conduit à l'émergence d'une résistance métabolique modérée associée aux enzymes de détoxification, notamment les cytochromes P450s (gènes *CYPs*). Les données de polymorphisme ont mis en évidence une forte signature de sélection associée à la résistance à la clothianidine affectant un cluster de gènes *CYPs* précédemment associés à la résistance. Des analyses complémentaires ont révélé que la sur-expression et la sélection d'un variant protéique du gène *CYP6M1* sont associés au phénotype de résistance observé.

Concernant l'effet de l'environnement sur la tolérance à Fludora® Fusion, l'exposition de larves d'*Anopheles gambiae* à une dose sub-létale d'un mélange de pesticides agrochimiques a engendré une augmentation significative de la tolérance à la clothianidine et au mélange Fludora® Fusion chez les femelles adultes, suggérant que l'efficacité du mélange repose principalement sur la clothianidine et que la tolérance à ce néonicotinoïde est affectée par la présence de composés agrochimiques. L'analyse par transcriptomique réalisée chez des larves exposées ou non et les adultes issus de ces larves a révélé une sur-transcription de nombreux gènes codants pour des protéines cuticulaires et des P450s dont certains ont déjà été associés à la résistance à la clothianidine.

Dans l'ensemble, cette thèse confirme la valeur ajoutée de la combinaison Fludora® Fusion en lutte anti-vectorielle et son potentiel en termes de gestion de la résistance. Ces travaux confirment également que, comme chez les ravageurs de cultures, l'utilisation seule des néonicotinoïdes en lutte anti-vectorielle est fortement susceptible d'engendrer l'émergence d'une résistance chez *An. gambiae* et que les activités agricoles peuvent impacter la tolérance des moustiques à cette famille d'insecticide.

Mots clés : *An. gambiae*, Fludora® Fusion, clothianidine, deltaméthrine, résistance croisée, résistance métabolique, enzymes de détoxification, transcriptomique.

Abstract

To overcome the spread of pyrethroid resistance in malaria vectors, Bayer has recently developed a new insecticide formulation (Fludora® Fusion) combining the insecticides deltamethrin (class II pyrethroids) and clothianidin (neonicotinoid) for indoor residual spraying. Although this novel combination showed a good efficacy on *Anopheles* mosquitoes, its long-term efficacy has not yet been evaluated. In this context, the present thesis aimed at studying, across multiple generations, the dynamics of resistance upon a controlled selection with Fludora® Fusion or its two insecticide components in *An. gambiae* and investigate the underlying mechanisms through a transcriptomic approach. In parallel, the impact of a sub-lethal exposure of larvae to agrochemicals on the tolerance of adults to Fludora® Fusion and its two insecticide components was performed.

A field-derived *Anopheles gambiae* line carrying resistance alleles to multiple insecticide families at low frequencies was selected in the laboratory for multiple generations with Fludora® Fusion, deltamethrin alone or clothianidin alone. This study confirmed the potential of Fludora® Fusion to prevent the selection of resistance as compared to deltamethrin or clothianidin alone. Deltamethrin selection led to the rapid rise of resistance in link with the selection of the Kdr L1014F target-site mutation. Selection with clothianidin alone also led to the emergence of metabolic resistance associated with detoxification enzymes including cytochromes P450 (*CYP* genes). Polymorphism data pinpointed a strong selection signature associated with clothianidin resistance affecting a large *CYP* cluster previously associated with resistance. Subsequent analyses suggested that the over-expression and the selection of a particular variant of the gene *CYP6M1* are associated with the observed resistance phenotype.

Regarding the impact of environment on Fludora® Fusion, the exposure of *An. gambiae* larvae to a sub-lethal dose of an agrochemical mixture led to an increased tolerance to Fludora® Fusion and clothianidin in adult females suggesting that Fludora® Fusion efficacy mainly relies on clothianidin which can be affected by the presence of agrochemicals. A transcriptomic analysis performed in larvae exposed or not and in adults obtained from these larvae revealed an over-transcription of multiple genes encoding cuticle proteins and cytochromes P450 among which some were previously associated with clothianidin resistance.

Overall this thesis confirmed the added value of Fludora® Fusion in vector control and its potential in terms of resistance management. This work also suggest that the use of neonicotinoids alone can select for resistance in mosquitoes as previously observed in crop pests, and a significant impact of agrochemicals on the tolerance of mosquitoes to this insecticide family.

Key words: *An. gambiae*, Fludora® Fusion, clothianidin, deltamethrin, cross-resistance, metabolic resistance, detoxification enzymes, transcriptomics.

Préambule (Bayer)

La résistance aux insecticides reste un défi pour l'efficacité des programmes de lutte antivectorielle contre le paludisme en Afrique subsaharienne, et une combinaison de nouveaux produits et de nouvelles stratégies est nécessaire pour surmonter la menace croissante de la résistance et maintenir une dynamique positive dans les progrès visant à l'élimination du paludisme.

Il existe un manque évident de nouveaux modes d'action insecticides pouvant être utilisés en santé publique. Donc lorsque de nouveaux modes d'actions sont mis à disposition, des stratégies doivent être employées pour conserver leur efficacité aussi longtemps que possible après leur déploiement. Une approche pour y parvenir consiste à introduire ces nouveaux insecticides en combinaisons avec un second mode d'action indépendant ; l'hypothèse étant que le développement de la résistance est ralenti par l'influence du second mode d'action. Cette approche peut également améliorer l'efficacité du nouveau composé, en fonction de l'efficacité relative des deux insecticides.

En 2018, Bayer a obtenu la préqualification par L'OMS de FLudora® Fusion, le premier produit combinant deux insecticides destinés à être utilisé en pulvérisation intra-domiciliaire. Fludora® Fusion est une combinaison de clothianidine - un néonicotinoïde (nouveau en santé publique) - et de la deltaméthrine, un pyréthrianoïde (déjà largement utilisée en santé publique). L'impact d'un tel mélange sur l'évolution de la résistance n'a pas été étudié auparavant ; une étude a donc été conçue pour tester cette hypothèse.

C'est sous le couvert d'un accord cadre de longue date entre le CNRS et Bayer que cette étude a été menée en toute indépendance par les experts en mécanismes de résistance du Laboratoire d'Ecologie Alpine du CNRS et de l'Université Grenoble-Alpes (UGA). Les résultats de ces travaux ainsi que des travaux annexes sur la résistance des moustiques aux insecticides néonicotinoïdes sont présentés dans le présent manuscrit.

Chapitre I. Introduction

1.1. Moustiques et impact sociétal

1.1.1. Bio-Écologie des moustiques

a. Généralités

Les moustiques comptent environ 3 500 espèces réparties dans le monde entier, des régions tropicales aux pôles arctiques, en passant par les déserts et les zones tempérées (Harbach, 2004). Ils appartiennent à la classe des insectes, à l'ordre des diptères et à la famille des culicidés (Figure 1). Ce sont des insectes holométaboles (à métamorphose complète) dont l'adulte, la larve et la nymphe ont des morphologies très différentes. Les moustiques sont adaptés à deux modes de vie : la vie aquatique pour les stades pré-imaginaux et la vie aérienne pour le stade adulte ou imaginal. Chez la plupart des espèces, la prise de sang est indispensable pour l'oviposition chez la femelle et favorise la transmission de graves maladies. Ainsi, trois genres de moustiques sont particulièrement importants dans la transmission des maladies : *Anophèles*, *Aedes*, *Culex* (Figure 1).

Selon les espèces de moustiques et les écotypes, les stades pré-imaginaux (larvaire et nymphal) se développent dans des gîtes naturels (étangs, lagunes, mares, flaques, creux de rocher ou d'arbre), ou bien artificiels (réservoirs d'eau, égouts, regards, gouttières, pneus, ou tout autre contenant inondé ...) (Pages et al. 2007). Les moustiques pondent leurs œufs dans des gîtes aux caractéristiques écologiques spécifiques. Par exemple, l'espèce *An. gambiae* vecteur majeur du parasite du paludisme en Afrique subsaharienne préfère en général les gîtes d'eau claire et ensoleillés rencontrés dans les zones agricoles (rizières, cultures maraîchères, ...) ou péri-urbaines tandis, que les espèces appartenant aux genres *Culex* et *Aedes* préfèrent en général des gîtes domestiques et plus ombragés.

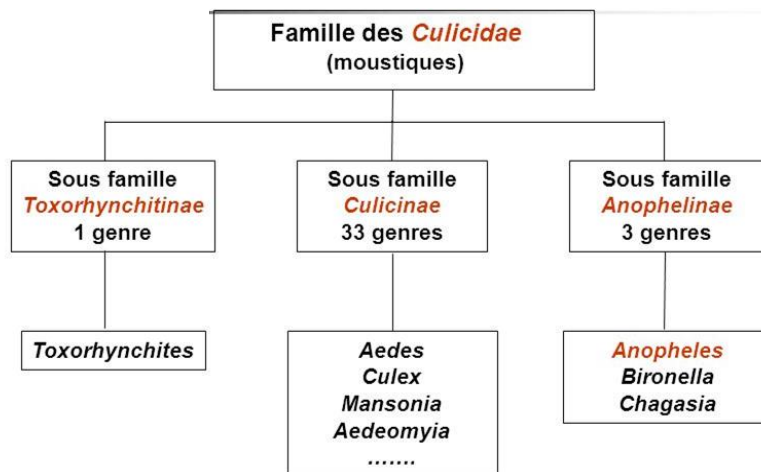


Figure 1 : Exemple des trois principaux genres d'espèces vectrices. *An. gambiae* (a) ; *Culex pipiens* (b) ; *Ae. aegypti* (c). Public Health Image Library (<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>)

b. Cycle biologique

Le cycle biologique des moustiques est d'une durée variable selon les espèces et leur biotope. Il peut être annuel chez certaines espèces de climats froids, mais peut aussi comporter plusieurs générations pendant les mois estivaux en climat tempéré. Il peut aussi être continu et parfois réduit à quelques semaines chez certaines espèces vivant en climat tropical ou équatorial. Il est toujours composé de trois stades de vie dont les deux premiers sont aquatiques (Figure 2). La morphologie des œufs de moustiques est généralement distincte selon l'espèce. Par exemple, les œufs de *Culex* sont regroupés et forment des barquettes flottantes sur l'eau, tandis que ceux des *Aedes* sont isolés et préférentiellement pondus sur des supports humides à l'interface entre l'eau et l'air et ceux d'*Anopheles* sont pondus isolément en surface de l'eau. Les œufs de moustiques éclosent en général entre 24 h et 48 h après la ponte lorsqu'ils sont au contact de l'eau. Lorsque les œufs sont pondus, l'embryon de la larve est déjà formé et peut parfois voir son développement temporairement ralenti si les conditions sont défavorables. En effet, certaines espèces du genre *Aedes* pondent des œufs qui peuvent résister à la dessiccation

pendant plusieurs mois tandis que d'autres espèces ont la capacité de générer des œufs diapausants afin de survivre à la période hivernale (Carnevale & Robert 2009).

Les larves de moustiques se distinguent de celles des autres insectes aquatiques par une absence de patte et un thorax beaucoup plus remarquable que les autres parties du corps (tête et abdomen). Chez la plupart des espèces, les larves ont la particularité de posséder un siphon respiratoire localisé sur le segment postérieur de leur abdomen dont la morphologie conditionne leur placement dans la colonne d'eau. Ainsi, chez le genre *Anopheles*, les larves dépourvues de siphon respiratoire, se positionnent parallèlement à la surface de l'eau, face dorsale vers le haut et se nourrissent principalement en surface. Au contraire, les larves de culicinae (*Aedes* et *Culex*) ont une position inclinée par rapport à la surface de l'eau, tête en bas et siphon respiratoire en haut, leur permettant de se nourrir sur le fond ou bien dans la colonne d'eau. Le développement larvaire des moustiques comporte 4 stades au cours desquels ils se nourrissent de fines particules organiques inertes et/ou de microorganismes présents dans les gîtes (levures, bactéries, micro-algues, ...). Selon les espèces, le régime alimentaire des larves peut être de type filtreur, collecteur, ou brouteur. Le dernier stade larvaire (stade IV), est suivi d'une transformation de la larve en nymphe. Le stade nymphal est dédié à la préparation de la métamorphose aboutissant à l'émergence de l'imago et bien qu'elles soient mobiles, les nymphes ne se nourrissent pas. Chez la plupart des espèces, les nymphes respirent grâce à la présence de deux trompettes respiratoires localisées sur la face supérieure du thorax (Duvallat, Fontenille & Robert 2017).

La nymphose et l'émergence des adultes est en général plus précoce chez les mâles que chez les femelles. À ce stade, les adultes se nourrissent essentiellement de liquides sucrés tels que les nectars floraux et exsudats de fruits de divers végétaux. L'accouplement se produit en général quelques jours après l'émergence et la maturité sexuelle varie selon les espèces. Après l'accouplement, les spermatozoïdes sont stockés dans la spermathèque de la femelle qui peut ainsi les conserver, parfois toute sa vie, pour la fécondation de ses œufs. Bien qu'un seul accouplement soit requis, des inséminations multiples par différents mâles sont aussi possibles lorsque la spermathèque n'est pas totalement remplie au cours du premier accouplement. Au stade adulte, l'apport nutritif sucré va constituer la principale source d'énergie permettant d'assurer les activités principales telles que le vol et l'accouplement. Cependant, chez la femelle, cet apport énergétique n'est pas suffisant pour assurer la maturation des œufs après la fécondation. Ainsi, quelques jours après l'accouplement, les femelles, dotées d'un appareil

piqueur, doivent réaliser un repas de sang de vertébré. La diversité et la spécificité des espèces ciblées par les moustiques pour le repas de sang dépendent des espèces. On parle d'espèces anthropophiles lorsque l'homme est préférentiellement ciblé ou bien d'espèces zoophiles lorsqu'il s'agit d'autres animaux (oiseaux, mammifères, animaux domestiques, bétail, ...), mais la plupart des espèces possèdent un spectre d'hôte varié. Grâce à des adaptations physiologiques permettant la digestion du repas sanguin et l'évacuation de l'excès d'eau, cet apport énergétique va permettre d'assurer le développement des œufs fécondés suivi de la ponte quelques jours plus tard. La durée entre deux repas sanguins ou deux pontes est appelée cycle gonotrophique (Figure 2) (Duvallet, Fontenille & Robert 2017).

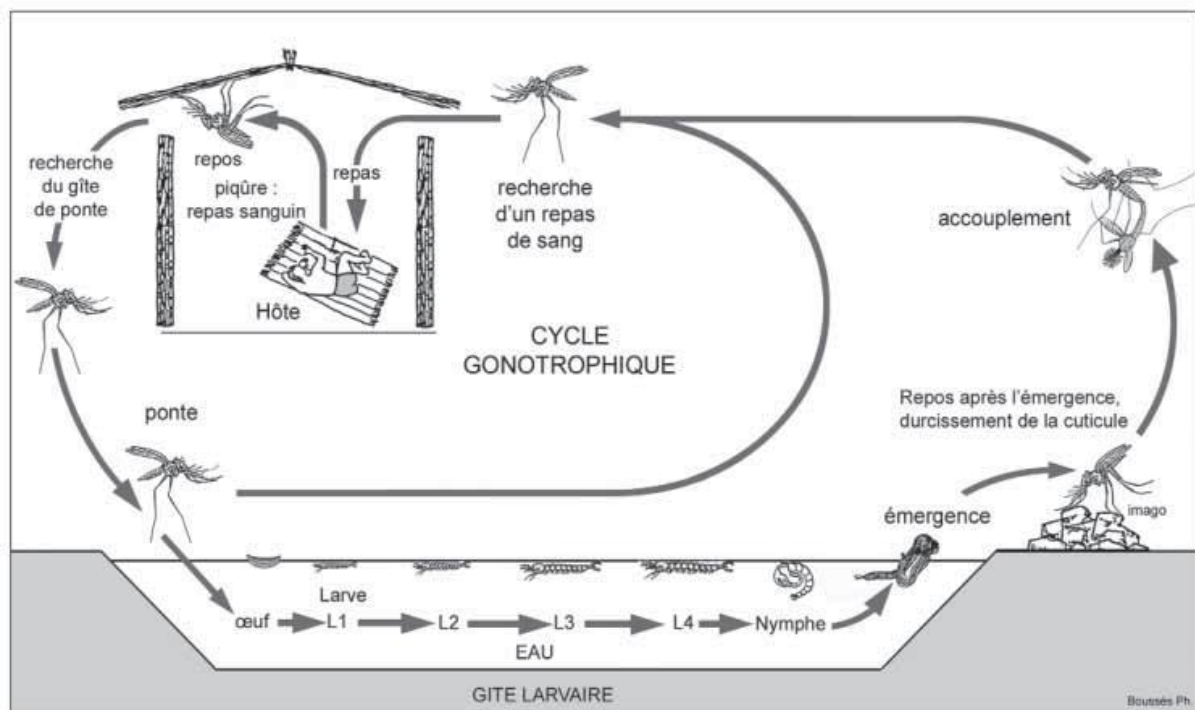


Figure 2 : Cycle biologique du moustique (Carnevale et al, 2011)

1.1.2. Nuisance et impact sur la santé humaine

a. Généralités

Les moustiques font partie intégrante de l'écosystème. Au stade larvaire, ils représentent une biomasse dont se nourrissent certains organismes aquatiques (batraciens, poissons, insectes) et participent aussi au recyclage de la matière organique aquatique. Au stade adulte, ils représentent aussi une source de nourriture pour certains organismes (oiseaux, chauve-

souris, batraciens, insectes) et contribuent à la pollinisation des plantes à fleurs. Cependant, de par leur repas de sang sur un hôte vertébré, les moustiques sont aussi à l'origine de nuisances et de problèmes sanitaires aux conséquences humaines et économiques graves. En effet, les piqûres de moustiques peuvent causer de sévères irritations pour l'homme lorsque leur nombre est important (Takken & Knols 2007). Par exemple en Côte d'Ivoire, une étude estimait à 308 le nombre moyen de piqûres de moustiques que recevait un homme en une nuit (Fofana et al. 2010). Dans certains cas, cette nuisance peut affecter les activités humaines telles que le tourisme.

Au-delà de cette nuisance, la capacité des moustiques à transmettre des pathogènes à l'homme, ou aux animaux représente un problème sanitaire majeur ayant un impact économique et sociétal dans de nombreuses régions du monde. En effet, les maladies vectorielles causées par les moustiques telles que le paludisme ou les arboviroses (dengue, chikungunya, fièvre jaune, Zika...) ont connu récemment une recrudescence (Morens et al. 2004) avec des conséquences sur la santé publique et l'économie mondiale (Jones et al. 2008; Suaya et al. 2009). Cet accroissement des maladies vectorielles est la conséquence de l'augmentation de la densité des populations humaines, de l'intensification des flux de personnes et de marchandises, des modifications du climat entraînant un changement de répartition de certains vecteurs, de l'augmentation des activités agricoles, mais également d'un investissement insuffisant dans la lutte antivectorielle et la prophylaxie dans les régions à risque.

b. Le paludisme

Parmi les maladies vectorielles, le paludisme est responsable de plus de 400 000 décès par an dans le monde (WHO 2019). En Afrique, le paludisme représente la première cause de consultation médicale et constitue la maladie la plus meurtrière dont les plus vulnérables sont les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (Cibulskis et al. 2016). En 2018 plus de 380 000 décès furent imputés au paludisme en Afrique dont plus de 67 % chez les moins de 5 ans (WHO 2019). Cette maladie est causée par la transmission de protozoaires du genre *Plasmodium* par les moustiques du genre *Anopheles*. À ce jour, il existe plus de 70 espèces d'anophèles, dont une trentaine répertoriée en Afrique sub-saharienne sont décrites comme vectrices de *Plasmodium* (Sinka et al. 2012).

Les parasites du genre *Plasmodium* appartiennent à l'embranchement des Apicomplexa (protozoaires possédant un complexe apical), à la classe des Aconoidasida, à l'ordre des Haemosporida et à la famille des Plasmodiidae. Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* pouvant infecter diverses espèces animales, mais seulement cinq (*P. falciparum* ; *P. vivax* ; *P. ovale* ; *P. malariae* et *P. knowlesi*) ont été identifiées chez l'homme. Au niveau mondial, *P. falciparum* et *P. vivax* sont responsables de la majorité des cas de paludisme (Loy et al. 2017)

c. Cycle biologique du plasmodium humain

Le *Plasmodium* a un cycle de développement complexe qui fait intervenir deux hôtes successifs. D'abord une phase chez l'homme où se déroule la multiplication asexuée ou schizogonie des parasites et ensuite une autre phase chez la femelle du moustique anophèle où s'effectue la reproduction sexuée ou sporogonie (Frischknecht et al. 2004 ; Josling & Llinás 2015 ; Mota & Rodriguez 2002).

Au cours du développement du parasite chez l'homme, les sporozoïtes transmises par le moustique infecté migrent jusqu'au foie. Après un développement dans le foie en de milliers de mérozoïdes, les parasites sont libérés dans le sang et envahissent les globules rouges. Les parasites y subissent alors des cycles répétés de multiplication asexuée (le cycle de développement intra-érythrocytaire), progressant du stade trophozoïte au stade schizonte. Dans chaque cycle, 10% de parasites commencent à se développer pour donner la forme sexuée du parasite, le gamétocyte. Le développement en gamétocyte est requis pour une transmission productive à l'hôte vecteur. Après 10 à 12 jours de développement, les gamétocytes mâles et femelles matures sont ingérés par la femelle du moustique lors du repas de sang sur un sujet infecté où ils subissent la phase sexuelle de leur cycle de vie (Figure 3).

Une fois ingéré par le moustique, le parasite entame la deuxième phase de son développement. Les gamétocytes ingérés se différencient en gamètes puis s'ensuit une fécondation donnant des zygotes. Les zygotes se développent alors en une forme mobile (ookinètes) qui forme par la suite des oocystes. Lorsque les oocystes se fragmentent, des sporozoïtes haploïdes sont libérés et migrent vers les glandes salivaires où ils deviennent infectants pour l'homme lors d'un repas sanguin (Figure 3).

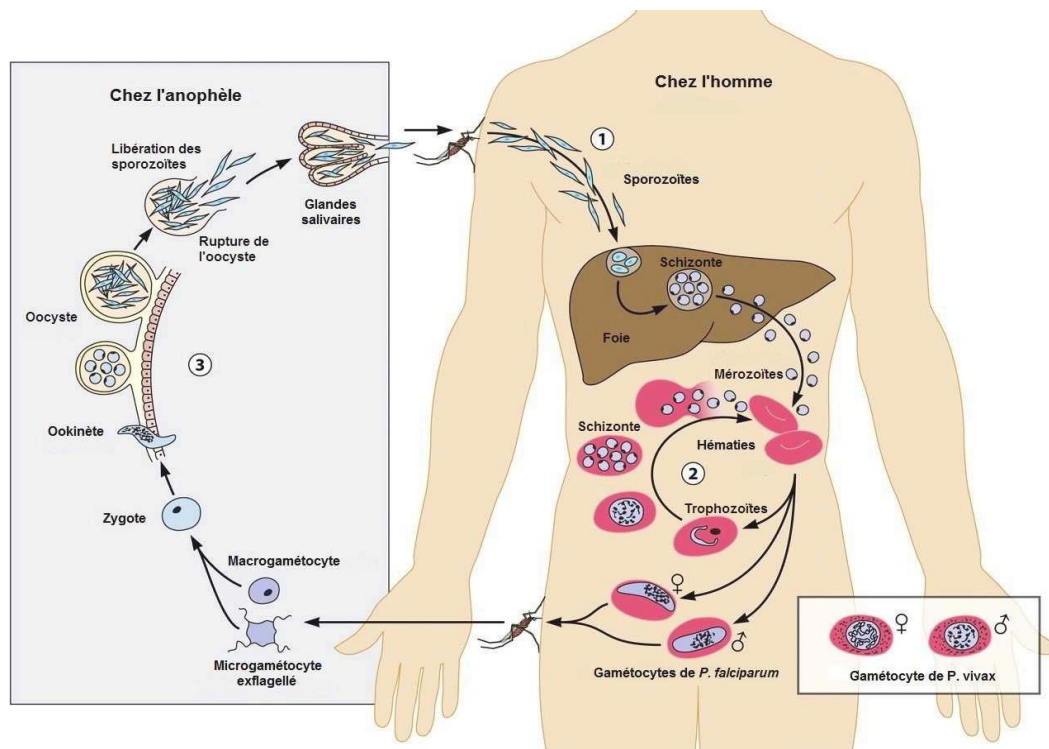


Figure 3 : Cycle biologique des Plasmodium (adapté de Bousema et Drakeley, 2011)

d. Distribution géographique des vecteurs du paludisme

Les caractéristiques éthologiques et biologiques des moustiques du genre *Anopheles* et des parasites du genre *Plasmodium* conditionnent la distribution géographique du paludisme. *P. falciparum* se retrouve dans la majeure partie de la zone subsaharienne africaine et est à l'origine d'environ 300 millions de cas cliniques et de 300 000 décès par an (Bhatt et al. 2016 ; Traore et al. 2018). Cette espèce plasmodiale engendre des parasitémiées élevées provoquant des accès palustres simples ou graves. Les statistiques dans les zones les plus touchées montrent que 90 % des cas de paludisme sont des accès palustres simples et 10 % sont des accès graves. Cependant, les accès palustres graves sont à l'origine d'un grand nombre de morts, à cause d'une détection et d'une prise en charge tardive des cas. La transmission du *P. falciparum* est efficacement assurée en Afrique subsaharienne par *An. gambiae s.l* et *An. funestus s.s* (Assouho et al. 2019 ; Cohuet et al. 2004 ; Tabue et al. 2017 ; Tanga & Ngundu 2010) (Figure 4). Enfin, d'autres espèces telles que *An. nili*, et *An. rufipes* peuvent également être vectrices de *P. falciparum* mais en plus faible proportion (Assouho et al. 2019 ; Da et al. 2013). *P. vivax* quant à lui est beaucoup plus endémique aux régions du sud de l'Asie (Inde, Pakistan, Sud-Est Asiatique), du sud et du centre de l'Amérique et quelques régions de l'est de l'Afrique

base de critères morphologiques, mais différenciés sur la base de critères comportementaux, génétiques et écologiques (Coluzzi et al. 2002). Le complexe gambiae comprends huit espèces incluant *Anopheles amharicus*; *Anopheles bwambae*; *Anopheles quadriannulatus* ; *Anopheles melas*; *Anopheles merus*; *Anopheles gambiae s.s.*; *Anopheles coluzzii* ; *Anopheles arabiensis* (Coetzee et al. 2013 ; Lee et al. 2013 ; Niang et al. 2015). *An. gambiae s.s* et *An. coluzzii* ont été récemment scindés en deux espèces distinctes correspondant respectivement aux formes moléculaires S et M de *An. gambiae s.l.* précédemment décrites (Coetzee et al. 2013). Ces deux espèces sont anthropophiles et sont présentes dans la zone afrotropicale, excepté la corne de l'Afrique et les zones désertiques. Les larves de *An. gambiae s.s* se développent en général dans des gîtes de milieux ouverts, souvent temporaires et pauvres en prédateurs (insectes larvivores) . *An. coluzzii* quant à lui présente un développement larvaire plus long et se rencontre généralement dans des gîtes permanents ou semi-permanents où les prédateurs sont plus présents (Djogbénou et al. 2008 ; Roux et al. 2014). Contrairement à *An. gambiae s.l.*, *An. arabiensis* est une espèce au comportement beaucoup plus zoophile. Cette espèce est très adaptée au climat sec du Sahel et se retrouve dans toute la zone afrotropicale, excepté les zones forestières

1.2. Contrôle des anophèles en Afrique

La réémergence de nombreuses infections due majoritairement à la modification de la biologie et la distribution géographique de vecteurs, a engendré des recherches de plus en plus étendues et approfondies sur les moustiques. Ainsi, dans le but d'une stratégie de lutte intégrée, la lutte antivectorielle repose sur quatre axes principaux.

1.2.1. Lutte mécanique

La lutte mécanique cible essentiellement les gîtes de reproduction facilement repérables et accessibles. Cette méthode a déjà fait l'objet de guides édités par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dans le cadre du "Panel of expert on Environmental Management for vector control" (Phillips et al.1993 ; Tiffen 1991), et a été la principale méthode de lutte contre les moustiques dans plusieurs régions en Europe avant l'avènement des insecticides chimiques en santé publique. Comme exemple, cette méthode a été utilisée entre 1957 et 1977 dans les Dombes en Rhône-Alpes pour faire chuter le nombre de cas de paludisme (Pautou et al. 1995). Le contrôle des moustiques grâce à l'assainissement de l'environnement a également montré un succès dans d'autres régions du monde notamment lors de la construction du canal de Panama au début du

20e siècle. Cette technique est difficilement applicable chez *An. gambiae*, car les gîtes de reproduction sont localisés pour la plupart dans des zones rurales humides d'importance économique pour ses populations (rizières, maraîchage...). Aussi, l'aménagement des territoires entraîne des coûts financiers énormes et insupportables pour de nombreux pays Africains (Bawin et al. 2015).

1.2.2. Lutte biologique

La lutte biologique se définit comme la réduction de la densité d'une population par l'utilisation d'organismes vivants (Bawin et al. 2015). Dans la lutte antivectorielle, cette méthode repose sur plusieurs approches telles que l'utilisation d'espèces entomophages, des champignons entomopathogènes, des bactéries entomopathogènes et des toxines de bactéries entomopathogènes.

Les espèces entomophages : l'utilisation d'organismes se nourrissant de larves de moustiques tels que des poissons ou insectes prédateurs date de plusieurs années avant la découverte des insecticides chimiques. Plusieurs études ont montré l'efficacité prédateurs entomophage dans la LAV tels que les poissons gambusie (*Gambusia affinis*) et guppy (*Poecilia reticulata* Peters) ou les copépodes du genre *Mesocyclops* Sars (Chandra et al. 2008 ; Nam et al. 2012). Cette approche était utilisée dans des programmes de lutte contre le paludisme dans plusieurs pays avant d'être remplacée par le DDT suite aux recommandations de l'OMS, puis d'être à nouveau intégrée dans les plans de lutte antivectorielle intégrée.

Les champignons entomopathogènes : ils suscitent un intérêt certain dans la recherche d'alternatives aux insecticides. Leurs spores peuvent se fixer et germer sur la cuticule des moustiques permettant ainsi au champignon de se répandre dans l'insecte, entraînant sa mort. Les espèces utilisées en recherches appartiennent pour la plupart aux ordres des Entomophtorales (*Zygomycètes*) et des Hypocreales (*Ascomycètes*) (Shah & Pell 2003). Des champignons tels que *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* ont fait l'objet de nombreuses études comme agent de biocontrôle potentiel dans la lutte contre un large éventail d'insectes y compris *An. gambiae*, vecteur principale du paludisme (Scholte et al. 2004, 2005, 2006).

Les toxines de bactéries entomopathogènes : les toxines bactériennes, produites lors de la sporulation des bactéries du genre *Bacillus thuringiensis* (Bt), ciblent uniquement les stades larvaires (action après ingestion). Elles ont l'avantage de montrer une bonne spécificité envers

les diptères (impact environnemental réduit) mais ont l'inconvénient de n'être utilisables que dans des zones où les gîtes larvaires sont facilement repérables et accessibles. En Afrique, les toxines des bactéries entomopathogènes *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) et *Bacillus sphaericus* (Bs) sont les deux insecticides biologiques utilisés dans la lutte contre les anophèles. Leur efficacité a été démontrée contre les larves d'anophèles, permettant ainsi une réduction du nombre d'infections paludéennes dans des zones endémiques (Dambach et al. 2019 ; Fillinger et al. 2009 ; Tusting et al. 2013), confirmant ainsi leur intérêt en combinaison d'autres méthodes de lutte (lutte intégrée).

Bactéries du genre *Wolbachia* : les bactéries du genre *Wolbachia* sont des alphaprotéobactéries endosymbiotiques à transmission verticale qui infectent environ 40 % des espèces d'arthropodes dont elles manipulent la reproduction par un mécanisme d'incompatibilité cytoplasmique (Werren et al. 2008 ; Zug & Hammerstein 2012). Cette incompatibilité entraîne une descendance non-viable lorsque des œufs de femelles non infectées sont fécondés par des mâles infectés par *Wolbachia* (Werren et al. 2008). Ces bactéries ont été retrouvées chez *An. gambiae*, et des études en Afrique de l'Ouest ont montré que leur présence chez cette espèce impactait significativement la prévalence du *Plasmodium* et réduisait la transmission du paludisme dans les zones où elles se retrouvaient (Gomes et al. 2017 ; Gomes and Barillas-Mury 2018 ; Shaw et al. 2016). Les bactéries *Wolbachia* pourrait être un nouvel outil dans la lutte contre le paludisme, car elle peut être utilisée pour diminuer la densité des populations des vecteurs.

1.2.3. Lutte génétique

Depuis 2017, l'OMS soutient les recherches basées sur une lutte antivectorielle efficace, durable et adaptée au contexte local, épidémiologique, entomologique et socio-économique (Simard 2019). La manipulation du capital génétique des moustiques vecteurs apparaît aujourd'hui comme une approche prometteuse en lutte antivectorielle dans le but de réduire le risque de transmission d'agents pathogènes à l'homme. Ainsi, le contrôle des moustiques par la génétique regroupe deux principales catégories : la technique de l'insecte stérile (TIS) et les moustiques génétiquement modifiés (OGM).

La TIS consiste à produire des masses d'individus mâles (d'une espèce ciblée) stérilisés par irradiation et ensuite les introduire dans la population sauvage cible en grandes quantités pour une meilleure compétition avec les individus sauvages lors de l'accouplement des femelles

(Simard 2019). Cette technique vise à l'élimination ou à la réduction de la densité d'une population de vecteurs à un faible seuil de transmission. L'efficacité de cette technique a déjà été observée dans la lutte contre certaines espèces d'insectes (Vreysen et al. 1998 ; WYSS 2006) et l'utilisation dans la lutte contre les moustiques fait l'objet de plusieurs expériences en conditions contrôlées et sur le terrain (Benedict & Robinson 2003 ; Bourtzis et al. 2016 ; Lees et al. 2015).

Contrairement à la technique des insectes stériles, les moustiques OGM agissent directement sur le génome en y insérant, remplaçant ou supprimant un élément. L'objectif de cette technique est soit d'éliminer ou de réduire fortement la densité de populations ou de rendre un vecteur réfractaire au développement d'un pathogène en jouant sur la compétence vectorielle. Ainsi, suivant la technique utilisée, on distingue différents types de moustiques OGM (Simard 2019). Le moustique du genre *Aedes* a été le premier moustique OGM mis en place, suivi du genre *Anopheles* dans les années 2000 (Grossman et al. 2001 ; Jasinskiene et al. 1998). Ainsi, on distingue :

- Le transgène stérilisant, qui consiste à introduire un transgène synthétique dans le génome du moustique comme le cas de OX513A chez *Ae. aegypti* mis en place par Oxitec (Phuc et al. 2007 ; Seirin Lee et al. 2013).
- La mutagénèse ciblée, qui consiste à mettre en place un OGM sans aucun apport exogène synthétique grâce à des techniques comme CRISPR-Cas9 (Galizi et al. 2016; Hammond et al. 2016).
- Le *gene drive* ou forçage génétique, qui permet d'augmenter l'héritabilité d'un gène d'intérêt dans une population (Hammond et al. 2016 ; Kyrou et al. 2018).

1.2.4. La lutte chimique contre le paludisme

La plupart des insecticides utilisés en santé publique sont d'origine chimique. Pour être employés contre les vecteurs, ces insecticides doivent être sélectifs afin de limiter leur impact sur la faune non cible. De plus, ils doivent être peu coûteux et correctement formulés pour optimiser leur efficacité et/ou leur rémanence pour être utilisés par les programmes de lutte à long terme. Quatre familles d'insecticides sont principalement utilisées en LAV (PYR, CARB, OP, OC) (Figure 10). Cependant pour pallier les problèmes de résistance chez les vecteurs, d'autres familles (eg neonicotinoïdes, IGRs, etc...) sont également utilisées.

a. Les organochlorés

Le DDT fut le premier insecticide chimique développé en 1939 par le chimiste Paul Hermann Müller et utilisé contre les insectes nuisibles. Cet insecticide de synthèse était facile à manipuler, peu coûteux, et avait une bonne rémanence permettant une bonne efficacité sur les populations d'insectes ciblées. Le DDT (Figure 5) appartient à la famille des organochlorés qui regroupe aussi d'autres types d'insecticides tels que le lindane, ou bien les cyclodiènes tels que la dieldrine ciblant les récepteurs GABA qui ne sont plus utilisés en lutte antivectorielle à cause de leur forte toxicité environnementale et humaine. Le DDT a été l'insecticide le plus utilisé dans la lutte contre les vecteurs du paludisme pendant plusieurs décennies dans le monde (Corbel & N'Guessan 2013). Il cible les canaux sodium voltage dépendants (*Voltage Gated Sodium Channels*, *VGSC*) entraînant une hyper excitation rapide du système nerveux se traduisant par un effet de choc (effet knock-down) réversible aux doses sub-létales. Dans les années 1960, dès les premières pulvérisations intra domiciliaires, son efficacité a été démontrée par l'élimination du paludisme aux Etats Unis, en Grèce et en Corse (Pages et al. 2007). Malheureusement, son utilisation massive en Afrique a rapidement montré des limites dans les régions où la transmission du paludisme se maintenait à un niveau élevé (Pages et al. 2007). La résistance au DDT fut rapidement observée d'abord en Grèce chez les anophèles puis dans d'autres pays chez de nombreux autres insectes ravageurs et vecteurs. Par la suite, la très forte rémanence du DDT dans l'environnement ainsi que sa toxicité et sa bioaccumulation au sein des chaînes alimentaires, ont conduit à son interdiction dans de nombreux pays (Mouchet 1994). Toutefois, le DDT reste utilisable en IRS seulement pour la lutte contre les vecteurs selon les modalités fixées par la convention de Stockholm

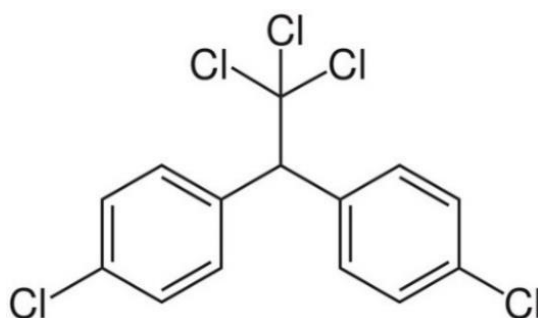


Figure 5 : Structure chimique du DDT

b. Les carbamates

Les carbamates (CARB) ont été introduits pour remplacer le DDT dans les années 50. Ces insecticides sont des dérivés de l'acide carbamique qui inhibent le fonctionnement de l'acétylcholinestérase, (enzyme qui dégrade l'acétylcholine au niveau des synapses) et entraînent l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique. Les récepteurs à acétylcholine restent alors anormalement excités entraînant ainsi la paralysie puis la mort de l'insecte. Les carbamates (notamment le bendiocarbe) sont largement utilisés en pulvérisation intra-domiciliaire en Afrique pour lutter contre les moustiques (Figure 6). Ces produits ont montré une bonne efficacité contre les vecteurs du paludisme notamment *An. gambiae s.l.*, et ont joué un rôle important dans la diminution des cas de paludisme dans de nombreux pays Africains (Dambach et al. 2019 ; Elanga-Ndille et al. 2019). Néanmoins, leur trop faible rémanence (de 2 à 6 mois suivant le mode d'application et les surfaces traitées) et l'accroissement de la résistance des vecteurs à ces molécules en Afrique ont conduit à leur remplacement par les organophosphorés.

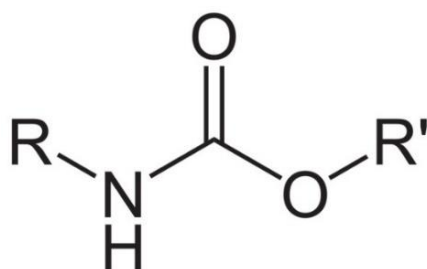


Figure 6 : Structure chimique du Carbamate

c. Les organophosphorés

Les organophosphorés (OP) sont des dérivés de l'acide phosphorique. Tout comme les carbamates, ils inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase entraînant la mort de l'insecte après paralysie. Les OP ont été introduits sur le marché au début des années 1970 avec des molécules telles que le malathion (Figure 7), le fénitrothion ou bien le téméphos. Néanmoins, leur faible rémanence et leur toxicité significative sur les populations humaines et les milieux aquatiques ont entraîné leur interdiction dans certains pays (Union Européennes) (Testud and Grillet 2006). Malgré cela, des études menées en Afrique ont montré leur efficacité en pulvérisation intra domiciliaires contre des populations d'*An. gambiae* et de *Cx. quinquefasciatus* à des doses peu toxiques pour l'homme avec des rémanences beaucoup plus longues (Rowland et al. 2013). Au fil du temps la résistance aux organophosphorés a été détectée chez certaines espèces de

moustiques y compris *An. gambiae* vecteur majeur du paludisme en Afrique subsaharienne (Edi et al. 2012). Cependant, de nouveaux OPs tels l'atellie 300 CS utilisant du primiphos méthyl se sont révélés efficaces avec une performance résiduelle prolongée contre les vecteurs du paludisme. Ces insecticides sont actuellement déployés et évalués en Afrique dans de nombreux sites pour une utilisation en PID (Chanda et al. 2013 ; Mashauri et al. 2017 ; Salako et al. 2019). D'autres types d'insecticides non-persistants dans l'environnement, avec une faible toxicité pour les organismes cibles et moins coûteux ont été également développés pour renforcer l'efficacité de la LAV.

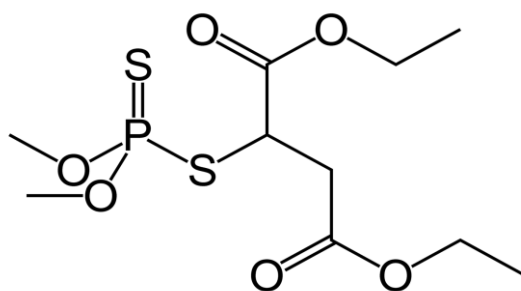


Figure 7 : Structure chimique du Malathion

d. Les pyréthréinoïdes

Les pyréthréinoïdes (PYR) représentent aujourd'hui la classe d'insecticide la plus utilisée dans la lutte antivectorielle et sont recommandés par l'OMS pour cet usage. Ce sont des insecticides montrant une toxicité à très faible dose pour les insectes. Comme pour le DDT, ils agissent sur les canaux sodium voltage dépendants (blocage en position ouverte) entraînant une paralysie immédiate (effet knock-down) puis la mort de l'insecte. Les pyréthréinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines que l'on peut extraire des fleurs de chrysanthème *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Bien que montrant une bonne toxicité, les pyréthrines naturelles ont l'inconvénient d'être assez rapidement inactivées par la lumière, limitant ainsi considérablement leur usage en extérieur. Par la suite, les pyréthréinoïdes de synthèse, montrant une meilleure stabilité à la lumière, une toxicité à très faible dose pour les insectes et une faible toxicité pour les mammifères se sont rapidement imposés pour la lutte antivectorielle. Les pyréthréinoïdes de synthèse se divisent en deux groupes en fonction de leur structure chimique : les pyréthréinoïdes de type I non α -cyanés comme la perméthrine, et les pyréthréinoïdes de type II α -cyanés comme la deltaméthrine (Figure 8) et la lambda-cyhalothrine. La propagation de la résistance au sein des vecteurs du paludisme menace l'efficacité des pyréthréinoïdes et des

programmes de lutte antivectorielle basés sur ces insecticides dans de nombreux pays (Corbel & N'Guessan 2013 ; Riveron et al. 2018).

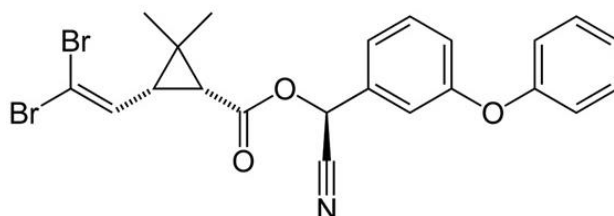


Figure 8 : Structure chimique de la Deltamethrine

e. Les néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques de la nicotine. Ils ont été introduits sur le marché mondial dans les années 90 avec l'imidaclopride et ont été très utilisés par la suite de part leur haute efficacité, leur rémanence et leurs multiples voies d'applications. Tout comme les pyréthrinoïdes, les néonicotinoïdes montrent une toxicité à faible dose pour les insectes et un facteur de sélectivité mammifères/insectes élevé. Ce sont des insecticides agonistes des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine qui une fois en contact avec ce récepteur entraîne une sur-stimulation des neurones puis la mort de l'insecte. Par ailleurs, les néonicotinoïdes sont largement utilisés en agriculture dans la protection des cultures contre les insectes ravageurs. En 2018, dans le cadre de l'utilisation des insecticides contre les ravageurs en agriculture, on pouvait compter 45 produits à base néonicotinoïdes (4 types de néonicotinoïdes) enregistrés au Cameroun, 133 enregistrés en Tanzanie (dont 6 types de néonicotinoïdes) et plus de 70 enregistrés en Côte d'Ivoire (Ngamo et al. 2018 ; Katambo et al. 2018 ; Akpessé et al. 2018).

Dans le contexte actuel de recherche de stratégie pour contrecarrer l'émergence rapide de la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs de maladie, l'introduction des néonicotinoïdes en santé publique est de plus en plus envisagée. Ainsi, la clothianidine est un néonicotinoïde qui a été évalué et pré-qualifié par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour une utilisation en pulvérisation intra domiciliaires (Figure 9). Elle existe aujourd'hui sous deux formulations : le SumiShield 50WG® (50% clothianidine) développé par Sumitomo Chemical et le Fludora® Fusion développé par Bayer Environmental Science qui est un mélange de 500g / kg de clothianidine et 62,5g / kg de deltaméthrine. A cause de son mode

d'action différent de celui des autres insecticides neurotoxiques tels que les pyréthrinoïdes, la clothianidine représente un potentiel dans la lutte antivectorielle surtout dans les zones de résistance élevée à plusieurs classes d'insecticides. L'évaluation des deux formulations à base de clothianidine sur le terrain a montré des résultats prometteurs sur l'efficacité contre différentes espèces d'anophèles résistants aux pyréthrinoïdes et une activité résiduelle durable sur diverses surfaces traitées (Agossa et al. 2018 ; Kweka et al. 2018 ; Uragayala et al. 2018). Par exemple, des études en cages expérimentales menées au Bénin ont démontré que la clothianidine et le Fludora® Fusion produisaient des taux élevés de mortalité contre *An. gambiae* pendant 8 mois (Fongnikin et al. 2020 ; Oxborough et al. 2019). Des études similaires en Inde à l'échelle d'un village ont montré une efficacité pendant 5 mois de la clothianidine contre *An. culicifacies* (Uragayala et al. 2018).

Cependant, selon l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), la résistance aux néonicotinoïdes a été rapportée chez plusieurs insectes d'intérêt agricole en Asie, en Europe et au nord de l'Amérique (Antony et al. 2019 ; Jin et al. 2019). De plus, des résidus de néonicotinoïdes ont été fréquemment constatés dans les flaques d'eau situées dans les champs ayant subi un traitement aux néonicotinoïdes (Samson-Robert et al. 2014). Une telle contamination peut représenter une source importante de sélection des larves de moustiques pour la résistance aux néonicotinoïdes à l'avenir et doit être surveillée.

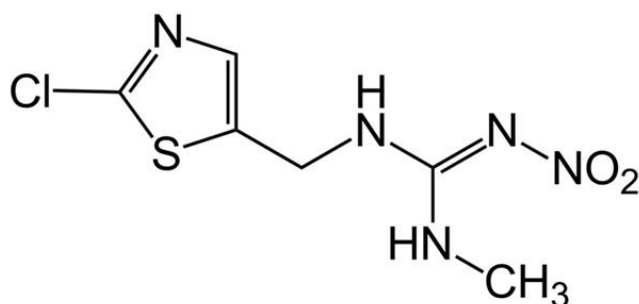


Figure 9 : Structure chimique de la Clothianidine

f. Régulateurs de croissance

Une nouvelle approche de la lutte contre les insectes nuisibles consiste à l'utilisation des régulateurs de croissance qui empêchent le développement des insectes. Ces substances agissent potentiellement sur les insectes et ont un effet sur certains processus de régulation physiologiques essentiels à leur développement normal ou de leur progéniture (Tunaz & Uygun 2004). Cependant, dans la lutte contre les vecteurs du paludisme, deux types de substances sont

principalement utilisées : les juvénoloïdes et les ecdysoïdes (Suman et al. 2013). Les juvénoloïdes tels que le pyriproxyfen sont des analogues de l'hormone juvénile qui perturbent la nymphose. Ces substances causent généralement la mort de l'insecte avant la nymphose ou au cours du stade nymphal. Tout comme les précédents, les ecdysoïdes tels que le diflubenzuron agissent sur le développement larvaire des moustiques. Cette substance inhibe la sclérification de la chitine et entraîne la mort de l'insecte avant d'atteindre le stade adulte. Bien que les régulateurs de croissance montrent une grande efficacité contre les moustiques aux stades larvaires, leur utilisation dans la lutte antivectorielle est limitée à des problèmes opérationnels à cause de leur coût élevé qui ne permettent pas aux programmes d'acquiescer la quantité de produit nécessaire pour assurer un traitement effectif et régulier.

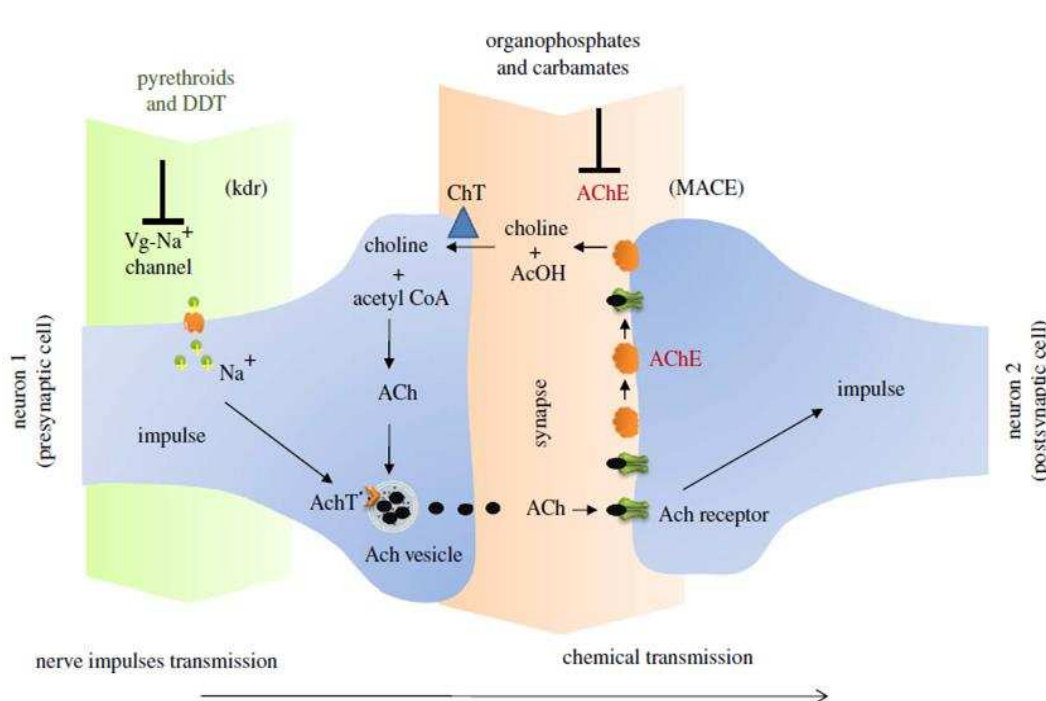


Figure 10 : Récepteur cible des insecticides chimiques classiquement utilisés en lutte antivectorielle. (David et al. 2013).

1.2.5. La place des insecticides dans le contrôle du paludisme en Afrique

À ce jour aucun vaccin efficace et opérationnel n'est disponible contre le paludisme. En effet, bien que le vaccin RTS, S/AS01 développé récemment contre *Plasmodium falciparum* semble permettre de diminuer l'incidence du paludisme (RTS, 2015). Cependant, l'efficacité limitée ne permet pas à ce vaccin de se substituer aux méthodes de lutte antipaludique existantes. Ainsi, la lutte contre le paludisme est encore basée en grande partie sur le traitement

des cas cliniques par des médicaments antipaludiques (WHO, 2013) et surtout sur la lutte antivectorielle. Cette dernière utilise principalement deux outils : les moustiquaires imprégnées d'insecticides et les pulvérisations intra domiciliaires. Ces outils ont pour principal but d'éliminer ou de réduire la densité des vecteurs et de limiter les contacts homme-vecteurs et donc la transmission du parasite.

a. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides

L'usage des moustiquaires contre les insectes nuisibles remonte au XXe siècle mais c'est seulement bien plus tard que cet outil a été introduit en hygiène tropicale (Trape 2001). Les premières moustiquaires imprégnées d'insecticides utilisées contre les vecteurs du paludisme ont été mises en place en 1983 au Burkina Faso (Darriet et al. 1985). Limitées par la durée d'action de l'insecticide qu'elles contenaient, ces moustiquaires ont été progressivement remplacées dans les années 2000 par des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILDA) (Guillet et al. 2001). Cette technologie permet d'avoir pendant plusieurs années l'insecticide disponible à la surface de la moustiquaire donc de maintenir son efficacité sur une longue période. Les MIILDA représentent aujourd'hui l'un des outils principaux de lutte contre le paludisme et depuis 2005, de nombreuses campagnes de distribution de MIILDA sont effectuées dans les pays subtropicaux endémiques au paludisme par les programmes nationaux de lutte sous l'égide de l'OMS. Les pyréthrinoïdes sont les principaux insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires, car en plus de leur toxicité à faible dose, ils ont un effet irritant et plus ou moins répulsif qui empêche les moustiques de se gorger au travers de la moustiquaire ou d'y pénétrer lorsqu'elle est endommagée. Des MIILDA combinant les pyréthrinoïdes à d'autres ingrédients actifs tels que le chlorfenapyr (insecticides de la famille des pyrroles), le pyriproxyfen (IGR) ou le pipéronyle butoxyde (PBO), un inhibiteur enzymatique qui synergise leur action, ont été aussi mis en place dans le but de renforcer leur efficacité contre les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes (Killeen & Ranson 2018).

b. Les pulvérisations intra domiciliaires (PID)

La pulvérisation intra domiciliaire (PID) est le second outil de lutte associé aux moustiquaires imprégnées contre les vecteurs du paludisme en Afrique. Les PID visent à appliquer un insecticide à effet rémanent sur les surfaces de repos des moustiques (WHO, 2015). Cet outil cible les moustiques adultes endophages (piquant à l'intérieur des habitations)

et endophiles (qui se reposent à l'intérieur après un repas de sang) comme *An. gambiae* et *An. funestus* ou bien *Ae. aegypti* en zone urbaine (Dunbar et al. 2019 ; Killeen, 2014). Le DDT fut le premier insecticide utilisé en PID dans de nombreuses campagnes de lutte contre le paludisme dans le monde entier. Les PID ont été utilisées avec succès contre les vecteurs des maladies telles que le Chagas et la leishmaniose (WHO 2010). Dans la lutte contre le paludisme, cette technique a permis de réduire la densité du vecteur majeur du paludisme *An. funestus* au Zimbabwe et dans l'est du Kenya (Abong'o et al. 2020; Kanyangarara et al. 2016).

Aujourd'hui, les PID, en conjonction avec le MILDA, jouent un rôle crucial dans toutes les stratégies de lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne. Entre 2012 et 2015 par exemple, des campagnes de PID avec différents types d'insecticides ont permis une réduction de près de 70 % des cas de paludisme au Mali comparés aux zones sans utilisation de PID (Wagman et al. 2018). Des résultats similaires ont été observés en Tanzanie avec une réduction de la prévalence du paludisme après des campagnes combinant PID et MILDA (Protopopoff et al. 2018). Cependant, la combinaison des PID et des MILDA n'est pas toujours plus efficace que les MILDA seules (Corbel et al. 2012). Ainsi, l'OMS recommande aux programmes de lutte d'atteindre une couverture suffisante de l'une des deux interventions. Mais en cas de déploiement des deux interventions dans la même zone, l'OMS¹ recommande fortement d'utiliser des non-pyréthrinoïdes pour les PID pour limiter la pression de sélection sur les pyréthrinoïdes.

1.3. Résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides

1.3.1. Mécanismes de résistances

La résistance aux insecticides est définie comme « une caractéristique héritable d'une espèce, permettant sa survie et sa reproduction à des doses létales d'insecticides pour la plupart des individus sensibles de cette même espèce ». La résistance aux insecticides est apparue chez les moustiques dès 1947 en Floride avec le DDT après seulement une année d'utilisation dans la lutte antivectorielle (Hemingway & Ranson 2000). Elle touche toutes les catégories d'insectes nuisibles dans les pays où leur utilisation est intensive (Metcalf 1989). Elle peut impliquer plusieurs mécanismes tels que l'évitement de l'insecticide (résistance comportementale), la modification de l'absorption de l'insecticide (résistance cuticulaire), la modification des voies de bio-dégradation de l'insecticide (résistance métabolique) et enfin la

¹ <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310862/9789241550499-eng.pdf?ua=1>

modification de sa cible biochimique via des mutations (Figure 11). Les résistances comportementale et cuticulaire restent encore des phénomènes peu connus dont le rôle réel dans le phénotype de résistance est souvent difficile à mettre en évidence. En revanche, les mécanismes métaboliques et les modifications des cibles biochimiques sont fréquemment associés à la résistance chez les moustiques. La résistance est dite « croisée » quand un mécanisme confère une résistance à plusieurs substances actives distinctes tandis qu'on parle de résistance « multiple » lorsque plusieurs mécanismes distincts confèrent une résistance à plusieurs substances actives.

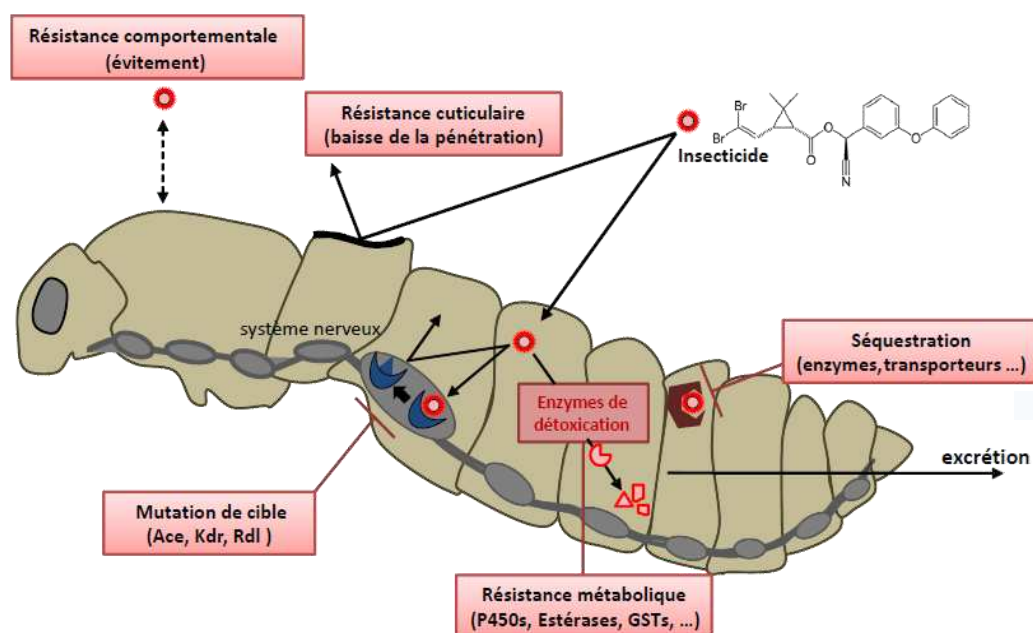


Figure 11 : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez le moustique. (Source : Thèse de Frédéric Faucon 2015)

a. Résistance comportementale

La résistance comportementale est caractérisée par un changement de comportement de l'insecte lui permettant d'éviter le contact avec l'insecticide. Dans certaines zones de résistance aux insecticides d'Afrique subsaharienne, l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées d'insecticides et les pulvérisations intra domiciliaire ont entraîné une modification du comportement des femelles du genre *Anopheles*. Par exemple, suite à des campagnes de déploiement massives de MILDA et de PID, des femelles *An. gambiae* et *An. funestus* ont adapté leurs comportements nutritifs développant ainsi l'exophagie et décalant le pic de leurs activités (Moiroux et al. 2012 ; Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011). Cette adaptation permettait aux moustiques d'éviter d'entrer en contact avec les insecticides. Aussi, une autre

adaptation des moustiques aux insecticides est le changement d'hôte. Par exemple, des études au Burkina Faso et en Tanzanie ont montré que l'utilisation des MILDA a conduit *An. gambiae* et de *An. funestus* auparavant anthropophiles à adopter un comportement zoophile afin de subsister (Lefèvre et al. 2009 ; Russell et al. 2011). En revanche, les mécanismes sous-jacents de ces modifications de comportement restent pour l'instant assez méconnus et leur héritabilité est encore discutée. Il a été proposé que la résistance comportementale peut être dépendante d'un stimulus impliquant une reconnaissance de la substance toxique par des récepteurs sensoriels de l'insecte et permettant l'évitement ou la limitation du temps de contact avec l'insecticide. En conclusion, bien que les mécanismes de la résistance comportementale des moustiques aux insecticides ne soient pas encore bien caractérisés, ce type de résistance est susceptible de contribuer de manière significative au phénotype global de résistance des populations naturelles. En conséquence, ce type de résistance est de mieux en mieux pris en compte dans les stratégies de gestion de la résistance (Carrasco et al. 2019).

b. Résistance cuticulaire

La résistance cuticulaire se définit par une réduction de la pénétration de l'insecticide dans l'insecte causée par une modification de la structure et/ou de la composition de sa cuticule (Figure 12) (Balabanidou et al. 2018). Ce mécanisme de résistance a été identifié chez de nombreux insectes, y compris les moustiques (Cornman et al. 2008 ; Lilly et al. 2016). Chez *An. gambiae* les protéines cuticulaires appartenant aux familles CPL et associées à l'épaisseur de la cuticule sont impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes, mais également à d'autres insecticides utilisés en santé publique en Afrique (Awolola et al. 2009 ; Vannini et al. 2014 ; Yahouédo et al. 2017).

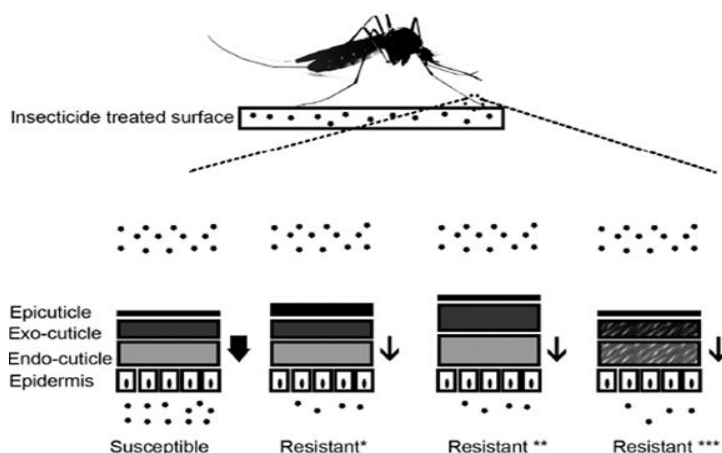


Figure 12 : Mécanismes de résistance cuticulaires (Balabanidou et al 2018) : * épaissement de l'épicuticule ; ** épaissement de la procuticule ; *** modification de la composition de la cuticule

c. Résistance par mutation de la cible

La résistance par mutation de cible consiste en une modification de la protéine ciblée par l'insecticide (*via* des mutations non-synonymes) entraînant une diminution de sa toxicité chez les individus résistants. Ce mécanisme est en général bien caractérisé chez les insectes, car les gènes qui codent pour les cibles des insecticides au niveau du système nerveux sont bien conservés. Les sites cibles des insecticides sont aussi conservés chez un grand nombre d'espèces (Ffrench-Constant et al. 1998 ; Ffrench-Constant et al. 2004). Les principales classes d'insecticides utilisées en santé publique ont des cibles biochimiques limitées. Le DDT et les pyréthrénoïdes ciblent le canal sodium voltage-dépendant (VGSC), les organophosphorés et les carbamates ciblent l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau des synapses nerveuses (Sparks & Nauen 2015) et les cyclodiènes ciblent les récepteurs GABA .

Les mutations kdr (knock down resistance)

Les mutations kdr (« knock down resistance mutations ») sont bien répandues chez les insectes et sont fréquemment associées à la résistance aux insecticides de types pyréthrénoïdes et DDT ciblant les canaux sodium voltage dépendant (Busvine, 1951 ; Dong & Scott 1994 ; Liu, 2015 ; Taylor et al. 1993). Ces mutations ont été observées pour la première fois chez la mouche domestique en 1950 (Zhong et al. 2013). Chez *An. gambiae*, ces mutations ont été mises en évidence dans les années 90 avec deux mutations distinctes identifiées dans le segment transmembranaire S6 du domaine II des canaux sodium en position 1014. La mutation « kdr Ouest » (L1014F), essentiellement rencontrée dans la partie ouest de l'Afrique subsaharienne, entraîne le remplacement d'une leucine par une phénylalanine (Martinez-Torres, Chandre et al. 1998). La mutation « kdr Est » (L1014S) est quant à elle principalement rencontrée en Afrique de l'Est et entraîne le remplacement de la leucine par une sérine (Ranson et al. 2000).

Les mutations kdr sont aujourd'hui largement distribuées chez *An. gambiae* à travers l'Afrique (Figure 10) avec une coexistence des mutations L1014F et L1014S (Fryxell et al. 2012 ; Nwane et al. 2011 ; Pinto et al. 2006). De plus, une mutation, N1575Y, détectée entre le domaine III et le domaine IV des canaux sodium voltage dépendant a été documentée chez des populations d'*An. gambiae* résistante au PYR (Jones et al. 2012). La mutation N1575Y serait susceptible de fournir un effet compensatoire en augmentant la sensibilité du canal sodium produit par la mutation L1014F.

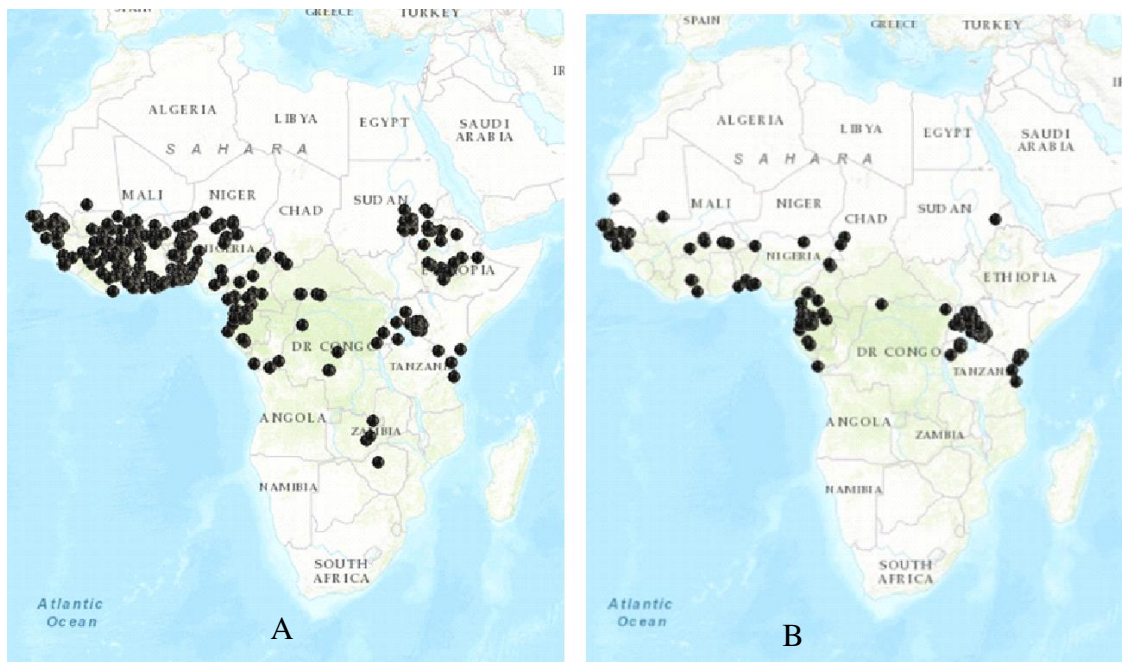


Figure 13 : Détection de la mutation kdr 1014F (A) et 1014S (B) chez *An. gambiae* (Source : IR Mapper (www.irmapper.com) 2020)

La mutation ACE-1

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme impliquée dans la régulation de la neurotransmission au niveau des synapses cholinergiques par la dégradation de l'acétylcholine en choline et acétate. L'acétylcholinestérase est la cible principale des insecticides de type carbamates et organophosphorés qui, en se fixant sur le site actif de l'enzyme, conduisent à son inactivation et à la mort de l'insecte par hyperexcitation post-synaptique. Deux gènes ACE-1 et ACE-2 codant pour l'acétylcholinestérase ont été identifiés chez les moustiques. Cependant, seule la mutation du gène ACE-1 a été impliquée dans la résistance aux carbamates et aux organophosphorés chez les moustiques (N'Guessan et al. 2003 ; Weill et al. 2004).

La mutation de l'acétylcholinestérase (ACE-1) est due à une substitution nucléotidique unique de la glycine en sérine à la position 119 dans le gène ACE-1 (G119S) qui réduit considérablement l'affinité de l'acétylcholinestérase pour les insecticides. La mutation G119S a été identifiée chez plusieurs espèces de moustiques telles que *An. gambiae*, *An. albimanus*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* (Liu, 2015), mais semble absente chez d'autres espèces telles qu'*Ae. aegypti* et *Aedes albopictus* en raison de contraintes génétiques (plusieurs changements nucléotidiques nécessaires pour le changement d'acide aminé) (Weill et al. 2004). La mutation ACE-1 G119S est présente dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne tels que le Nigéria (Chukwuekezie et al. 2020), la Côte d'Ivoire (Camara et al. 2018), le Burkina Faso (Guelbeogo et al. 2012), le Ghana (Essandoh et al. 2013), le Togo (Amoudji et al. 2019),

le Bénin (Salako et al. 2018) en Afrique de l'ouest et le Gabon, le Cameroun (Mourou et al. 2010 ; Settings et al. 2019) en Afrique centrale (Figure 14).

De plus, des allèles dupliqués d'ACE-1 ont également été signalés chez *An. gambiae* (Djogbénou et al. 2009 ; Edi et al. 2014). La duplication du gène Ace1 crée des allèles liés qui, lorsqu'ils sont combinés à un allèle non dupliqué, créent des génotypes hautement résistants aux insecticides tout en restaurant la fonctionnalité endogène ce qui permet de compenser le coût génétique associé à la mutation G119S (Labbé et al. 2007, 2014).

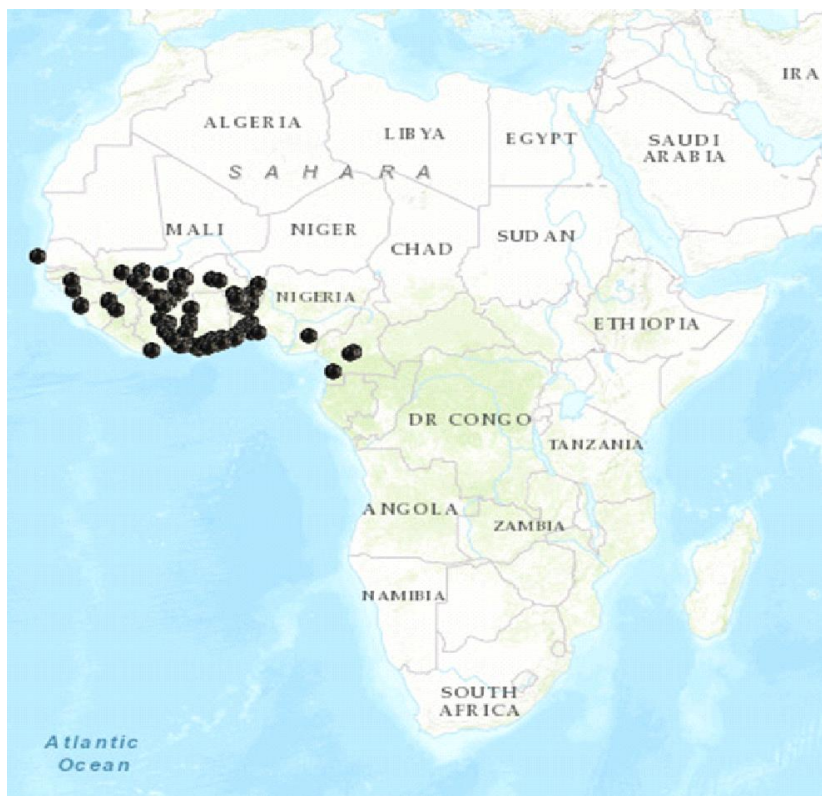


Figure 14 : Détection de la mutation ACE-1 chez *An. gambiae* (IR Mapper (www.irmapper.com) 2020)

La mutation RDL

Le récepteur GABA est un canal ionique membranaire sur lequel se fixe l'acide γ -aminobutyrique (Du et al. 2005). C'est la cible des insecticides tels que la dieldrine, le fipronil et le lindane qui bloquent leur fonctionnement et perturbant le flux d'ions chlorure dans le système nerveux entraînant la mort de l'insecte par hyperexcitation synaptique. La résistance à la dieldrine chez *An. gambiae* est apparue au Nigeria après un programme pilote de lutte antivectorielle utilisant cet insecticide (Elliott, 1956). La mutation RDL résulte d'une substitution de l'alanine par une sérine ou une glycine en position 296 (A296S/G) du domaine

transmembranaire M2 (Du et al. 2005). La mutation A296G a été observée en 2005 chez *An. gambiae*, comme étant associée à la résistance à la dieldrine (Du et al. 2005). Une autre mutation A296S a été observée chez *An. gambiae* en République démocratique du Congo et chez d'autres vecteurs de paludisme et d'arboviroses tels que *An. funestus*, *An. stephensi* et *Ae. aegypti* (Du et al. 2005 ; Nardini et al. 2017 ; Wondji et al. 2011). La résistance à la dieldrine par la mutation en position 296 ne semble pas être associée à un coût génétique élevé chez les vecteurs et sa fréquence peut parfois rester élevée dans les populations naturelles et ce même après plusieurs années d'arrêt des traitements (Hargreaves et al. 2000).

d. Résistance métabolique

Généralités

La résistance métabolique consiste en une dégradation accrue et/ou une séquestration de l'insecticide par des enzymes dites « de détoxification ». Ce mécanisme est très développé chez les insectes suite à la coévolution entre les plantes synthétisant des composés secondaires toxiques et les insectes phytophages développant des enzymes capables de les neutraliser (Després et al. 2007). Le système de détoxification est un système multi-enzymatique présent chez la plupart des êtres vivants et au sein duquel certaines enzymes sont capables de dégrader les xénobiotiques, les rendant plus hydrophiles et facilitant leur excrétion par l'organisme. Ces enzymes sont généralement classées en trois catégories : les enzymes de phase I ou de fonctionnalisation, les enzymes de la phase II ou de conjugaison et les enzymes de phases 3 ou d'excrétion. La phase I regroupe des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse qui conduisent à la formation de métabolites plus polaires qui peuvent être éliminés s'ils ont atteint un degré d'hydrophilie suffisant. Les réactions de phase I sont principalement médiées par les monooxygénases à cytochrome P450 (oxydation) et les estérases (hydrolyse). Lorsque le degré d'hydrophilie n'est pas suffisant pour l'excrétion, les métabolites issus de la phase I peuvent être pris en charge par les enzymes de phase II. La phase II concerne les réactions de conjugaison au cours desquelles un composé endogène hydrosoluble (glutathion, acide glucuronique, glucose ...) va être conjugué au xénobiotique le rendant ainsi plus facilement excrétable. Toutefois, ces différentes phases peuvent être indépendantes les unes des autres. Les réactions de phase I ne sont pas toujours suivies d'une réaction de phase II et inversement certains insecticides peuvent directement subir des réactions de phase II sans modification de phase I au préalable.

Les enzymes de détoxications fréquemment impliquées dans la résistance des moustiques aux insecticides chimiques appartiennent principalement à trois familles : les monooxygénases à cytochrome P450 (P450s, phase I) ; les carboxylestérases (COEs, phase I), les glutathion-S-transférases (GSTs, phase II). Néanmoins, d'autres familles enzymatiques peuvent aussi intervenir dans les voies métaboliques associées à la dégradation des insecticides telles que les Uridine-glucuronyl-transferases (UGT) (Pan et al. 2018). D'autres enzymes, non impliquées directement dans la dégradation des xénobiotiques mais dans leur transport (phase III) ont également été associées à la résistance aux insecticides. C'est le cas des ABC transporteurs qui participent à la défense cellulaire en réduisant la concentration intracellulaire en insecticide (Mastrantonio et al. 2017).

Les Cytochromes P450 (P450s)

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines (protéines associées à un noyau d'hème ferreux) membranaires majoritairement localisées au niveau du réticulum endoplasmique et plus rarement dans les mitochondries. Les cytochromes P450 (P450s ou CYP pour les gènes) impliqués dans la détoxication sont généralement exprimés majoritairement dans les cellules du tube digestif, des tubes de Malpighi et des corps gras de l'insecte (Haubruge & Amichot 1998). Les P450s catalysent des réactions d'oxydation de substrats divers (lipides, xénobiotiques, hormones) à partir de l'oxygène moléculaire (Hargreaves et al. 2000). Ce sont des accepteurs d'une chaîne de transporteurs d'électrons qui comporte une flavoprotéine : la NADPH-cytochrome P450 réductase qui transfère les électrons du NADPH au P450 (Figure 15). Dans certains cas, le couple NADH- cytochrome réductase/cytochrome b5 peut intervenir comme transporteur supplémentaire d'électrons, l'accepteur final étant toujours le P450 (Haubruge & Amichot 1998 ; Moldenke et al. 1984).

Les P450s sont présents chez tous les êtres vivants et particulièrement diversifiés chez les insectes en lien avec leur rôle évolutif dans la détoxification des composés végétaux toxiques (Scott 1999). De manière générale, un niveau élevé de P450s est fréquemment associé à la résistance aux pyréthréinoïdes chez les moustiques (Hemingway et al. 2004). Ainsi, l'étude du génome de moustique a révélé qu'il existait une large variété de famille de P450s dont 111 chez *An. gambiae* (Ranson et al. 2002). Les P450s sont impliqués dans le métabolisme de plusieurs xénobiotiques naturels ou anthropiques et ont parfois la capacité d'être induits par une large gamme de xénobiotiques retrouvées dans le biotope des moustiques. Par exemple, une exposition de larves de moustiques à divers polluants ou divers insecticides augmente leur

tolérance aux insecticides grâce à une induction de multiples P450s (David et al. 2006, 2010 ; Poupardin et al. 2008 ; Riaz et al. 2009).

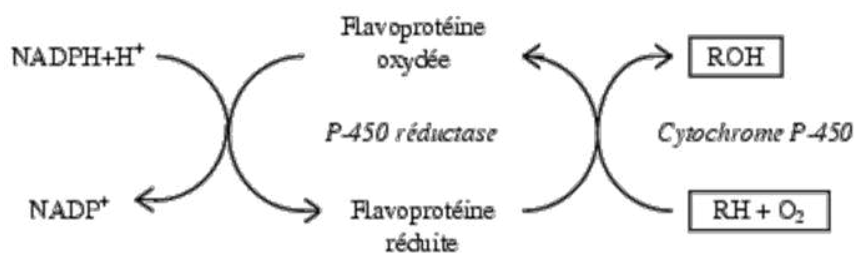


Figure 15 : Schéma simplifié de la réaction d'oxydation d'un xénobiotique (RH) par les CYPs.
(Thèse Fanny louat 2014)

Des études basées sur des analyses transcriptomiques et la quantification d'expression des gènes par RT-qPCR ont permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs P450s dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez des souches d'*An. gambiae* de terrain ou de laboratoire (Bonizzoni et al. 2012 ; David et al. 2005 ; Djouaka et al. 2008 ; Mitchell et al. 2012). Parmi ces gènes associés à la résistance, les familles des gènes CYP6Ps, CYP6Zs et CYP6Ms sont les plus couramment détectées (David et al. 2013 ; Djouaka et al. 2008 ; Liu 2015). Certains P450s ont été validés fonctionnellement vis à vis de leur capacité à métaboliser les insecticides chez *An. gambiae* (Tableau1). CYP6P3 dont l'orthologue est CYP6P9 chez *An. funestus* est capable de métaboliser les pyréthriinoïdes (Kwiatkowska et al. 2013 ; Riveron et al. 2013 ; Stevenson et al. 2011 ; Vontas et al. 2018 ; Yahouédo et al. 2016) tandis que CYP6M2 est capable de métaboliser à la fois les pyréthriinoïdes, le DDT et les carbamates (Edi et al. 2014 ; Ingham et al. 2018 ; Mitchell et al. 2012). Quant à CYP6Z1, la validation de son rôle dans le métabolisme du DDT a été mise en évidence dans plusieurs études (Chiu et al. 2008 ; Main et al. 2018 ; John Vontas et al. 2018) mais son rôle dans la résistance aux pyréthriinoïdes reste encore à valider. Par ailleurs, plusieurs autres P450s appartenant à plusieurs familles (CYP4G, CYP4H, CYP6N, CYP6M, CYP6P, CYP6Z, CYP9K, CYP12F, CYP325A et CYP325D) (Tableau 1) sont régulièrement identifiés comme étant surexprimés chez des souches d'anophèles résistantes aux pyréthriinoïdes et au DDT (Antonio-Nkondjio et al. 2016 ; Bonizzoni et al. 2015 ; David et al. 2005 ; Djouaka et al. 2008 ; Kwiatkowska et al. 2013 ; Nardini et al. 2017 ; Nkya et al. 2014). Les P450s impliqués dans la résistance aux insecticides ont été identifiés dans la plupart des régions endémiques au paludisme d'Afrique subsaharienne (Figure 16) (Mohammed et al. 2017 ; Vontas et al. 2020).

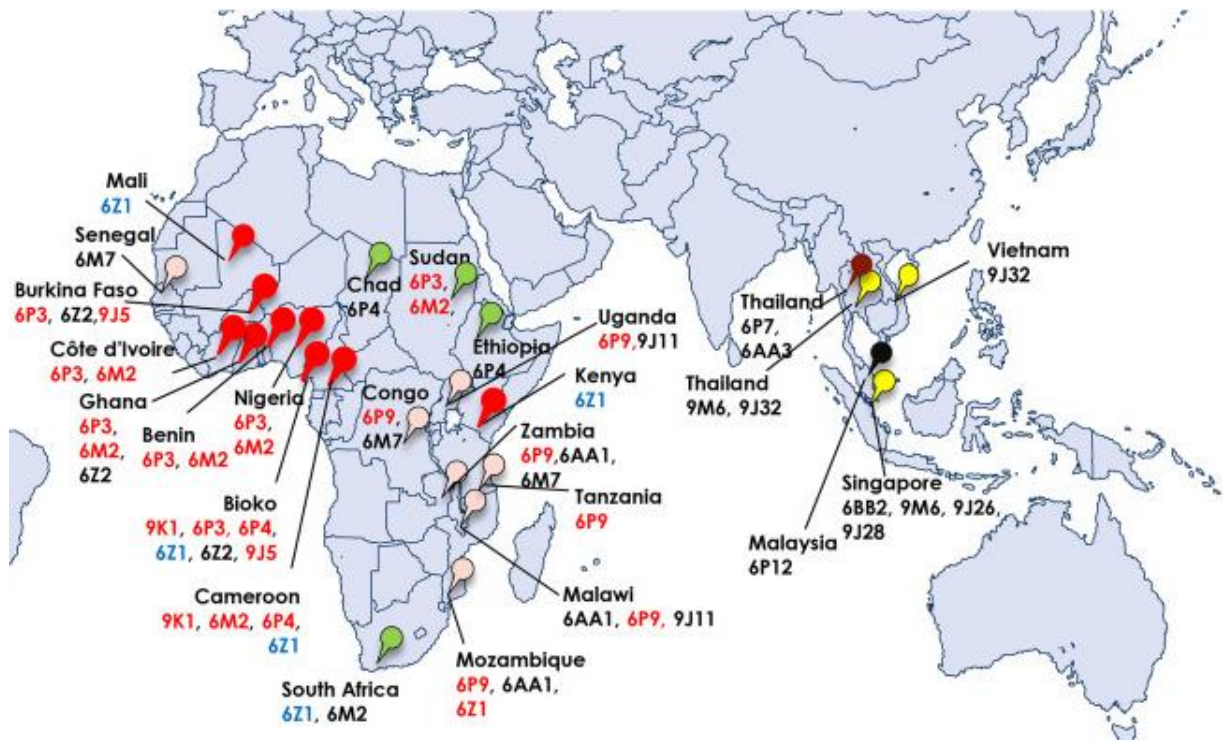


Figure 16 : La répartition géographique de la résistance métabolique liée au P450 basée sur une surexpression significative de gènes fonctionnellement validés (Vontas et al. 2020)

Tableau 1 : P450s impliqués dans la résistance aux insecticides chez Anophèles

Nom du gène	espèces	Pays	Insecticides	Références
CYP325A3	An.gambiae	Kenya	Permethrin	David et al 2005
CYP325D2	An.gambiae	Benin	Permethrin	Djouka et al 2008
CYP9J5	An.gambiae	Kenya	Permethrin	David et al 2005
CYP4G16	An.gambiae	Burkina Faso	PYR	Toe et al 2015
		Tiassalé/ CI	pyrethroids	Balabanidou et al 2016
		Cameroun	PYR-Bendio	Bamou et al 2019
	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
	An.gambiae	Kenya	Deltamethrine	Bonizzoni et al 2015
	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP4C26	An.gambiae	Kenya	Deltamethrine	Bonizzoni et al 2015
CYPC27				
CYP4D17	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP4J10	An.gambiae	Tanzanie	DDT	N'kya et al 2014
CYP6AA1	An.gambiae	Kenya	Permethrin	David et al 2005
	An.gambiae	Burkina Faso	PYR-DDT	Kwiatkowska et al 2013
CYP6AH1	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP6AG2	An.gambiae	Burkina Faso	PYR-DDT	Kwiatkowska et al 2013
CYP6M1	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP6M2	An.gambiae	Ghana	Permethrin	Muller et al 2007
		Benin	Permethrin	Djouka et al 2008
		Nigeria	Permethrin	Djouka et al 2008
		Nigeria	Permethrin	Djouka et al 2008
		Kenya	Permethrin/ Deltamethrin	Stevenson et al 2011
		Ghana	DDT	Mitchell et al 2012
		Cameroon	DDT	Tene et al 2013
		Cote d'Ivoire	Bendiocarb	Edi et al 2014
		Benin	Deltamethrine	Yahouédo et al 2016
		Burkina Faso	Permethrin/ Deltamethrin	Toe et al 2018
		RDC	Pyr-DDT-Carb-fenithro	Nardini et al 2018
	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP6M3	An.gambiae	Burkina Faso	PYR-DDT	Kwiatkowska et al 2013
CYP6N1	An.gambiae	Nigeria	Permethrin	Djouka et al 2008
CYP6P1	An.gambiae	Kenya	Deltamethrine	Bonizzoni et al 2015
		Tanzania	Pyr-DDT-Carb-fenithro	N'kya et al 2014
		RDC	PYR-DDT-Carb-fenithro	Nardini et al 2018
CYP6P3	An.gambiae	Nigeria	Permethrin	Djouka et al 2008
		Nigeria	Permethrin	Djouka et al 2008
		Ghana	Permethrin	Muller et al 2008a
		Cameroon	DDT	Tene et al 2013
		Cote d'Ivoire	Bendiocarb	Edi et al 2014
		Benin	Deltamethrine	Yahouédo et al 2016
		Guinée Equatoriale	Deltamethrine/Bendiocarb	Vontas et al 2018
		Burkina Faso	PYR-DDT	Kwiatkowska et al 2013
CYP6P4	An.gambiae	Cameroon	DDT	Tene et al 2013
		Cote d'Ivoire	Bendiocarb	Edi et al 2014
		Guinée Equatoriale	Deltamethrine/Bendiocarb	Vontas et al 2018
		Burkina Faso	Permethrin/ Deltamethrin	Toe et al 2018
CYP6P5	An.gambiae	Cote d'Ivoire	Bendiocarb	Edi et al 2014
CYP6Z1	An.gambiae	Kenya	Permethrin	David et al 2005
		Mali	Permethrin	Main et al 2018
		Guinée Equatoriale	Deltamethrine/Bendiocarb	Vontas et al 2018
CYP6Z2	An.gambiae	Ghana	Permethrin	Muller et al 2007
	An.gambiae	Guinée Equatoriale	Deltamethrine/Bendiocarb	Vontas et al 2018
	An.gambiae	Burkina Faso	Permethrin/ Deltamethrin	Toe et al 2018
CYP6Z3	An.gambiae	Burkina Faso	Permethrin/ Deltamethrin	Toe et al 2018
CYP9K1	An.gambiae	Guinée Equatoriale	Deltamethrine	Vontas et al 2018
	An.coluzii	Burkina Faso	Deltamethrine	Ingham et al 2020
CYP9L3	An.gambiae	Tanzania	Pyr-DDT-Carb-fenithro	N'kya et al 2014
CYP9L4	An.gambiae	Tanzania	Pyr-DDT-Carb-fenithro	N'kya et al 2015
CYP12F1	An.gambiae	Cameroon	Pyr	Nkondjio et al 2016
CYP4C26	An.albimanus	Amérique	Alpha cypermethrine	Mackenzie-Impoinvil et al 2019
CYP6AA2	An.minimus	Thailand	Deltamethrine Alphacypermethrine	Rongnoparut et al 2003
CYP9K1	An.albimanus	Peru-Guatemala	Deltamethrine Alphacypermethrine	Mackenzie-Impoinvil et al 2019
CYP6AA1	An.funestus	Benin, sud afrique ouganda	PYR	Ibrahim et al 2018
CYP4H24	An.arabiensis	Cameroon	Deltamethrine	muller et al 2008
CYP6M7	An.funestus	Zambie	PYR-DDT-Carbamate	Riveron et al 2014

En gras : gènes validés fonctionnellement dans la résistance aux insecticides

Les Carboxylestérases (COEs)

Les estérases sont des enzymes de phase I capables d'hydrolyser une liaison ester. Le terme carboxy/choline estérase (CCE) rassemble les carboxylestérases qui agissent sur un ester carboxylique ainsi que les cholinestérases (agissant sur l'acétylcholine ou la butyrylcholine). Les carboxylestérases (COEs) sont souvent classées en deux groupes : les α -estérases et les β -estérases selon leur capacité à métaboliser les substrats synthétiques α -naphyl-acétate et β -naphyl-acétate. Les CCE sont impliquées chez les insectes dans la reproduction, le métabolisme des hormones, la digestion et la neurotransmission (Haubruge & Amichot 1998).

Les COEs sont associées à la résistance aux insecticides chez de nombreux insectes d'intérêts agricoles tels que *Plodia interpunctella*, ravageur domestique de produits alimentaires stockées (Beeman & Schmidt 1982), *Lucilia cuprina*, ectoparasite des ovins (Parker et al. 1991) et des insectes vecteurs de pathogènes tels que les moustiques (Marcombe et al. 2012 ; Poupardin et al. 2014). Chez les moustiques, les estérases sont principalement associées à la résistance aux organophosphorés (Karunaratne & Hemingway 2001 ; Peiris & Hemingway 1990). Par exemple, une étude au Sri Lanka a montré une spécificité des carboxylestérases dans la résistance au malathion chez des espèces d'*Anopheles* et de *Culex* (Karunaratne & Hemingway 2001). Selon d'autres études, la résistance à d'autres types d'insecticides tels que les carbamates et les pyréthrinoïdes pourrait impliquer les estérases (Devonshire et al. 1986 ; Peiris & Hemingway 1990). Cette hypothèse a été supportée par l'usage de tests biochimiques et d'inhibiteurs d'estérases sur des populations d'*An. gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes et aux carbamates. Les résultats de ces tests montraient que les COEs pouvaient jouer un rôle important dans la résistance à ces insecticides (Chouaïbou et al. 2014 ; Corbel et al. 2007 ; Namountougou et al. 2012 ; Vulule et al. 1999).

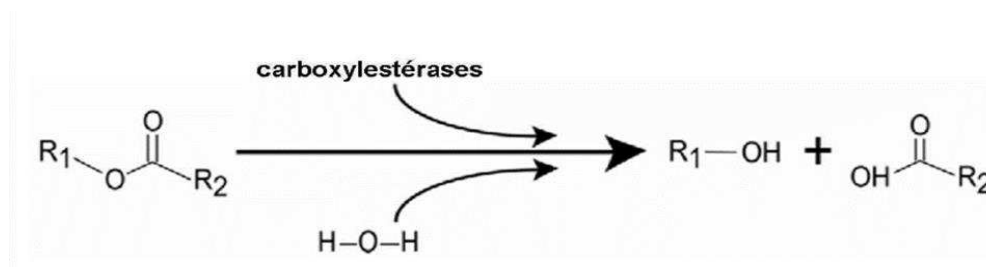


Figure 17 : Réaction d'hydrolyse d'un substrat par les carboxylestérases. (D'après Montella et al., 2012).

Les Glutathion S-transférases (GSTs)

Les GSTs sont des enzymes de phase II capables de conjuguer certains métabolites primaires de xénobiotiques en composés hydrophiles plus facilement excrétables par l'organisme. Elles jouent un rôle important dans la détoxification des composés endogènes, le transport intercellulaire, la biosynthèse d'hormones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydant (Enayati et al. 2005). Chez les insectes, les GSTs appartiennent en majorité à deux classes dénommées Delta (GSTD) et Epsilon (GSTE). Elles catalysent principalement une réaction de conjugaison qui permet d'associer le substrat au groupement thiol de la molécule de glutathion réduit (GSH) (Figure 15).

Des niveaux élevés de l'activité des GSTs ont été détectés chez des populations d'insectes résistants aux organochlorés, aux organophosphorés et aux pyréthrinoïdes (Li et al. 2007). Cependant, ces enzymes ne seraient pas capables de métaboliser directement les pyréthrinoïdes, mais seraient plutôt impliqués dans la séquestration de ces insecticides (Kostaropoulos et al. 2001 ; Vontas et al. 2001). Chez *An. gambiae*, certaines études ont montré que AgGSTE2 et son orthologue AaGSTE2 chez *Ae. aegypti* confère une résistance au DDT par déchloration (Lumjuan et al. 2005 ; Ranson et al. 2001 ; Mitchell et al. 2014). D'autres études ont montré la surexpression de ce gène chez des populations résistantes aux pyréthrinoïdes (Ranson et al. 2001 ; Vontas et al. 2001 ; Vontas et al. 2002). Chez *An. funestus*, (Riveron et al. 2014) il a été montré que le gène *GSTe2* était associé à la résistance au DDT. Cette étude a révélé qu'une modification non-synonyme de la structure de ce gène (L119F) serait à l'origine de l'augmentation de l'activité de métabolisme vis-à-vis du DDT. D'autres gènes appartenant à la famille des GSTs tels que les GSTDs (*GSTD1* et *GSTD2*) ont aussi été associés à la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Culex pipiens*. Des résultats similaires ont également été rapportés chez d'autres insectes résistants au DDT tels que la drosophile (Low et al. 2010), *Nilaparvata lugens* et *Plutella xylostella* (Sonoda & Tsumuki 2005 ; Vontas et al. 2001).

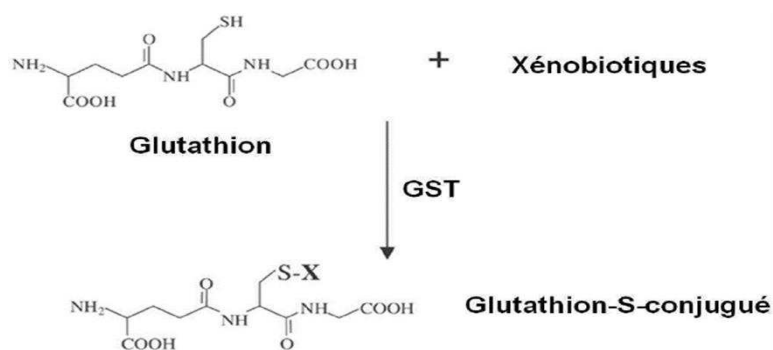


Figure 18 : Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisé par une GST (Thèse Fanny louat 2014)

Les UDP-glycosyltransférases (UGTs)

Les UGTs sont des enzymes de détoxification de phase II qui jouent un rôle important dans la biotransformation des composés exogènes et endogènes (Bock, 2003).

Les UGTs sont impliqués dans la résistance aux toxines des plantes et dans la biotransformation de certains xénobiotiques toxiques chez de nombreuses espèces d'insectes (Ahmad & Hopkins 1993; Després et al. 2007; Kreml et al. 2016; Luque et al. 2002). Chez les moustiques, bien que le rôle précis des UGTs dans la résistance aux insecticides reste encore mal connu, ces enzymes sont souvent surexprimées de manière constitutive chez les populations résistantes aux insecticides (Nkya et al. 2014 ; Poupardin et al. 2010 ; Vontas et al. 2005 ; Zhou et al. 2019).

Les ABC (ATP-binding cassette) transporteurs

Les ABC transporteurs sont des enzymes qui couplent l'hydrolyse de l'ATP aux transports actifs d'une grande variété de substrats tels que les sucres, les lipides, les peptides et les protéines (Toyoda et al. 2008). Ces enzymes sont impliquées dans l'excrétion des xénobiotiques ou de leurs métabolites (phase III). Chez les moustiques, elles sont probablement impliquées dans l'excrétion des insecticides servant ainsi de mécanisme de tolérance précoce et basique (Pittendrigh et al. 2014).

Chez les moustiques, les ABC transporteurs ont été impliqués dans la défense contre de nombreuses classes d'insecticides (Dermauw & Van Leeuwen 2014). Les gènes appartenant à la famille des ABCC et ABCG sont considérés comme les premières lignes de défense contre un grand nombre de xénobiotiques incluant les insecticides (Buss & Callaghan 2008). Par exemple, chez certaines espèces d'*Anopheles* et d'*Aedes*, une surrégulation des ABC transporteurs a été observée chez des larves de moustiques sensibles après une exposition aux insecticides supposant que les ABC transporteurs jouent un rôle important dans la défense contre les insecticides (Epis et al. 2014 ; Figueira-Mansur et al. 2013). De plus, plusieurs ABC transporteurs sont fréquemment surexprimés chez les populations de moustiques résistantes aux insecticides (Tene et al. 2013). Les enzymes ABCG4 et ABCH ont été associées à la résistance au DDT et à la perméthrine chez des populations d'*An. Arabiensis* au sud du Burkina Faso (Jones et al. 2012) et dans le nord de la Tanzanie (Matowo et al. 2014). Néanmoins, l'importance relative des ABC transporteurs dans la résistance aux insecticides chez les moustiques reste encore mal évaluée.

1.3.2. Bases moléculaires de la résistance métabolique

Théoriquement, la résistance métabolique aux insecticides peut être la conséquence de deux mécanismes distincts dont les effets peuvent être additifs au regard du phénotype de résistance. Tout d'abord, la surproduction de certaines enzymes de détoxification par l'insecte peut permettre une biodégradation plus élevée de l'insecticide et donc une augmentation de la survie. Ensuite, une modification structurale de certaines enzymes peut aussi avoir pour conséquence une augmentation du métabolisme de l'insecticide par augmentation de l'affinité de l'enzyme pour l'insecticide et/ou une meilleure association avec ses partenaires enzymatiques et cofacteurs. Bien que ces deux mécanismes aient été identifiés chez les insectes (Li et al. 2007), la surproduction d'enzymes de détoxification reste le mécanisme le plus fréquemment identifié dans les populations de moustiques résistantes aux insecticides (David et al. 2005 ; Müller et al. 2008).

a. Surproduction d'enzymes de détoxification

La surexpression des enzymes de détoxification constitue une réponse et un moyen de défense contre les xénobiotiques chez les moustiques. Ce mécanisme peut être constitutif ou induit. Bien que ces deux phénomènes puissent être sélectionnés chez les populations résistantes et agir conjointement (Li et al. 2007 ; Nkya et al. 2013), la majorité des travaux sur la résistance réalisée chez les moustiques portent sur les aspects constitutifs. La surexpression constitutive d'enzymes de détoxification chez les populations résistantes aux insecticides est généralement héritable et peut résulter de plusieurs mécanismes génétiques distincts. Elle peut tout d'abord être la conséquence d'une sur-transcription du/des gène(s) associé(s) sous l'effet de modifications affectant des éléments de régulation en *cis* (à proximité du gène) ou bien en *trans* (sur une autre région du génome) (Li et al. 2007). Ce mécanisme apparaît courant dans les populations naturelles bien que les modifications des éléments régulateurs ne soient que rarement caractérisées. Ainsi dans la plupart des cas, la surexpression survient suite à des insertions ou des délétions (indels) dans les séquences promotrices en *cis* et/ou dans le loci régulateurs en *trans*. Certaines études ont révélé que la régulation *trans/cis* était un facteur clé de la surexpression des gènes de résistance chez de nombreux insectes (Li et al. 2013 ; Li et al. 2007 ; Tian et al. 2011). Cela a été décrit chez *Ae. aegypti* avec une surexpression du gène *GSTe2* en conséquence d'une mutation dans un facteur *trans* associée à la résistance au DDT (Lumjuan et al. 2005). Aussi, chez une souche de *Culex quinquefasciatus* résistante à la perméthrine, un élément transposable partiel CuRE1 se trouvant directement en amont du gène

CYP9M19 semble agir comme un élément cis régulateur de son expression (Wilding et al. 2012).

La surexpression d'enzymes de détoxification peut aussi être la conséquence d'une augmentation du nombre de copies des gènes codant pour ces enzymes. On parle alors de duplication génique ou bien d'amplification génique lorsque le nombre de copies est important. La duplication génique apparaît comme un mécanisme adaptatif assez fréquent chez les moustiques. Ces mécanismes ont été plusieurs fois décrits et associés à la résistance aux insecticides chez de nombreuses espèces de moustiques. Par exemple chez *Culex pipiens*, des souches résistantes aux organophosphorés ont montré une surproduction d'estérases par rapport à la souche sensible grâce à un processus d'amplification du nombre copié des gènes qui les codent dans le génome. Le rôle des duplications géniques d'enzymes de détoxification dans la résistance aux insecticides a également été montré chez les moustiques du genre *Aedes* et *Anopheles* (Raymond et al. 2001 ; Faucon et al. 2015 ; Grigoraki et al. 2015 ; Weetman et al. 2018 ; Lucas et al 2019 ; Cattel 2019, 2020).

b. Modifications structurales des enzymes de détoxification

Une ou plusieurs mutations ponctuelles au niveau de la structure de l'enzyme peuvent modifier son activité aboutissant à un meilleur métabolisme des insecticides (Haubruge & Amichot 1998). Des travaux réalisés sur diverses espèces d'insectes ont démontré l'existence de ce mécanisme dans la biodégradation des insecticides. L'hypothèse de l'impact de variations structurales affectant la capacité des enzymes de détoxification à métaboliser les insecticides avait été déjà émise à propos des estérases dans les années 60 pour expliquer la résistance de la mouche *Musca domestica* aux organophosphorés. Cette hypothèse a ensuite été confirmée chez une autre mouche résistante *Lucilia cuprina* des années plus tard (Oppenoorth & van Aspere 1960 ; Whyard et al. Walker 1993). Chez les moustiques, il a également été montré chez *Culex tarsalis* que la résistance au malathion était due à un changement au niveau d'un enzyme estérase (MCE) comparé à la souche sensible (Whyard et al. 1994). De façon similaire la mutation ponctuelle L119F affectant le gène *GSTE2* chez *An. funestus* a été associée à une augmentation du métabolisme du DDT mais aussi de la perméthrine (Riveron et al. 2014).

c. Plasticité environnementale des enzymes de détoxification et impact sur la tolérance aux insecticides

La capacité du système de détoxification à être inductible par la présence de xénobiotiques a été montré chez de nombreux organismes, y compris les moustiques (Le Goff et al. 2006 ; Nkya et al. 2013 ; Poupardin et al. 2010 ; Suwanchaichinda & Brattsten 2001). Les gîtes à moustiques où se développent les larves sont fréquemment contaminés par des polluants anthropiques divers tels que les résidus de pesticides (herbicides, fongicides, insecticides) utilisés en agriculture et en santé publique, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs), les polychlorobiphényles (PCBs), les métaux lourds ou bien les résidus de médicaments en milieu urbain. Des composés végétaux secondaires (polyphénols, alcaloïdes) ainsi que les toxines d'origine microbienne susceptibles d'impacter la réponse des insectes par enzymes de détoxification peuvent aussi être présents dans certains gîtes naturels. Ainsi, cette plasticité des enzymes de détoxification *via* des interactions de type « gènes-environnement » est susceptible d'affecter la tolérance des moustiques aux insecticides utilisés en santé publique. Chez le moustique *Ae. aegypti*, l'impact des xénobiotiques sur l'expression des enzymes de détoxifications a été montrée sur des moustiques exposés à des doses sublétales de différents xénobiotiques (Poupardin et al. 2010). Par ailleurs, des expositions en laboratoire de larves de moustiques à des doses sublétales de fluoranthène (PAHs), de glyphosate, de benzo[a]pyrene, d'insecticides ou de polluants anthropiques ont également montré un effet sur leur tolérance aux insecticides associé à une modification de la transcription des enzymes de détoxification (Marcombe et al. 2012 ; Poupardin et al. 2008 ; Riaz et al. 2009). D'autres études réalisées sur des populations naturelles de moustiques au Nigeria et au Bénin ont révélé que les moustiques collectés dans des gîtes contaminés par des particules de pétrole avaient une tolérance significative à la perméthrine associée à de multiples enzymes de détoxification surexprimées comparativement aux moustiques collectés dans des gîtes non pollués (Djouaka et al. 2007, 2008). De nombreuses autres études chez *An. gambiae* ont également révélé que l'exposition des moustiques aux pesticides utilisés en agriculture pouvait induire une tolérance accrue aux insecticides ou bien une pression de sélection significative affectant les allèles de résistance aux insecticides utilisé en lutte antivectorielle (Chouaïbou et al. 2016 ; Diabaté et al. 2002 ; Nkya et al. 2013).

1.4. Détection, suivi et gestion de la résistance aux insecticides

1.4.1. Détection et suivi spatio-temporel de la résistance

La détection et la surveillance de la résistance aux insecticides sont essentielles afin de suivre les niveaux et les mécanismes de résistance circulants dans les populations naturelles de vecteurs. Cela permet aussi la mise en œuvre en amont de stratégies de lutte plus efficaces selon les mécanismes de résistance identifiés et leurs fréquences. La détection et le suivi de la résistance reposent sur deux méthodes essentielles : les tests de sensibilités biologiques et les tests biochimiques associés aux activités de détoxication.

a. Tests de sensibilités biologiques (Bio-essais)

Les bio-essais représentent le moyen le plus simple pour détecter et suivre la résistance aux insecticides dans les populations naturelles de moustiques. Les tests diagnostiques consistent à exposer des moustiques (larves ou adultes) à une concentration définie d'insecticide pendant un temps donné puis à évaluer la mortalité. Les doses diagnostiques préconisées par l'OMS correspondent soit au double de la dose létale qui entraîne systématiquement une mortalité de 100 % ($2 \times LD_{100}$), ou au double de la concentration létale de 99,99% ($2 \times LC_{99,99}$) sur une population sensible à partir de la droite de regression Log-probit (WHO 2016). Ces concentrations sont largement utilisées dans le suivi de la résistance aux insecticides chez les moustiques, car elles permettent d'évaluer la fréquence d'individus résistants dans la population. Cependant, l'utilisation de la concentration diagnostique ne permet pas de déterminer le niveau de la résistance dans une population de vecteurs lorsque la résistance est détectée. Dans ce cas, des tests doses-réponses en comparaison avec des populations sensibles de référence sont utilisés afin d'évaluer conjointement la fréquence et le niveau de résistance (WHO 2016). Bien que cette méthode soit plus fine que la première, elle est plus contraignante, car elle nécessite un nombre beaucoup plus élevé d'individus à tester et nécessite également des populations sensibles. Les bio-essais peuvent être effectués sur les larves ou des moustiques adultes, mais du fait de la faible utilisation des larvicides dans les programmes de lutte contre le paludisme en Afrique, les moustiques adultes restent les plus utilisés.

Les tests biologiques en tube préconisés par l'OMS

Les tests en tube OMS sont des tests standardisés permettant d'évaluer la mortalité des moustiques après une exposition à une dose diagnostique d'un insecticide donné. Ces tests

consistent à exposer des moustiques pendant 1 h à des papiers filtres imprégnés d'insecticide suivant la procédure et de déterminer la mortalité après 24 heures ou à plus long terme pour certains insecticides à effet plus lent (WHO 2016). Ces tests sont effectués sur des femelles adultes âgées de 2 à 5 jours à l'aide de kits standards (tubes plastiques compartimentés) et chaque test de sensibilité est réalisé avec des lots de 25 femelles en moyenne. Les lots « traités » sont exposés à des papiers imprégnés d'insecticide et les lots « contrôles » sont exposés à des papiers non traités. Le nombre de moustiques « assommés » (knock down) est enregistré à des intervalles de temps pendant l'exposition (10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutes). Après l'exposition, les moustiques sont transférés dans de nouveaux tubes ne contenant pas d'insecticides pour une période d'observation de 24h avant comptage de la mortalité. Pendant le temps d'observation, les moustiques sont nourris à l'aide d'une solution de sucre ou de miel diluée à 10 %. La sensibilité des moustiques testés est principalement évaluée par le taux de mortalité (bien que l'effet « knock down » puisse aussi être un indicateur pertinent de la résistance pour certains insecticides comme les pyréthrinoïdes et le DDT). On distingue 3 niveaux de sensibilité populationnels selon les procédures de test de sensibilité à la dose discriminante préconisée par l'OMS (WHO 2016). Ainsi, un taux de mortalité situés entre 98 % et 100 % indique une sensibilité de la population tandis qu'un taux de mortalité compris entre 90 et 97 % suggère une résistance probable et un taux de mortalité inférieur à 90 % indique une résistance avérée.

Le test biologique en bouteille CDC

Le test en bouteille CDC est similaire au test en tube OMS à la différence que l'insecticide est appliqué sur l'intérieur d'une bouteille en verre de 250 ml dans laquelle les moustiques seront placés lors de l'exposition. Cette technique peut être utilisée pour la plupart des insecticides y compris ceux dont les propriétés chimiques ne permettent pas une imprégnation sur papier filtre. La surface interne des bouteilles est imprégnée avec une dose définie de l'insecticide testé, dilué dans de l'éthanol absolu ou de l'acétone. Une fois le solvant (éthanol ou acétone) évaporé, des lots de 20 à 25 moustiques femelles âgées de 2 à 5 jours sont introduits dans les bouteilles pendant un temps défini. Après le temps d'exposition, les moustiques exposés sont transférés dans des cages saines et nourris avec une solution sucrée. Les taux de mortalité sont mesurés après une période d'observation de 24h ou de 72h afin de prendre en compte l'effet lent de la clothianidine avant comptage de la mortalité.

Les bioessais larvaires

La résistance populationnelle des larves aux insecticides peut être testée par des tests en milieu liquide. Pour ces tests, on réalise en général des bio-essais dose-réponse avec différentes concentrations d'insecticide (au moins 5) permettant de calculer les doses létales pour une proportion de la population (e.g. LD50). La comparaison des LD50 entre la population testée et une population sensible de référence permet ensuite le calcul d'un rapport de résistance ($RR50 = DL50 \text{ test} / DL50 \text{ ref}$). Les bio-essais larvaires sont effectués sur des larves de stade 3 ou 4 à partir d'une solution stock de l'insecticide dilué dans de l'acétone ou de l'éthanol. Des lots de 25 larves sont répartis dans des récipients contenant 1 ml de la solution insecticide et 99 ml d'eau distillée. La mortalité est en général mesurée 24 h après l'exposition.

Bien que les bio-essais représentent l'outil essentiel pour suivre la résistance aux insecticides sur le terrain, ils ne renseignent pas sur la nature des mécanismes impliqués dans la résistance. Or, cette information est essentielle pour la gestion de la résistance car elle permet un choix plus judicieux des insecticides alternatifs pouvant être utilisés, notamment selon leur mode d'action et leur spectre de résistance croisée. Ainsi, lorsque la résistance est avérée, il est généralement recommandé de compléter les bio-essais avec d'autres tests biochimiques ou moléculaires afin d'établir un lien entre le phénotype de résistance observé et la fréquence/intensité de marqueurs moléculaires de résistance. En plus de la caractérisation des mécanismes de résistance, les marqueurs moléculaires peuvent aussi permettre d'améliorer la surveillance de la résistance aux insecticides. Elle peut se faire notamment par l'analyse rapide et à moindre coût de plusieurs centaines d'individus collectés sur le terrain, l'utilisation de spécimens morts ainsi que la conservation à long terme des échantillons (ADN, ARN, protéines) pour les suivis de la dynamique de la résistance.

Tests synergistes

Cette approche consiste à exposer les moustiques à des molécules connues pour leur capacité à inhiber certaines familles d'enzymes de détoxification puis à comparer le taux de survie aux insecticides en présence et en absence d'inhibiteur afin de quantifier l'importance de ces enzymes dans le phénotype de résistance. Parmi les inhibiteurs couramment utilisés chez les moustiques (aussi appelés synergistes), on trouve le piperonyl butoxide (PBO) qui est un inhibiteur compétitif des P450s, le S,S,S,-tributylphosphorotrithioate (DEF) qui inhibe les CCEs et le diethyl maléate (DEM) qui inhibe de façon prépondérante les GSTs (Aïzoun et al.

2013 ; Chouaïbou et al. 2014 ; Poupardin et al. 2014). Bien que ces approches permettent d'identifier les grandes familles d'enzymes impliquées dans la résistance, elles montrent aussi certaines limites. En effet, les inhibiteurs employés ne montrent pas forcément une spécificité équivalente vis-à-vis des différentes enzymes d'une famille donnée et/ou inhibent plusieurs familles enzymatiques.

b. Tests biochimiques

Bien que les marqueurs moléculaires sur ADN ou ARN soient de plus en plus utilisés, l'utilisation d'approches biochimiques a longtemps été préconisée à la suite des bio-essais pour caractériser les mécanismes de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Les tests biochimiques nécessitent moins d'individus, mais ils doivent être réalisés dans des laboratoires de recherche équipés et disposant de compétences nécessaires. Parmi les différentes approches biochimiques couramment utilisées, on peut distinguer l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques en conjonction des bio-essais, et la mesure de l'activité des enzymes de détoxification.

Mesure des activités de détoxification

Des méthodes biochimiques ont été développées pour quantifier les niveaux d'activités enzymatiques chez les moustiques notamment les activités d'oxydases à fonctions mixtes, (MFO) des estérases et des glutathion-S-transférase (GST) (Brooke et al. 2001). Les tests biochimiques visent principalement à détecter une augmentation de l'activité enzymatique potentiellement impliquée dans la résistance. Ces méthodes utilisent des extraits protéiques de moustiques dont l'activité enzymatique globale est détectable par une coloration visible à l'œil nu ou par fluorimétrie. La densité optique ou la fluorescence de chaque puits est mesurée par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie et révèle l'intensité de la réaction enzymatique. De manière générale, l'activité des estérases est mesurée par la production d' α - et de β -naphthol à partir de l' α - et du β -naphthyl acétate et l'activité des GSTs est mesurée par la conjugaison du glutathion au 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) (Bouvier et al. 1998). Concernant les P450s, les activités enzymatiques sont détectées en mesurant la quantité du groupement hème ou bien de manière plus spécifique la conversion de la 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase (ECOD) en 7-éthoxycoumarine (7-EC) en 7-hydroxycoumarine (7-OHC) (De Sousa et al. 1995). Toutefois, ces tests manquent souvent de spécificité dans la mesure où plusieurs enzymes appartenant aux mêmes familles d'enzymes testées contribuent à l'activité mesurée sans être forcément impliquées dans le phénotype de résistance. Aussi certaines enzymes impliquées

dans la résistance peuvent ne pas avoir la même affinité avec le substrat utilisé. C'est le cas par exemple du CDNB (1-chloro 2-4, dinitrobenzène) qui est le substrat généralement utilisé pour évaluer l'activité du glutathion transférase, et qui présente une affinité relativement faible avec les enzymes de la classe Epsilon de GST associées de la résistance au DDT chez les moustiques (Corbel and Guessan 2013).

c. Géotypage des mutations de cible

Les tests moléculaires couramment utilisés sur l'ADN génomique (ADNg) sont utilisés pour détecter les mutations génétiques ou les gènes associés à la résistance chez les insectes. Ces tests représentent un outil de diagnostic précis dans le suivi de la résistance et peuvent fournir un avertissement précoce de l'émergence d'une résistance qui n'a pas encore été détecté par des bio-essais. Les tests PCR (réaction de polymérase en chaîne) sont les tests moléculaires les plus utilisés pour géotyper les mutations de cible chez les moustiques tels que les mutations *kdr* et *Ace1*. Ces tests permettent le suivi des fréquences alléliques et génotypiques des allèles de résistance dans une population de vecteurs. Parmi les différents tests PCR utilisés dans le suivi de la résistance, la qPCR (PCR quantitative en temps réel) reste la plus efficace. La qPCR est une technique sensible et spécifique (Bass et al. 2007 ; Puinean, Foster, et al. 2010) et son principe est basé sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'augmentation est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Ce test moléculaire est économique et facile d'utilisation et est beaucoup utilisé pour caractériser et suivre les principales mutations associées à la résistance aux insecticides chez les moustiques (Camara et al. 2018 ; Fodjo et al. 2018 ; Guelbeogo et al. 2012 ; Nardini et al. 2017). Toutefois, les analyses moléculaires par qPCR ne peuvent pas se substituer aux bio-essais, car elles ne sont disponibles que pour la détection de la résistance par mutation des sites cibles et l'échec de la détection d'une mutation ne peut clairement pas être interprété comme une absence de résistance dans une population car d'autres mécanismes peuvent être impliqués.

d. Autres approches moléculaires

PCR quantitative

La quantification de la transcription de certains gènes de détoxification dont le rôle dans la résistance est connu dans une population résistante d'insectes peut permettre de caractériser et de suivre l'évolution de la résistance métabolique. Ainsi, à partir d'un échantillon d'ARN, le niveau d'expression relative d'un gène d'intérêt est comparé par RT-qPCR entre la population étudiée et une population sensible de référence après normalisation de la quantité d'ADNc grâce à un gène dont l'expression ne varie pas entre les deux populations (gène « de ménage ») selon la méthode comparative du $\Delta\Delta_{CT}$ (Schmittgen & Livak 2008). Chez les moustiques, cette méthode est couramment utilisée pour quantifier le niveau d'expression des enzymes de détoxification sur-transcrites chez des populations résistantes (Edi et al. 2014 ; Nardini et al. 2017 ; Nkya et al. 2014 ; Yahouédo et al. 2016).

Des duplications géniques (augmentation du nombre de copies des gènes) affectant les enzymes de détoxification ont récemment été associées à la résistance métabolique des moustiques aux insecticides, y compris chez *Anopheles* en Afrique (Edi et al. 2014 ; Grau-Bové et al. 2020 ; Weetman et al. 2015, 2018 ; Lucas et al. 2019). Ces duplications peuvent être détectées par qPCR sur ADNg en utilisant la méthode du $\Delta\Delta_{CT}$ (sur pools d'individus ou bien individus séparés) ou bien des amorces diagnostiques définies de manière à n'amplifier un fragment d'ADN que chez les individus porteurs de la duplication (Weetman et al 2018, Cattel et al 2020. Bien que ces approches soient prometteuses pour le suivi de la résistance métabolique car elles sont basées sur l'ADNg et non sur l'ARNm qui impose des contraintes fortes en terme d'échantillonnage, la sur-expression des enzymes de détoxification n'est pas toujours la conséquence de duplications géniques et elles doivent donc être interprétées avec prudence en regard du phénotype de résistance observé.

Puces à ADN

Les puces à ADN ont été développées au cours des années 90 et utilisées dans le but principal de quantifier l'expression des transcrits. En pratique, de petites lames de verre (puces) sur lesquelles sont fixées un très grand nombre de courtes séquences d'acides nucléiques (sondes) sous forme de nano-spots sur lesquels des fragments d'ADN ou d'ARN issus d'échantillons biologiques (cibles) peuvent s'hybrider de manière spécifique. Cette technique est généralement utilisée pour étudier le niveau de transcription des gènes à l'échelle du génome

ou bien d'un nombre important de gènes candidats. La méthode des puces à ADN à deux couleurs consiste à extraire les ARNm des échantillons à comparer puis à réaliser ensuite une transcription reverse en présence de nucléotides modifiés avec de fluorophores de couleur différentes pour chaque échantillon à comparer. Les échantillons à comparer sont ensuite mélangés puis hybridés de manière compétitive sur la puce à ADN. Après lavage, l'intensité de la fluorescence de chaque fluorophore est détectée à l'aide d'un scanner à haute résolution pour chaque spot d'ADN (correspondant à un transcrit donné). Après normalisation, le rapport de l'intensité de la fluorescence issue des deux fluorophores obtenu pour chaque spot permet d'estimer le rapport de transcription du gène correspondant entre les deux échantillons à comparer.

La première puce à ADN utilisée chez *An. gambiae* dans le cadre de l'étude de la résistance aux insecticides a été développée par David et al. (2005). D'autres puces à ADN spécifiques de certaines familles de gènes ou pangénomiques ont été développées par la suite chez différentes espèces de vecteurs. Les puces à ADN ont joué un rôle important dans la caractérisation des gènes impliqués dans la résistance métabolique chez les moustiques en permettant d'établir un lien entre l'expression de certains gènes de détoxification et les phénotypes de résistance observés *in natura* (Ingham et al. 2014 ; Mitchell et al. 2014 ; Nkya et al. 2014 ; Toé et al. 2015). Néanmoins, cette approche reste relativement lourde à mettre en place et souffre de certains biais techniques (biais d'amplification, de marquage, d'hybridation). Ainsi, elle a été progressivement remplacée par les approches utilisant le séquençage très haut débit.

Séquençage haut débit

Les techniques NGS (Next Generation Sequencing) constituent la seconde génération de séquenceur après le séquençage Sanger. Ces approches ont été développées dans les années 2000 et se sont révélées être une révolution pour les études de génomique et de transcriptomique. Les techniques NGS ont la capacité de générer un nombre élevé de lectures de séquences d'ADN dans un temps relativement court pour un prix modéré et sont donc aujourd'hui de plus en plus utilisées (Behjati & Tarpey 2013). Le terme NGS regroupe plusieurs technologies dont le pyroséquençage Roche 454, le séquençage Illumina et la technique SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection). Illumina représente aujourd'hui la technique à haut débit la plus utilisée car elle est financièrement accessible et a un débit élevé bien qu'elle génère des séquences relativement courtes. Deux approches sont principalement utilisées pour l'étude

de la résistance aux insecticides : la transcriptomique par séquençage des l'ARNm (RNA-seq) et la génomique par le séquençage de l'ADNg (DNA-seq).

Le RNA-seq permet de quantifier et de comparer le niveau de transcription de l'ensemble des gènes exprimés entre différentes conditions biologiques. Cette approche génère donc des données d'expression génique mais elle permet aussi d'étudier les polymorphismes dans les transcrits exprimés. Concernant le DNA-seq, on distingue trois approches principales : le séquençage d'une sous-représentation du génome après une (Rad-seq) ou deux (DD-Rad-seq) digestions par des enzymes de restriction. Cette approche est très utilisée en génétique des populations et à l'avantage d'être très abordable et de ne pas être dépendante d'un génome de référence. Le DNA-seq ciblé, consiste à séquencer uniquement des régions génomiques d'intérêt (de quelques gènes à l'exome entier ou bien des régions génomiques définies) après les avoir capturées par hybridation à partir de sondes ARN préalablement synthétisées. Cette technique permet de limiter grandement l'effort de séquençage en ciblant uniquement les gènes d'intérêt mais nécessite un génome de référence pour le design des sondes de capture. Enfin, le séquençage du génome entier peut être effectué sur individus séparés ou bien sur pool d'individus mais cela reste coûteux et génère une masse très importante de données dont l'analyse reste parfois délicate en fonction de la complexité du génome étudié. Depuis 2010 une troisième génération de séquenceurs a été développée. Il s'agit notamment des séquenceurs PacBio et MinION d'Oxford Nanopore qui permettent de séquencer de très long fragments d'ADN et ne nécessitent pas forcément d'amplification de l'ADN en amont du séquençage évitant ainsi les artefacts d'amplification par PCR.

1.4.2. Stratégies de gestion de la résistance

La gestion de la résistance aux insecticides vise à garantir sur le long terme l'efficacité de la lutte antivectorielle limitant l'apparition et la dissémination de la résistance dans les populations naturelles. Une gestion efficace de la résistance vise principalement à prévenir l'apparition de la résistance mais peut aussi viser à restaurer la sensibilité des vecteurs si la résistance est installée. Diverses stratégies de gestion développées permettent de prendre en compte les facteurs contribuant au développement de la résistance, les mécanismes impliqués, mais aussi le contexte environnemental et la biologie de l'espèce considérée. Cependant, il est important de noter que la mise en place de stratégies de gestion en santé publique rencontrent plusieurs difficultés en comparaison de l'agriculture. En effet, très peu de molécules sont autorisées pour un usage en santé publique et celles actuellement utilisées ciblent

essentiellement deux cibles biochimiques (l'acétylcholinestérase et les canaux sodium). Cette pauvreté des modes d'action favorise l'émergence de la résistance mais limite aussi les alternatives lorsque la résistance émerge. Dans ce cadre, les stratégies de gestion de la résistance aux insecticides dans la lutte contre le paludisme reposent sur quatre axes principaux (WHO 2019).

a. Les rotations d'insecticides

Cette stratégie repose sur l'utilisation en alternance de plusieurs insecticides ayant des modes d'action différents. La rotation d'insecticide permet la diminution au cours du temps de la résistance à un insecticide grâce à un remplacement de cet insecticide par un autre de mode d'action différent. Cependant, pour augmenter son efficacité, la rotation doit être suffisamment courte pour éviter que des niveaux significatifs de résistance ne se développent. L'un des succès de la rotation d'insecticides a été observé dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose menée en Afrique de l'Ouest dans les années 90 (Hougard et al. 1993). Dans le cas du paludisme, cette stratégie a également été utilisée avec succès en Guinée équatoriale sur l'île de Bioko et en Afrique du Sud (Maharaj 2005 ; Sharp et al. 2007). Dans le cas d'une résistance installée, la mise en place en routine d'une rotation d'insecticide pourrait permettre de restaurer de manière progressive la susceptibilité à l'insecticide initial.

b. Combinaisons d'interventions

Les combinaisons d'interventions consistent à associer de manière simultanée plusieurs approches de lutte antivectorielle sur une même zone géographique. Par exemple, l'utilisation simultanée de moustiquaires imprégnées d'insecticide et la pulvérisation intra domiciliaire. L'efficacité des combinaisons vise à tuer le vecteur malgré l'existence d'une résistance. Cependant, il est impératif d'utiliser différentes familles d'insecticides pour les différentes interventions afin de ne pas conduire à une additivité des pressions de sélection (Okumu & Moore 2011). Des études menées sur l'efficacité des combinaisons d'outils de lutte antivectorielle en Guinée Equatoriale et au Mozambique ont montré une efficacité des pulvérisations intra domiciliaires combinées aux moustiquaires imprégnées de pyréthrinaïdes par rapport à l'utilisation seule de l'un de ces outils (Kleinschmidt et al. 2009). Cependant, une étude au Bénin en 2012 a montré au contraire que ni les cas de paludisme chez des enfants de moins de 5 ans, ni la transmission du paludisme ne différait entre une combinaison et une utilisation seule de ces outils de lutte antivectorielle (Corbel et al. 2012). Toutefois, il est

important de remarquer que la combinaison de différentes approches de lutte antivectorielle peut générer des coûts beaucoup plus élevés que les stratégies uniques et donc limiter leur implémentation aux pays disposant de ressources financières et humaines insuffisantes en santé publique (Corbel and N’Guessan 2013).

c. Traitements en mosaïques

Cette stratégie repose sur l’utilisation de différents produits insecticides dans des zones différentes. Des études ont montré l’efficacité de l’utilisation d’insecticides en mosaïques comparée à un traitement uniquement basé sur les pyréthriinoïdes. Cette stratégie a été appliquée en Afrique du Sud avec succès en utilisant différents insecticides dans différents habitats au sein de d’une même communauté (Corbel and N’Guessan 2013).

d. Mélanges d’insecticides

Cette méthode repose sur le même principe que celui des multithérapies utilisées contre les pathologies telles que le paludisme ou encore le VIH et favorise une faible probabilité d’émergence concomitante de plusieurs mécanismes de résistance. Elle consiste en l’utilisation de plusieurs insecticides à mode d’action différents. Ainsi, cette approche est recommandée dans les programmes de lutte contre les vecteurs du paludisme (Asidi et al. 2005 ; Hougard et al. 2003). Par exemple, la moustiquaire Interceptor® G2 qui est un mélange de chlorfenapyr (Pyrrole) et d’alphacypermethrine (pyréthriinoïde) a montré des résultats satisfaisants dans une zone de résistance de *An. gambiae* aux pyréthriinoïdes dans le centre de la Côte d’Ivoire (Camara et al. 2018). D’autres insecticides basés sur le mélange de néonicotinoïdes et de pyréthriinoïdes utilisés dans des moustiquaires imprégnées (Darriet & Chandre 2013) ou en pulvérisation intra domiciliaire ont également montré de grandes efficacités sur des populations d’anophèles résistantes aux pyréthriinoïdes tels que Fludora® Fusion (Agossa, Padonou, Koukpo, et al. 2018 ; Fongnikin et al. 2020 ; Fuseini et al. 2019). Toutefois, cette stratégie peut devenir inefficace si les vecteurs ciblés développent des mécanismes de résistances croisée ou multiples envers les différents insecticides utilisés.

1.4.3. Statuts et mécanismes de résistance de *An. gambiae* s.l aux insecticides en Afrique

La distribution de la résistance aux insecticides s'est considérablement étendue ces dernières années en Afrique et menace le succès des programmes de lutte contre le paludisme (Ranson & Lissenden 2016) (Figure 19A). Les Pyréthrinoïdes sont la principale classe d'insecticide recommandée en santé publique et la résistance à ces composés reste une grande préoccupation (Hougard et al. 2003). La résistance augmente la survie des moustiques face aux principaux outils de lutte antivectorielle tels que les MILDA et les PID, ce qui peut entraîner une augmentation de l'incidence du paludisme et également de la mortalité dans les zones de résistance (Hemingway et al. 2016). Malheureusement, la résistance des vecteurs du paludisme n'est pas limitée uniquement aux pyréthrinoïdes et inclut aussi les autres classes d'insecticides utilisées en santé publique telles que les carbamates, les organochlorés et les organophosphorés (Ranson & Lissenden 2016). Cependant, certaines différences ont été observées dans la distribution de la résistance entre les régions du continent africain. Par exemple, la résistance au DDT a été signalée chez des populations d'*An. gambiae* et d'*An. funestus* en Afrique occidentale, centrale et orientale (Figure 19B) (Kawada et al. 2011 ; Mulamba et al. 2014), et seulement chez *An. funestus* dans le sud de la région du Malawi (Riveron et al. 2015). Concernant les carbamates, particulièrement le bendiocarbe qui est couramment utilisé en PID, la résistance a été signalée dans toutes les régions d'Afrique subsaharienne bien que les régions de forte résistance soient concentrées en Afrique de l'Ouest (Figure 19C). Contrairement aux autres classes d'insecticides, la résistance aux organophosphorés est moins répandue et semble être principalement représentée en Afrique de l'Ouest pour *An. gambiae* (Edi et al. 2014) et en Afrique de l'Est pour *An. arabiensis* (Messenger et al. 2017) (Figure 19D). Quant à *An. funestus*, il reste pleinement susceptible aux organophosphorés à travers tout le continent.

Concernant les néonicotinoïdes, la résistance a été observée chez de nombreuses populations d'insectes d'intérêt agricole et inclut la résistance à la clothianidine, l'une des molécules de la famille des néonicotinoïdes récemment introduite en santé publique (Jin et al. 2019). La résistance à plusieurs néonicotinoïdes a été associée à des enzymes de détoxification tels que *CYP6G1* chez *Drosophila melanogaster* et *CYP6CM1vQ* chez *Bemisia tabaci* (Karunker et al. 2009 ; Sparks et al. 2012). Pour l'heure, la résistance aux néonicotinoïdes chez les moustiques reste peu étudiée au vu de leur introduction très récent pour la lutte antivectorielle. Quelques études menées sur *Ae. aegypti* le vecteur de la dengue, ont cependant

montré que tout comme les insectes d'intérêts agricoles, les moustiques peuvent également développer une résistance aux néonicotinoïdes tel que l'imidaclopride, après plusieurs générations de sélection en laboratoire (Riaz et al. 2012 ; Zoh et al soumis). De récentes études en Côte d'Ivoire et au Cameroun ont montré que certaines populations sauvages d'*An. gambiae* montraient une survie plus élevée que la normale aux néonicotinoïdes comme l'acétamipride et la clothianidine (Chouaïbou et al. 2019 ; Fouet et al. 2020).

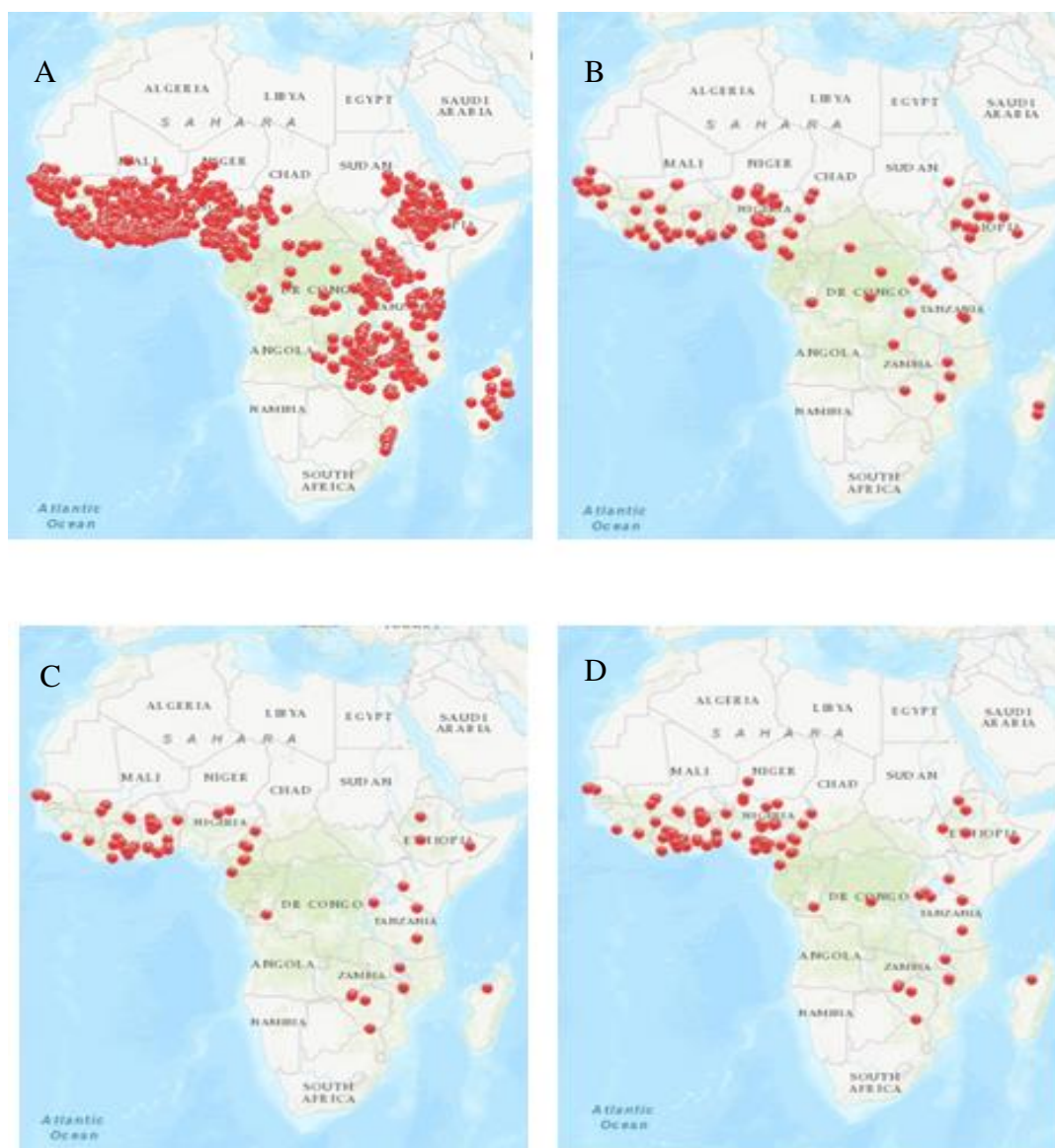


Figure 19 : Distribution de la résistance aux différentes classes d'insecticides en Afrique subsaharienne. A : Résistances aux pyréthrinoides. B : Résistance aux DDT. C : Résistance aux carbamates. D : Résistance aux organophosphorés. (IR Mapper (www.irmapp.com)2020)

1.5. Problématique et objectifs de la thèse

1.5.1. Contexte d'étude

Entre 2000 et 2015, l'incidence et la prévalence du paludisme ont diminué respectivement de 40% et de 50% (Abong'o et al. 2020). Ces réductions sont les résultats d'une intensification des stratégies de lutte antivectorielle basées essentiellement sur la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et l'application ciblée de pulvérisations intra domiciliaires (PID). Selon Bhatt et al. (2015), les MII ont contribué à 68% à la baisse de la prévalence du paludisme tandis que les PID étaient responsable de 13% de la baisse. Les programmes actuels de lutte antivectorielle sont largement dépendant des pyréthrianoïdes synthétiques, qui représentent la classe d'insecticide la plus utilisée en santé publique et qui est recommandée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (Hougard et al. 2003). Ce succès est actuellement menacé par l'augmentation de la résistance des moustiques (Ranson & Lissenden 2016). Dans l'attente de solutions efficaces et durables, préserver l'efficacité des insecticides, et notamment des pyréthrianoïdes, s'avère crucial pour garantir l'efficacité de la lutte antivectorielle en Afrique pour la prochaine décennie.

Dans ce contexte, l'entreprise Bayer a récemment développé une nouvelle formulation d'insecticide (nom commercial Fludora® Fusion) utilisable en IRS. Cette formulation consiste en une combinaison de deux insecticides ayant des modes d'action différents : la deltaméthrine (pyréthrianoïde de classe II ciblant les canaux sodium voltage dépendants) et la clothianidine (néonicotinoïde ciblant les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine). La particularité de cette nouvelle formulation est l'utilisation d'un néonicotinoïde, car cette famille d'insecticide n'a encore jamais été utilisée contre les vecteurs du paludisme et offre donc une nouvelle cible potentielle pour la lutte antivectorielle. En effet, bien que les néonicotinoïdes soient largement utilisés en agriculture, leur utilisation pour le contrôle des vecteurs du paludisme pourrait s'avérer être une alternative efficace pour le contrôle des moustiques résistants aux pyréthrianoïdes. Des données récentes obtenues par Bayer et ses partenaires de recherche au cours d'essais opérationnels sur le terrain confirment la bonne efficacité de Fludora® Fusion sur plusieurs souches d'anophèles y compris celles présentant une résistance élevée aux pyréthrianoïdes. A tous les niveaux d'évaluation, Fludora® Fusion a clairement montré une bonne efficacité globale et prolongée sur *An. gambiae* y compris sur des populations résistantes aux pyréthrianoïdes (Fongnikin et al. 2020 ; Fuseini et al. 2019 ; Oxborough et al. 2019). De

plus, la co-formulation de la clothianidine et de la deltaméthrine dans le mélange Fludora® Fusion pourrait montrer un avantage significatif pour prévenir le développement de la résistance à la clothianidine chez les vecteurs du paludisme par rapport aux formulations contenant uniquement de la clothianidine.

Cependant, certaines questions demeurent quant à l'efficacité à long terme de cette formulation contre les vecteurs africains du paludisme et la gestion de la résistance aux insecticides pyréthroïdes. Ces questions peuvent être résumées comme suit :

1.5.2. Les moustiques du genre *Anopheles* peuvent-ils développer une résistance à Fludora® Fusion ?

En effet, bien que l'efficacité de cette nouvelle formulation contre les moustiques résistants aux PYRs soit démontrée par des essais opérationnels, il n'existe pour l'instant aucune donnée concernant l'évolution à long terme (sur plusieurs générations) de la résistance à cette formulation chez les moustiques anophèles. De plus, bien que les néonicotinoïdes n'aient pas été utilisés en santé publique en Afrique, ils sont fréquemment utilisés en agriculture contre les ravageurs (e.g. rizières et maraîchage) et il est possible que certains allèles de résistance à ces insecticides circulent déjà dans les populations naturelles d'anophèles localisées dans ces habitats et puissent être sélectionnées à plus ou moins long terme. Enfin, il est possible que certains allèles de résistance à d'autres insecticides utilisés en santé publique aient la capacité de conférer une résistance croisée à cette nouvelle formulation. Dans le cas où une résistance à cette nouvelle formulation peut apparaître, il est important d'étudier sa dynamique et les mécanismes associés afin de mieux la détecter et de prévoir des mesures de gestion appropriées, notamment dans les populations les plus à risques comme celles rencontrées dans les zones à forte activité agricole. Enfin, bien que les mécanismes de résistance aux insecticides utilisés en lutte antivectorielle soient de mieux en mieux caractérisés chez *An. gambiae*, les mécanismes de résistance de cette espèce aux néonicotinoïdes restent quant à eux à être caractériser. De plus, il est possible que l'utilisation à grande échelle de cette nouvelle combinaison ciblant deux cibles biochimiques distinctes (les canaux sodium et les récepteurs nicotiniques à l'AChE) aboutisse à la sélection de mécanismes de résistance généralistes encore peu représentés dans les populations naturelles.

Dans ce cadre les questions spécifiquement abordées lors de cette thèse sont définies comme suit :

Quelle est la dynamique d'apparition de la résistance à Fludora® Fusion chez *An. gambiae* en comparaison de la deltaméthrine et de la clothianidine utilisés séparément?

Les mécanismes de résistance sélectionnés par cette nouvelle formulation confèrent-ils une résistance croisée à d'autres insecticides utilisés en santé publique ?

Quels sont les mécanismes associés à la résistance chez *An. gambiae* ?

Au vu de l'implémentation récente de cette nouvelle formulation sur le terrain (Fongnikin et al. 2020) et la nature prédictive de nos travaux sur l'évolution de la résistance, nous avons choisi d'aborder ces questions au laboratoire par l'intermédiaire d'une expérimentation de sélection contrôlée utilisant une population d'*An. gambiae* originaire d'une région à forte activité agricole. L'étude des mécanismes de résistance a été effectuée par une approche de transcriptomique par RNA-seq en vue d'étudier les variations d'expression des gènes mais aussi de détecter d'éventuelles signatures de sélection associées à la résistance. Ces travaux seront décrits dans le **Chapitre 2** de la thèse.

Bien que la question de l'efficacité à long terme de cette nouvelle formulation insecticide sur le vecteur du paludisme *An. gambiae* représente l'axe central de cette thèse, il nous est aussi apparu intéressant d'étudier l'impact de l'environnement sur la tolérance des *An. gambiae* à cette nouvelle formulation afin de préciser ses conditions d'efficacité et d'optimiser son usage sur le terrain. En effet, il a été montré que l'environnement dans lequel se développent les populations de moustiques peut affecter leur tolérance aux insecticides utilisés en santé publique. Plusieurs études montrent notamment que la présence de pesticides agricoles dans l'eau où se développent les larves peut altérer la tolérance des adultes aux insecticides, notamment par l'intermédiaire d'une induction de leur système de détoxification. Ainsi, la seconde question posée pour cette thèse était la suivante :

1.5.3. La présence de produits agrochimiques dans les gîtes à *An. gambiae* localisées en bordure des zones à forte activité agricole peut-elle affecter la tolérance à la formulation Fludora ®Fusion ?

Cette question a été abordée au laboratoire en exposant les larves d'une population d'*An. gambiae* à une dose sub-létale d'un mélange de pesticides représentatif d'une région à forte activité agricole de Côte d'Ivoire. Des bio-essais comparatifs ont ensuite été réalisés entre population exposée et population témoin afin d'évaluer l'impact des pesticides agricoles sur

l'efficacité de Fludora Fusion®. Une étude de transcriptomique a aussi été réalisée afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires associés à cette plasticité phénotypique. Ces travaux seront décrits dans le **Chapitre 3** de la thèse.

Pour finir, le **Chapitre 4** de la thèse visera à intégrer l'ensemble de ces travaux afin d'évaluer le potentiel de cette nouvelle formulation insecticide pour la lutte-antivectorielle contre les vecteurs du paludisme en Afrique et de proposer des mesures anticipées permettant d'optimiser son usage sur le terrain, de suivre l'évolution de la résistance, et de mettre en place de manière anticipée des stratégies de gestion adaptées.

Chapitre 2. Réponse adaptative du vecteur du paludisme *An. gambiae* à Fludora® Fusion, une nouvelle combinaison d'insecticides associant différents modes d'action. Étude par sélection contrôlée et transcriptomique.

Publication I:

Titre: Experimental evolution supports the potential of neonicotinoid-pyrethroid combination for managing insecticide resistance in malaria vectors.

Auteurs: Marius Gonso Zoh, Jean-Marc Bonneville, Jordan Tutagana, Frederic Laporte, Behi K. Fodjo; Chouaïbou S. Mouhamadou, Christabelle Gba Sadia, Justin McBeath, Frederic Schmitt, Sebastian Horstmann, Stephane Reynaud et Jean-Philippe David

Status : Publié dans Scientific Reports

Contribution personnelle : J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations, participé aux analyses présentées dans cet article, à la rédaction de l'article et à la mise en forme des figures.

2.1. Contexte scientifique

Le développement et la diffusion de la résistance aux insecticides des vecteurs de maladies représentent une réelle menace en santé publique dans de nombreux pays, notamment vis-à-vis des moustiques vecteurs du paludisme en Afrique. Pour contrôler la résistance, l'une des alternatives envisagées est l'introduction de nouvelles molécules d'insecticides avec des modes d'action différents de celles déjà utilisées en lutte antivectorielle (LAV). De ce fait, les insecticides néonicotinoïdes sont aujourd'hui présentés comme pouvant avoir une valeur ajoutée dans les programmes de gestion de la résistance dans les zones concernées (Kweka et al. 2018). La particularité des néonicotinoïdes est que leur cible biochimique (les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine nAChR) est différente de celles des insecticides déjà utilisés en santé publique (DDT, PYR, OP, Carb). De plus, ils montrent des rapports bénéfice/risque en termes de toxicité/écotoxicité relativement bons par rapport à de nombreux autres insecticides (Tomizawa & Casida 2003 ; Tomizawa et al. 2000). Dans ce contexte, Bayer a développé une formulation insecticide nommé Fludora® Fusion basée sur la combinaison de deux insecticides

ayant des modes d'action différents et présentant une faible toxicité pour l'homme. Cette formulation a été développée dans une optique de gestion durable de la résistance aux pyréthriinoïdes chez les vecteurs du paludisme en Afrique.

La formulation Fludora® Fusion est un mélange de deux insecticides contenant 500 g/Kg de clothianidine et 62,5 g/Kg de deltaméthrine et constitue la première formulation destinée aux pulvérisations intra domiciliaires combinant deux modes d'action distincts. Cette dualité de mode d'action associée à une bonne activité résiduelle confère une bonne efficacité à Fludora® Fusion. En effet, les données récentes obtenues par Bayer et ses partenaires de recherche au cours d'essais opérationnels dans différents pays africains, ont confirmé la bonne efficacité de Fludora® Fusion sur plusieurs populations d'*An. gambiae* (sensus lato) y compris des populations résistantes aux pyréthriinoïdes (Animut & Horstmann 2021 ; Fuseini et al. 2019). Cependant, dans un contexte d'introduction récente de cette formulation en LAV, le potentiel de Fludora® Fusion à prévenir ou non la sélection d'allèles de résistance aux insecticides n'a pas encore été étudié chez les moustiques.

2.2. Objectifs de l'étude et approches utilisées

Dans ce contexte, l'objectif général de cette étude visait à évaluer au laboratoire sur plusieurs générations le potentiel de Fludora® Fusion à sélectionner une résistance chez *An. gambiae*.

Ainsi, le premier objectif était de comparer, sur plusieurs générations, la dynamique de résistance d'une population d'*An. gambiae* issue du terrain après sélection avec Fludora® Fusion ou ses deux composants pris séparément et d'évaluer la capacité de cette combinaison multi modes d'action à entraver la sélection de la résistance. La seconde étape était de comparer les mécanismes de résistance associés à la résistance à cette formulation et à ses deux constituants par des approches moléculaires.

Dans un souci de réalisme vis-à-vis des conditions de terrain, une population de laboratoire (Tiassalé-S voir modèle biologique ci-dessous) portant des allèles de résistance à plusieurs familles d'insecticides à basse fréquence a été utilisée pour une expérimentation de sélection contrôlée en laboratoire sur plusieurs générations avec la deltaméthrine seule, la clothianidine seule ou le mélange Fludora® Fusion aboutissant respectivement à la constitution des trois lignées Delta-R, Clothia-R et Fludo-R (Figure 20). Lors de cette expérimentation,

l'intensité de la pression de sélection a été maintenue à un niveau comparable pour chaque insecticide (environ 50-70 % mortalité).

Pour chaque lignée, l'évolution des niveaux de résistance a été suivie tout au long du processus de sélection par des bio-essais en comparaison de la lignée parentale non-sélectionnée (Tiassalé-S). La résistance croisée de chaque lignée à chaque insecticide utilisé pour la sélection et à d'autres insecticides de santé publique a également été mesurée par des bio-essais. A la génération G17, une approche comparative par séquençage ARN (RNA-seq) a été utilisée pour caractériser l'impact de la sélection sur le transcriptome de chaque lignée sélectionnée en comparaison de la lignée Tiassalé-S. Cette approche visait d'une part à mesurer les variations de niveaux de transcription des gènes et d'autre part à identifier des signatures de sélection à partir des données de polymorphisme. Le rôle particulier des cytochromes P450 dans la résistance au néonicotinoïde clothianidine a ensuite été exploré plus en détail sur des gènes candidats par RT-qPCR et l'analyse fine du rôle de certains variants structuraux sélectionnés par la clothianidine a été réalisée.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la Publication I annexée à la fin de ce chapitre.

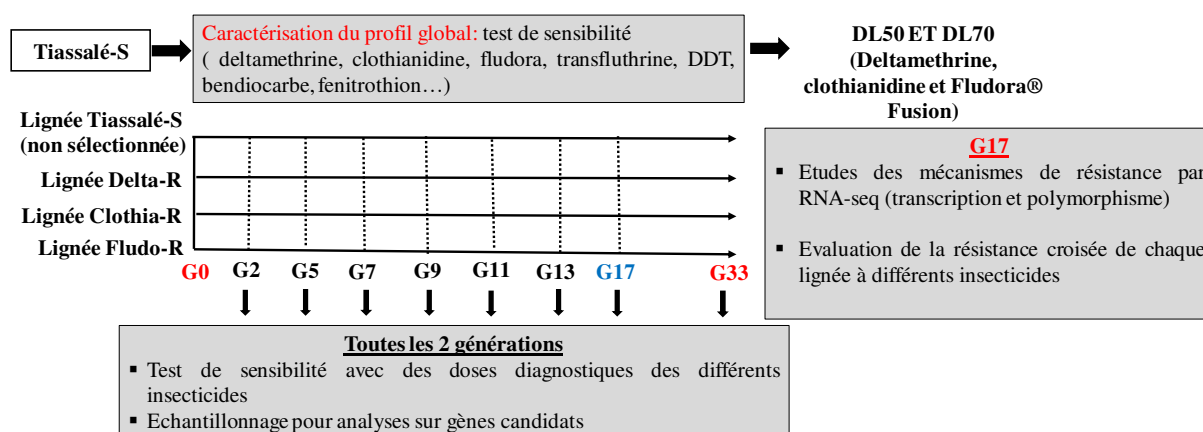


Figure 20 : Schéma synthétique du dispositif expérimental utilisé

2.3. Modèles biologiques

La première étape cette étude a consisté à créer une lignée d'*An.gambiae* représentative des populations ouest-africaines en termes de fond génétique et présentant une bonne diversité d'allèles de résistance aux insecticides, mais avec des fréquences faibles. En effet, la fréquence

de certains allèles de résistance étant forte dans la région de Tiassalé (e.g. fréquence de la mutation *kdr* 1014F à 80 %), leur dilution par introgression d'allèles sensible visait à maximiser leurs variations de fréquence au cours de l'expérimentation de sélection contrôlée. Pour cela, des larves d'*An. gambiae* sensus lato ont été collectées en 2010 à Tiassalé dans le sud de la Côte d'Ivoire, une zone agricole (rizières et maraichage) soumise à une utilisation intensive de pesticides (pyréthrinoides, organophosphorés, carbamates et néonicotinoïdes) pour la protection des cultures et montrant une forte couverture de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides (Chouaïbou et al. 2016). Des études antérieures ont montré que les moustiques *Anopheles* de cette zone géographique montrent une forte résistance à plusieurs familles d'insecticides, notamment aux pyréthrinoides et au DDT ainsi qu'une résistance significative aux carbamates et aux organophosphorés (Camara et al. 2018 ; Edi et al. 2012). Ainsi, des *An. gambiae* sensus stricto ont été utilisés pour créer la lignée Tiassalé qui a ensuite été conservée sans pression de sélection pendant quelques générations au Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS). La lignée Tiassalé a ensuite été croisée en masse avec la lignée de laboratoire Kisumu totalement sensible afin de diminuer la fréquence des allèles de résistance et créer la lignée Tiassalé-S qui a ensuite été utilisée pour l'expérimentation de sélection contrôlée (Figure 21).

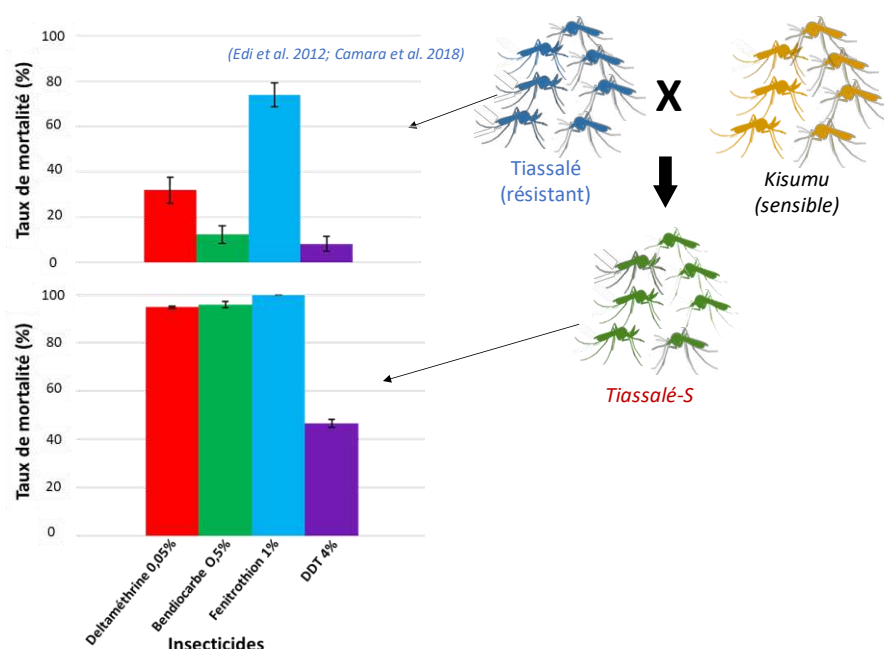


Figure 21 : Création de la lignée Tiassalé-S

2.4. Principaux Résultats

2.4.1. Dynamique de la résistance

Le profil de résistance de la lignée parentale Tiassalé-S aux quatre principales classes d'insecticides : le pyréthrianoïde deltaméthrine (0.05%), le carbamate bendiocarb (0.5%), l'organophosphoré fénitrothion (1%) et l'organochloré DDT (4%) a été caractérisé avant le début de la sélection (G0) à l'aide des tests de sensibilité standards en tubes sur papiers imprégnés d'insecticides selon les recommandations de l'OMS. Les résultats obtenus ont confirmé la présence en faible fréquence d'allèles de résistance aux pyréthrianoïdes et aux carbamates chez la lignée Tiassalé-S. Concernant les organophosphorés les bio-essais ont montré une restauration du phénotype de sensibilité (100 % mortalité) à cet insecticide suggérant une très faible fréquence des allèles de résistance chez la lignée Tiassalé-S. Cependant, malgré l'introgression d'allèles sensibles par croisement avec la lignée Kisumu, un niveau de résistance significatif au DDT a été observé chez la lignée Tiassalé-S (Figure 21).

Le suivi des niveaux de résistance de chaque lignée à son insecticide respectif au fil des générations de sélection (Figure 1 du manuscrit ci-après²) a permis d'observer une augmentation rapide de la résistance à la deltaméthrine chez la lignée Delta-R avec des taux de mortalités diminuant de 73% à G0 à 30% à G7 pour ensuite atteindre moins de 15% à G33.

Concernant la lignée Clothia-R, les bio-essais avec la clothianidine ont permis d'observer une augmentation significative de la résistance à cet insecticide à partir de G13 en comparaison de la lignée non sélectionnée mais se stabilisant à un niveau modéré jusqu'à G33. Concernant la lignée Fludo-R, une diminution significative de la mortalité à Fludora® Fusion a été ponctuellement observée à G13 mais cette tendance n'a pas été confirmée pour les générations suivantes (G17 à G33).

2.4.2. Résistance croisée des différentes lignées aux insecticides

L'évaluation de la résistance croisée de chaque lignée sélectionnée aux trois insecticides utilisés pour la sélection a confirmé la forte résistance à la deltaméthrine de la lignée Delta-R. Ces bio-essais en bouteille imprégnées ont également révélés une augmentation modérée de la résistance de la lignée Fludo-R à la deltaméthrine comparé à la lignée Tiassalé-S et une légère augmentation de la résistance des deux lignées Clothia-R et Fludo-R à la clothianidine (Figure

² Les figures issues de cette publication et leurs légendes sont insérées à la fin du manuscrit ci-après.

2A du manuscrit ci-après). De même, les lignées Delta-R et Clothia-R ont montré une légère augmentation de la résistance au mélange Fludora® Fusion.

Concernant la résistance croisée aux insecticides couramment utilisés en santé publique, les tests de sensibilité ont confirmé la résistance de la lignée Tiassalé-S au DDT et ont suggéré que les allèles de résistance associés avaient été sélectionnés par la deltaméthrine, la clothianidine et le mélange Fludora® Fusion (Figure 2B du manuscrit ci-après) avec des niveaux de mortalité de moins de 10% dans chaque ligne sélectionnée. Enfin, aucune augmentation significative de la résistance au fénitrothion ou au bendiocarbe n'a été détectée pour aucune lignée sélectionnée par rapport à la lignée Tiassalé-S non sélectionnée

2.4.3. Fréquences des mutations de cible

Le génotypage des mutations de cible a permis de montrer que l'augmentation de résistance à la deltaméthrine était associée à l'augmentation de la fréquence de la mutation kdr ouest (L1014F) avec une fréquence de l'allèle résistant (1014F) passant de 47% à G0 à près de 100% à G6 (Figure 3 du manuscrit ci-après). Le génotypage de la mutation kdr L1014F chez les deux lignées Clothia-R et Fludo-R ont suggéré une diminution progressive de sa fréquence au fil des générations (et notamment de la fréquence des homozygotes résistants) bien que des fluctuations aient été observées, probablement causées par des effets démographiques (dérive) ou par des biais d'échantillonnage (30 individus génotypés par lignée par génération) (Figure 3 du manuscrit ci-après). Enfin, comme attendu, la fréquence de la mutation Ace1 (G119S) n'a pas été significativement affectée par la sélection avec ces insecticides avec une fréquence de 10%, 6%, 15% et 10% respectivement chez les lignées Tiassalé-S (G0), Delta-R (G17), Clothia-R (G17) et Fludo-R (G17).

2.4.4. Variations des niveaux de transcription des gènes chez les lignées sélectionnées

L'analyse de transcriptomique par RNA-seq à la G17 a permis de détecter 10839 gènes exprimés chez les femelles adultes avec 3875 gènes différentiellement transcrit (transcrits) dans au moins une lignée sélectionnée en comparaison de la lignée non-sélectionnée Tiassalé-S (FC $\geq 1,5$ -fois et P valeur ajustée $\leq 0,005$). La comparaison globale entre lignées a montré qu'un plus grand nombre des gènes étaient différentiellement transcrits chez les lignées Clothia-R (1974 gènes) et Delta-R (1439 gènes) en comparaison de la lignée Fludo-R (462 gènes) suggérant une

réponse globale moins forte à la sélection avec le mélange des deux insecticides. Cette plus faible réponse adaptative de la lignée Fludo-R au mélange est aussi supportée par le faible nombre de gènes conjointement différemment exprimés chez la lignée Fludo-R et les deux autres lignées, notamment la lignée Delta-R (seulement 39 et 25 gènes sur- et sous-transcrits) (Supplementary Figure 3 du manuscrit ci-après).

Une analyse d'enrichissement de fonction biologiques basée sur les annotations fonctionnelles issues de l'annotation du génome d'*An. gambiae* (Gene Ontology, GO) a ensuite été effectuée sur les gènes significativement sur-transcrits pour chaque lignée (Supplementary Figure 4 du manuscrit ci-après). Cette analyse a montré que les gènes significativement sur-transcrits chez la lignée Clothia-R montrent un enrichissement important des termes GO associés à l'activité des cytochromes P450. Un léger enrichissement des termes GO associés aux cytochromes P450 a aussi été observé chez la lignée Fludo-R tandis qu'aucun enrichissement en terme GO associé à la résistance métabolique n'a été détecté chez la lignée Delta-R. De manière inattendue, un enrichissement significatif des termes GO associés aux récepteurs de l'acétylcholine a aussi été observé pour les lignées Clothia-R et Delta-R, en lien avec la surexpression de plusieurs gènes codants pour les sous-unités des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR).

Une analyse détaillée des niveaux de transcription obtenus par RNA-seq a ensuite été effectuée sur les gènes codants pour les familles de protéines potentiellement associées aux mécanismes de résistance connus (résistance par mutation de la cible, métabolique, cuticulaire, cibles des insecticides, transporteurs...). Cette analyse a révélé des variations importantes des profils de transcription entre les différentes lignées sélectionnées en comparaison de la lignée Tiassalé-S (Figure 4 du manuscrit ci-après). Relativement peu de gènes potentiellement associés à la résistance métabolique ou cuticulaire ont montré une sur-transcription chez la lignée Delta-R incluant cinq P450s, six estérases, deux UDPGT et quatre protéines cuticulaires. Parmi ces gènes, les P450s *CYP6Y2* et *CYP4J10* ont été précédemment identifiés comme étant surexprimés chez des populations résistantes aux insecticides bien que leur rôle dans la résistance n'ait pas été fonctionnellement validé. Contrairement à la lignée Delta-R, la lignée Clothia-R a montré une sur-transcription de nombreux gènes potentiellement associés à la résistance métabolique. Ces gènes incluent 16 P450s dont certains (*CYP6M1*, *CYP12F1*, *CYP4C27*, *CYP6P1*, *CYP4G16*, *CYP6M3*, *CYP6Z3*, *CYP6Z2*, *CYP4H24*, *CYP6Z1*, *CYP6P3*, *CYP6P4*) ont déjà été associés à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* (Riveron et al.

2018) ou bien présentent une forte homologie de séquence protéique avec des P450 conférant une résistance aux néonicotinoïdes chez d'autres espèces d'insectes (Le Goff et al. 2003 ; Joußen et al. 2008 ; Karunker et al. 2009 ; Pang et al. 2016 ; Riaz et al. 2012 ; Sparks et al. 2012). Neuf transférases appartenant pour la plupart à la famille des UDPGT et cinq carboxylestérases ont été identifiées comme sur-transcrites chez la lignée Clothia-R. La sélection avec la clothianidine a également eu pour conséquence la sur-transcription de six transporteurs ABC et de six protéines cuticulaires incluant les gènes *CPR21* et *CPAP3-A1b* tous deux précédemment associés à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae*. Enfin, comme prédit par les analyses d'enrichissement GO, les lignées Clothia-R et Delta-R ont montré une sur-transcription de plusieurs gènes codant pour des sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). Peu de gènes candidats ont été identifiés comme étant sur-transcrit chez la lignée Fludo-R. La plupart de ces gènes étant partagés avec la lignée Clothia-R. Ces gènes incluent quatre CYP4 (*CYP6AH1*, *CYP4D17*, *CYP4C27* et *CYP4D15*), une estérase, deux sulfotransférases, une GST (*GSTD11*) et deux transporteurs ABC (*ABCCA3*, *ABCG18*).

2.4.5. Variations de polymorphisme associées à la résistance

Les données de RNA-seq ont permis de détecter plus de 145000 substitutions ou insertions/délétions bi-alléliques et polymorphes entre la lignée Tiassalé-S et au moins une lignée sélectionnée avec les insecticides. Ces variations couvrent plus de 44% des gènes d'*An. gambiae* (annotation Agam P4.12) avec la moitié des gènes couverts montrant plus de 15 variations. Cette analyse a aussi permis d'identifier des variations de forte fréquence entre la lignée Tiassalé-S et les lignées sélectionnées (« Differential SNPs » voir méthodes publication I). Ces variations sont peu nombreuses chez la lignée Delta-R (283, 0,19%) mais plus fréquentes chez la lignée Clothia-R (2632, 1,79%) tandis que la lignée Fludo-R montre un nombre de variations différentielles intermédiaire (1397, 0,96%). Une détection des signatures de sélection a ensuite été effectuée en combinant deux approches : l'une basée sur les variations de fréquence alléliques (Differential SNPs) et l'autre basée sur une méthode Bayésienne permettant de détecter les variations montrant une augmentation significative de F_{ST} en comparaison d'une enveloppe de tolérance calculée à partir de l'ensemble des loci (« Outlier SNPs » voir méthodes publication I). La fréquence des variations identifiées par ces deux méthodes (« Differential » et « Outliers ») a ensuite été calculée pour chaque gène et projetée sur les chromosomes d'*An. gambiae* afin de mettre en évidence les régions génomiques montrant des fortes signatures de sélection dans chaque lignée sélectionnée en comparaison de la lignée Tiassalé-S.

Cette analyse a révélé des profils de signature de sélection divergents entre les trois lignées sélectionnées (Figure 5 du manuscrit ci-après). Très peu de loci ont montré de fortes signatures de sélection chez la lignée Delta-R et aucun d'eux n'étant localisé à proximité de gènes précédemment associés à la résistance aux insecticides. Aucune signature de sélection n'a pu être observée au niveau locus VGSC (Voltage-Gated Sodium Channel, portant la mutation Kdr 1014) car la très faible expression de ce gène chez les femelles adultes n'a pas permis de détecter de variations dans cette région génomique (polymorphismes les plus proches détectés à -80 Kb et +140 Kb du gène VSGC). Contrairement à la lignée Delta-R, la lignée Clothia-R a montré plusieurs loci avec de fortes signatures de sélection essentiellement situés sur les Chr 2R, 3R et 3L. Les deux locus situés sur chr 2R à ~ 5,5 Mb et sur chr 3L à ~ 19,8 Mb ne sont associés à aucun gène candidat tandis que le locus situé sur le Chr 3R à ~ 6,9 Mb correspond au locus des CYP6M (incluant 14 P450s appartenant à la famille des CYP6) précédemment associé à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae*. Enfin, la lignée Fludo-R a montré plusieurs signatures de sélection, mais aucune d'entre elles n'a aussi été observée dans les deux autres lignées sélectionnées avec les deux insecticides composant la formulation Fludora® Fusion. Les deux signatures de sélection les plus fortes observées sur le Chr 3R à ~ 10 Mb et sur le Chr 3R à ~ 11 Mb ne correspondent à aucun gène candidat ou locus de résistance connu.

2.4.6. Rôle des *CYP6M* dans la résistance à la clothianidine

Les analyses génomiques ont montré que lignée sélectionnée avec la clothianidine présente une forte signature de sélection au niveau du locus des CYP6M. Ce locus contient 14 P450s de la famille des CYP6 dont 8 (*CYP6Y2*, *CYP6Y1*, *CYP6M1*, *CYP6M3*, *CYP6M4*, *CYP6Z1*, *CYP6Z2*, *CYP6Z3*) présentant une orthologie protéique élevée avec des P450s précédemment associés à la résistance aux néonicotinoïdes chez d'autres insectes (Figure 6A du manuscrit ci-après). Parmi eux, *CYP6Y1*, *CYP6M1* et *CYP6M3* montrent une sur-transcription chez la lignée Clothia-R. Une analyse plus fine des signatures de sélection sur ce locus a montré que le pic de sélection semble se situer sur le gène *CYP6M1* qui contient 28 SNPs différentiels/outliers sur les 44 détectés et dont 11 sont non-synonymes (Figure 6B du manuscrit ci-après).

L'analyse des effets géniques de ces SNPs non-synonymes a ensuite permis de montrer que trois d'entre eux (E215D, F240L et M375T) sont localisés au niveau du site de reconnaissance de substrat de *CYP6M1* (régions « Substrate Recognition Sites ») (Figure 6C du manuscrit ci-après). De plus, les mutations E215D et F240L correspondent à des positions affectant la liaison du néonicotinoïde imidaclopride avec les cytochromes P450 de *B. tabaci*

(*CYP6CM1vQ*), *D. melanogaster* (*CYP6G1*), *N. lugens* (*CYP6AR1*) et *Ae. aegypti* (*CYP6BB2*). Ces deux mutations ponctuelles montrent de faibles fréquences chez la lignée Tiassalé-S (~1,6%) alors qu'elles sont proches de la fixation chez la lignée Clothia-R à la génération 17 (~97%) mais que leur fréquence reste faible (<35%) chez les lignées Delta-R et Fludo-R (Figure 6C du manuscrit ci-après). La modélisation structurale de l'impact de ces variations non-synonymes sur la structure de *CYP6M1* et ses interactions avec la clothianidine a ensuite été effectuée en utilisant la structure du *CYP3A4* humain (cristallisé expérimentalement) comme structure initiale (voir méthodes publication I). Cette analyse a montré une augmentation de 17 % du volume de du site actif de *CYP6M1* chez le variant Clothia-R (869 Å³) par rapport au variant Tiassalé-S (738 Å³) (Figure 6D du manuscrit ci-après). Cette analyse a aussi permis de prédire la formation d'une liaison hydrogène entre la clothianidine et la Val-369 (distance de 3,6 Å) chez les deux variants, tandis qu'une autre liaison hydrogène avec le Leu-485 (distance de 3,0 Å) ait été prédite pour le variant Clothia-R en lien avec une rotation d'environ 90° la clothianidine dans le site actif. Cette rotation du substrat semble également conduire à une distance plus faible entre l'Asp-215 et la clothianidine chez le variant Clothia-R suggérant un rôle différentiel de ce résidu dans les interactions avec la clothianidine entre les deux variants.

L'association entre les niveaux de transcription des gènes *CYP6M1*, *CYP6M2* et *CYP6M3* et la résistance à la clothianidine a ensuite été examinée plus en détail à la génération G31 par RT-qPCR. Le niveau de transcription de chaque gène a été comparé entre les lignées Tiassalé-S et Clothia-R en combinaison avec une préexposition à l'inhibiteur biochimique des P450s Piperonil Butoxyde (PBO) et à la clothianidine. Parmi les 3 *CYP6M* étudiés, seul *CYP6M1* a montré une sur-transcription constitutive chez la lignée Clothia-R par rapport à la lignée Tiassalé-S tandis que *CYP6M2* et *CYP6M3* sont même apparus comme sous-transcrits (Supplementary Figure 5 du manuscrit ci-après). Bien qu'une faible sur-transcription de *CYP6M1* ait été observée chez la lignée Clothia-R, celle-ci est apparue d'autant plus forte chez les survivants à la clothianidine (1,67 fois) suggérant un enrichissement des individus sur-exprimant ce P450 chez les survivants. La préexposition des individus Clothia-R au PBO a entraîné une diminution significative de leur survie à la clothianidine (-20%). Cette variation de phénotype a pu être associée à un niveau de transcription de *CYP6M1* chez les survivants similaires à celui des individus Clothia-R non exposés suggérant que le PBO affecte la survie des individus sur-exprimant *CYP6M1* à la clothianidine (Supplementary Figure 5 du manuscrit ci-après).

De manière globale, ces résultats supportent le rôle conjoint d'une surexpression de *CYP6M1* et de la sélection de variants structuraux augmentant sa capacité de métabolisme dans la résistance de la lignée Clothia-R à la clothianidine.

2.5. Discussion

L'objectif de cette publication était d'étudier à travers une expérience de sélection contrôlée, le potentiel du vecteur du paludisme en Afrique, *An. gambiae*, à développer une résistance au mélange Fludora® Fusion sur plusieurs générations et ensuite d'analyser les mécanismes associés. Cette expérience de sélection contrôlée visait notamment à comparer la dynamique de résistance à chaque insecticide séparément et à leur combinaison. Afin de maximiser la plage dynamique des variations de fréquence des allèles de résistance au cours du processus de sélection, une lignée modérément résistante (lignée Tiassalé-S) obtenue à partir d'un croisement contrôlé entre la population multi-résistante Tiassalé et la population sensible de Kisumu a été utilisée pour la sélection.

La présence en faible fréquence d'allèles de résistance dans la lignée de départ Tiassalé-S a entraîné une sélection rapide de la résistance à la deltaméthrine dans la lignée Delta-R. Cette résistance est apparue fortement associée à une augmentation rapide de la fréquence de la mutation *kdr* ouest L1014F confirmant ainsi le rôle clé de cette mutation dans la résistance à la deltaméthrine (Liu 2015 ; Martinez-Torres et al. 1998). Ces travaux ont aussi permis de montrer qu'aucune enzyme de détoxification dont le rôle est connu dans le métabolisme des insecticides pyréthrinoïdes tels que *CYP6M2* et *CYP6P3* précédemment identifiées à Tiassalé (Edi et al. 2014 ; Riveron et al. 2018) ni d'autres gènes de détoxications communément associés à la résistance n'ont été sélectionnés chez la lignée Delta-R (David et al. 2013 ; Mohammed et al. 2017). Cela suggère que sous les conditions de sélection utilisées (pression de sélection correspondant à environ 50% de mortalité), la sélection rapide de la mutation *kdr* L1014F s'est imposée face à la sélection d'allèles de résistance métabolique (Contreras-Perera et al. 2020). Cette hypothèse est confirmée par les données de polymorphisme qui n'ont montré aucune signature de sélection sur les loci couramment associés à la résistance métabolique chez la lignée Delta-R. Ces résultats supportent aussi l'hypothèse de l'avantage adaptatif des individus porteurs de mutations des cibles des insecticides sous l'effet d'une forte pression de sélection par la deltaméthrine (Fabrice Chandre et al. 2000 ; Shi et al. 2015).

Aucune augmentation de la résistance n'a été observée après 33 générations de sélection au mélange Fludora® Fusion dans nos conditions expérimentales. Ceci suggère que l'efficacité

de la combinaison clothianidine-deltaméthrine a été préservée tout au long du processus de sélection en prévenant la sélection conjointe d'allèles conférant une résistance à ces deux insecticides. Cette hypothèse est supportée par la diminution progressive de la fréquence de la mutation kdr ouest L1014F dans la lignée Fludo-R suggérant que la présence de la clothianidine dans la formulation Fludora® Fusion permet de prévenir la sélection de cette mutation. De plus, les données de RNA-seq n'ont pas montré une forte réponse associée aux P450s chez la lignée Fludo-R, ce qui supporte le fait que la sélection des allèles de résistance métabolique a aussi été limitée par la combinaison des deux principes actifs. Par conséquent, la résistance croisée modérée à la deltaméthrine observée chez la lignée Fludo-R à la génération G17 semblerait plutôt être la conséquence de la persistance d'individus portant la mutation Kdr L1014F (25 % d'homozygotes résistants à G17) qu'à la sélection d'une surexpression d'enzymes de détoxification.

La sélection avec la clothianidine seule a engendré une augmentation significative de la résistance de la lignée Clothia-R à partir de la génération G13 et se stabilisant à un niveau modéré jusqu'à la génération G33. Les données de RNA-seq ont montré que cette résistance était associée à la surexpression de multiple cytochromes P450 dont certains ont déjà été impliqué dans la résistance aux insecticides. Cet impact sur l'expression des P450s a été confirmé par une forte signature de sélection observée au niveau du locus des *CYP6M* sur le chromosome 3R (cluster de 14 gènes codants pour des P450s de la famille des CYP6). Or certains de ces CYP6 montrent une forte orthologie de séquence protéique avec des CYP6 connus pour leur rôle dans la résistance métabolique aux néonicotinoïdes chez d'autres espèces d'insectes dont *CYP6BB12* chez *Ae. aegypti* (Riaz et al. 2012), *CYP6G1*, *CYP6A8* chez *D. Melanogaster* (Le Goff et al. 2003 ; Joußen et al. 2008 ; Sparks et al. 2012) *CYP6CM1Vq* Chez *B. tabaci* (Karunker et al. 2009). Cela suggère une conservation relativement bonne des cytochromes P450 associés à la résistance aux néonicotinoïdes chez les insectes.

Une analyse plus poussée des données de polymorphisme sur le locus des *CYP6M* a révélé que la signature de sélection observée sur ce locus était centrée sur le gène *CYP6M1*, bien que l'approche par RNA-seq n'aient pas permis d'obtenir des données d'expression et de polymorphisme pour tous les gènes de ce cluster. L'analyse des variations non-synonymes affectant *CYP6M1* a révélé la sélection chez la lignée Clothia-R de plusieurs mutations non-synonymes susceptibles d'affecter le métabolisme de la clothianidine. Deux de ces variations non-synonymes (E215D et F240L) étaient situées à des positions conservées qui ont été

montrées comme interagissant avec le néonicotinoïde imidaclopride chez *B. tabaci* (*CYP6CM1vQ*), *D. melanogaster* (*CYP6G1*), *N. lugens* (*CYP6AR1*) et *Ae. aegypti* (*CYP6BB2*) (Le Goff et al. 2003 ; Joußen et al. 2008 ; Karunker et al. 2009 ; Riaz et al. 2012 ; Sparks et al. 2012). La modélisation de l'effet structural de ces variations non-synonymes et de leur impact sur l'interaction entre *CYP6M1* et la clothianidine a confirmé le potentiel de ces changements d'acides aminés à potentialiser le métabolisme de la clothianidine dans la lignée Clothia-R via des changements dans la conformation de son site actif.

L'étude d'association entre l'expression des *CYP6Ms* et la survie à la clothianidine par RT-qPCR a confirmé la sur-transcription du gène *CYP6M1* dans la lignée Clothia-R comparée à la lignée Tiassalé mais a aussi permis de montrer une augmentation du niveau d'expression de ce gène chez les survivants de la lignée Clothia-R à la clothianidine. Cela suggère que la sur-expression de *CYP6M1* chez certains individus de la lignée Clothia-R leur confère une survie accrue à l'insecticide. Cette hypothèse est aussi supportée par la réduction de cet effet après une préexposition au PBO entraînant une survie plus faible à la clothianidine des individus sur-exprimant ce P450. Dans l'ensemble, ces données semblent indiquer que la régulation transcriptionnelle ainsi que la sélection de variants structuraux de *CYP6M1* sont associées à la résistance à la clothianidine chez *An. gambiae*. Bien que d'autres enzymes de détoxification puissent contribuer à la résistance à la clothianidine, la présente étude supporte le rôle clé des P450s dans la résistance aux néonicotinoïdes comme cela a été précédemment observé chez d'autres espèces d'insectes (Bass et al. 2013 ; Le Goff et al. 2003 ; Hamada et al. 2020 ; Matsuda et al. 2020). Cette étude supporte aussi le rôle clé des cytochrome P450 de la famille des CYP6 dans la résistance croisée entre les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes, comme précédemment observé chez d'autres espèces d'insectes (Bass et al. 2015 ; Hamada et al. 2020 ; Matsuda, Ihara, and Sattelle 2020).

De manière générale, de multiples gènes codants pour différentes sous-unités des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) ont été identifiés comme sur-transcrits chez les lignées Delta-R et Clothia-R. Néanmoins, aucune signature de sélection n'a été observée en lien avec ces gènes et les données de polymorphisme n'a pas non plus permis de mettre en évidence des mutations non-synonymes affectant ces gènes de manière différentielle, supportant l'absence de mutations de cible des néonicotinoïdes dans les différentes lignées sélectionnées à partir de Tiassalé-S. Il a été montré que la modification de l'homéostasie présynaptique du Na⁺ par la mutation 1014F Kdr conduit à une diminution de la concentration

intracellulaire de Ca^{2+} qui à son tour affecte la transmission synaptique (Perrier et al 2020). Il a également été démontré que les néonicotinoïdes affectent la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Calas et al 2014 ; Bordereau et al 2012). Par conséquent, il est probable que la surexpression des récepteurs nicotiniques observée dans les lignées Delta-R et Clothia-R reflète des mécanismes de compensation physiologiques permettant le maintien de la transmission synaptique en présence de l'insecticide plutôt que des mécanismes directement associés à la résistance. Bien que cela reste à vérifier, l'absence d'un tel mécanisme chez la lignée Fludo-R pourrait être la conséquence de la capacité de la combinaison Fludora® Fusion à prévenir la sélection des allèles de résistance aux deux insecticides qui la composent.

Enfin, les données de résistance croisée ont révélé une augmentation significative de la résistance au DDT dans toutes les lignées sélectionnées par rapport à la lignée Tiassalé-S. Bien qu'une telle résistance accrue au DDT soit probablement associée à la forte fréquence de la mutation Kdr L1014F chez la lignée Delta-R, cela est moins probable pour les lignées Clothia-R et Fludo-R présentant des fréquences plus faibles pour cette mutation. Bien que des gènes codant pour des enzymes de détoxification communément associés à la résistance au DDT tels que *GSTE2* (Ranson et al. 2001), *CYP6Z1* (Chiu et al. 2008) et *CYP6M2* (David et al. 2013 ; Edi et al. 2014 ; Yahouédo et al. 2017) n'ont pas été identifiés comme sur-transcrits chez ces deux lignées, la sur-transcription d'autres enzymes de détoxification ou bien de certaines protéines cuticulaires pourrait expliquer le phénotype de résistance croisée observée avec le DDT. En effet, la sur-transcription de *CYP4G16* (observée chez la lignée Clothia-R) a été associée à la résistance cuticulaire chez *An. gambiae* (Yahouédo et al. 2017). De même, la surexpression d'autres P450s tels que CYP4C27 et le CYP12F1 a déjà été associée à la résistance au DDT, bien que leur capacité à métaboliser le DDT n'ait pas été fonctionnellement validée (Chiu et al. 2008 ; Vontas et al. 2005 ; Yahouédo et al. 2017).

2.6. Conclusion

La présente étude n'a pas montré d'augmentation significative de la résistance au mélange Fludora® Fusion après plus de 30 générations de sélection. Ces résultats soutiennent une bonne efficacité de cette combinaison à long terme et sa potentielle valeur ajoutée dans les stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique. Nos données moléculaires indiquent aussi que cette combinaison de deltaméthrine et de clothianidine semble être efficace pour prévenir la sélection des mutations kdr et éventuellement d'autres allèles de résistance aux pyréthrianoïdes et aux néonicotinoïdes tels que ceux identifiés chez la lignée Clothia-R. Cependant, notre étude

a aussi permis de mettre en évidence la sélection relativement rapide d'allèles de résistance aux néonicotinoïdes par l'utilisation de la clothianidine. Bien que la résistance observée à la clothianidine se soit maintenue à un niveau modéré, nos données moléculaires suggèrent que, comme chez d'autres insectes, l'utilisation à grande échelle de néonicotinoïdes seuls pourrait conduire à la sélection relativement rapide de résistance métabolique chez le moustique *An. gambiae*. La colocalisation de ces allèles avec des gènes connus pour leur capacité à conférer une résistance aux pyréthrinoïdes mais aussi à d'autres familles d'insecticides pose question quant à leur utilisation seule pour la gestion de la résistance aux insecticides en Afrique.

Publication I: Experimental evolution supports the potential of neonicotinoid-pyrethroid combination for managing insecticide resistance in malaria vectors



OPEN

Experimental evolution supports the potential of neonicotinoid-pyrethroid combination for managing insecticide resistance in malaria vectors

Marius Gonse ^{Zoh}¹, Jean-Marc ^{Bonneville}¹, Jordan ^{Tutagata}¹, Frederic ^{Laporte}¹, Behi K. ^{Fodjo}², Chouaibou S. ^{Mouhamadou}², Christabelle Gba ^{Sadia}^{2,3}, Justin ^{McBeath}⁴, Frederic ^{Schmitt}⁵, Sebastian ^{Horstmann}⁶, Stephane ^{Reynaud}¹ & Jean-Philippe ^{David}^{1✉}

The introduction of neonicotinoids for managing insecticide resistance in mosquitoes is of high interest as they interact with a biochemical target not previously used in public health. In this concern, Bayer developed a combination of the neonicotinoid clothianidin and the pyrethroid deltamethrin (brand name Fludora Fusion) as a new vector control tool. Although this combination proved to be efficient against pyrethroid-resistant mosquitoes, its ability to prevent the selection of pyrethroid and neonicotinoid resistance alleles was not investigated. In this context, the objective of this work was to study the dynamics and the molecular mechanisms of resistance of *An. gambiae* to the separated or combined components of this combination. A field-derived *An. gambiae* line carrying resistance alleles to multiple insecticides at low frequencies was used as a starting for 33 successive generations of controlled selection. Resistance levels to each insecticide and target site mutation frequencies were monitored throughout the selection process. Cross resistance to other public health insecticides were also investigated. RNA-seq was used to compare gene transcription variations and polymorphisms across all lines. This study confirmed the potential of this insecticide combination to impair the selection of resistance as compared to its two separated components. Deltamethrin selection led to the rapid enrichment of the kdr L1014F target-site mutation. Clothianidin selection led to the over-transcription of multiple cytochrome P450s including some showing high homology with those conferring neonicotinoid resistance in other insects. A strong selection signature associated with clothianidin selection was also observed on a P450 gene cluster previously associated with resistance. Within this cluster, the gene *CYP6M1* showed the highest selection signature together with a transcription profile supporting a role in clothianidin resistance. Modelling the impact of point mutations selected by clothianidin on CYP6M1 protein structure showed that selection retained a protein variant with a modified active site potentially enhancing clothianidin metabolism. In the context of the recent deployment of neonicotinoids for mosquito control and their frequent usage in agriculture, the present study highlights the benefit of combining them with other insecticides for preventing the selection of resistance and sustaining vector control activities.

¹Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) UMR 5553 CNRS Grenoble-Alpes University, Grenoble, France. ²Centre Suisse de La Recherche Scientifique (CSRS), Abidjan, Côte d'Ivoire. ³University of Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire. ⁴Bayer CropScience Ltd, Cambridge Science Park, Cambridge, UK. ⁵Bayer SAS, 16 rue Jean Marie Leclair, 69009 Lyon, France. ⁶Bayer AG, 50 Alfred Nobel Straße, 40789 Monheim, Germany. ✉email: jean-philippe.david@univ-grenoble-alpes.fr

Malaria, caused by the protozoan *Plasmodium* parasite and transmitted by Anopheles mosquitoes is a major public health problem in Africa with 213 million cases and 405 000 deaths in 2018¹. Without effective vaccines and the development of antimalarial drug resistance by parasites, the fight against malaria mainly relies on vector control operations using insecticides² through insecticide-treated nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS)^{3,4}. Among the insecticides used in public health, pyrethroids remain the most used on ITNs because of their strong effects against the target insects and their low toxicity to the environment and mammals. In addition to pyrethroids, other insecticide families such as carbamates, organophosphates and in some specific cases DDT are also used in public health to improve the effectiveness of the fight against malaria vectors^{5,6}.

However, malaria vector control is now threatened by the spread of pyrethroid resistance throughout Africa⁷. Resistance to pyrethroids can be the consequence of various mechanisms in mosquitoes, such as non-synonymous mutations affecting the voltage-gated sodium channel targeted by these insecticides (i.e. Knock Down Resistance 'kdr' mutations), a lower insecticide penetration through insect cuticle, its sequestration, or its biodegradation (metabolic resistance)^{8,9}. *Kdr* mutations can confer resistance to pyrethroids and DDT. These mutations prevent the insecticide from binding to the voltage-gated sodium channel (VGSC) of the insect's nervous system. *Kdr* mutations affecting malaria vectors are widely distributed in Africa with two distinct mutations at position 1014 of the VGSC mainly associated with insecticide resistance^{10,11}: the L1014F *kdr west* mutation and the L1014S *kdr east* mutation^{12,13}. Metabolic resistance is also widespread in African malaria vectors and has been associated with resistance to multiple insecticide families. Increased insecticide metabolism can be caused by an increased activity of detoxification enzymes or structural modification affecting insecticide turnover. Detoxification enzymes include cytochrome P450 monooxygenases (P450s or *CYP* for genes), carboxy/cholinesterases (CCEs), glutathione S-transferases (GSTs) and UDP-glycosyl-transferases (UDPGTs) although other families can be involved^{9,14,15}. P450s from the *CYP6* gene family and epsilon GSTs have been mainly associated with metabolic resistance to pyrethroids in *An. gambiae*¹⁴. Overall, though target-site modifications and metabolic resistance appear to play a central role in pyrethroid resistance, additional resistance mechanisms such as cuticle modification, altered transport and sequestration have also been reported^{16–18}.

Most African *An. gambiae* populations are resistant to pyrethroid insecticides and also show varying levels of resistance to other insecticides used for vector control (carbamates, organophosphates and organochlorines). Insecticide resistance management therefore will benefit from the introduction of new chemistries. The fastest way to achieve that is by repurposing chemicals already used in agriculture, especially those with different modes of action which are less likely to be affected by cross-resistance with current public health insecticides¹⁹. Among the insecticides which are being proposed for managing pyrethroid resistance, neonicotinoids have aroused a high interest as (i) they have not previously been used for public health, (ii) they show a good toxicity against mosquitoes and a low toxicity to mammals²⁰ and (iii) they target nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) which constitute a novel target for malaria vectors^{21,22}. In this situation, a new insecticide formulation combining the neonicotinoid clothianidin and the pyrethroid deltamethrin (8:1 w/w) under brand name *Fludora Fusion* was developed by Bayer to be an additional tool for insecticide resistance management in African malaria vectors. By combining two unrelated modes of action, this indoor residual spraying (IRS) combination is intended to slow down the selection of resistance alleles to the newly introduced neonicotinoid clothianidin. However, the combination of clothianidin with deltamethrin, to which resistance alleles are already circulating in natural populations, may limit its resistance management potential. Field trials suggested that *Fludora Fusion* shows a good residual activity against malaria vectors from different African countries^{23,24} and a good efficiency against pyrethroid-resistant *An. gambiae* with a higher efficacy than deltamethrin alone^{25,26}. Although the mortality induced by *Fludora Fusion* was similar to clothianidin alone, these field trials also reported a higher knock down and repellency effect with *Fludora Fusion* as compared to clothianidin alone, suggesting a potential benefit of deltamethrin in the combination^{25,26}. However, the hypothesis that such a combination of two modes of action offers a different selection profile across multiple generations, or indeed a benefit, as compared to the individual insecticide components has not been tested in malaria vectors. As neonicotinoids are often used against crop pests in Africa, resistance alleles to this insecticide family may already be circulating at low frequency in natural mosquito populations neighboring agriculture areas. Such hypothesis is supported by a recent study suggesting the presence of neonicotinoid resistance alleles in *Anopheles coluzzi* populations neighboring agriculture areas^{27,28}. In such context, the large-scale implementation of *Fludora Fusion* for vector control might lead to the rapid selection of these resistance alleles leading to a decreased efficacy of this novel formulation, particularly if pyrethroid resistance alleles are also present.

In this context, the primary objective of this work was to compare the dynamics of resistance between *Fludora Fusion* and its two individual insecticide components in *An. gambiae* and to assess the ability of the combination to hinder resistance selection. The secondary objective of this work was to investigate the associated resistance mechanisms using molecular approaches. An *An. gambiae* line carrying resistance alleles to multiple insecticide families at low frequency was created by crossing a multi-resistant strain originating from an intense agricultural area of Côte d'Ivoire and a susceptible strain. The resulting line was then used for selecting, across multiple generations, three lines with *Fludora Fusion*, deltamethrin alone or clothianidin alone. The evolution of resistance levels to each insecticide and target site mutation frequencies were monitored throughout the selection process. The cross-resistance profiles of the selected lines to various insecticides were also investigated. A comparative RNA-seq approach was used to characterize the impact of selection on each line. Both differential gene transcription levels and selection signatures were investigated. The role of particular P450s in clothianidin resistance were then further explored using RT-qPCR and in silico protein modeling. The outcomes of the present study are discussed in the context of the deployment of neonicotinoids for malaria control and the added value of insecticide combinations for insecticide resistance management.

Results

Resistance dynamics during the selection process. In order to maximize the range of phenotypic and genotypic variations during the selection process, a moderately resistant line (Tiassalé-S) was created by mass-crossing the multi-resistant line Tiassalé with a fully susceptible line and then used for insecticide selection (see “Methods”). As expected from the introgression of susceptible alleles by controlled cross, bioassays confirmed the low resistance level of the Tiassalé-S line at G0 to most insecticide families with mortality levels higher than 95% for deltamethrin, bendiocarb and fenitrothion (see Supplementary Fig. S1 online). However, DDT resistance was still significant with 46% mortality observed to 4% DDT. Monitoring the resistance of each selected line to its respective insecticide along the selection process showed a rapid rise of deltamethrin resistance in the Delta-R line as compared to the non-selected line Tiassalé-S (Fig. 1). Mortality following deltamethrin exposure dropped from 73 to 30% at generation G7 and further decreased to stabilize around 15% ($P < 0.05$ from G7 to G33). In the Clothia-R line, a significant increased resistance to clothianidin was observed from G13 as compared to the non-selected line ($P < 0.05$ from G13 to G33) with resistance stabilizing at a moderate level. In the Fludo-R line, a significant increased resistance to Fludora Fusion mixture was observed at G13 though this was not confirmed in the subsequent generations. Comparing the deltamethrin resistance level of each line at generation G17 confirmed the high resistance of the Delta-R line but also suggested a slight increased resistance in the Fludo-R line ($P < 0.05$) (Fig. 2A). A slight increased clothianidin resistance was observed in both Clothia-R and Fludo-R lines ($P < 0.05$). A slight increased resistance to Fludora Fusion mixture was observed in Delta-R and Clothia-R lines ($P < 0.05$) but not in the Fludo-R line ($P > 0.05$). Assessing the resistance level of each line to other insecticides used in public health revealed no significant increased resistance to fenitrothion or bendiocarb in any line (Fig. 2B). However, DDT resistance alleles appeared further enriched in all selected lines with mortality levels dropping to less than 10% ($P < 0.05$).

Target sites mutations. The genotyping of the *kdr* west mutation (L1014F) revealed its association with deltamethrin resistance in the Delta-R line with an increased frequency from 47% at G0 to nearly 100% at G7 with most individuals being homozygotes for the resistant allele ($P < 0.05$, Fig. 3). Although a transient rise of *kdr* mutation frequency was observed in both Clothia-R and Fludo-R lines at G2, this was followed by a gradual decrease in the following generations supported by a decreasing frequency of resistant homozygotes ($P < 0.05$ from G11 and G17 for Clothia-R and Fludo-R lines respectively). The frequency of the G119S *Ace1* mutation were estimated at 10%, 7%, 14% and 10% in the Tiassalé-S line (G0), Delta-R line (G17), Clothia-R line (G17) and Fludo-R line (G17) respectively (Supplementary Table S2). As expected because not targeted by any insecticide used for selection, no significant frequency variation was observed in the selected lines as compared to the Tiassalé-S line ($P > 0.05$ for all comparisons) though a slight excess of heterozygotes was observed in the Clothia-R line ($P = 0.03$).

Gene transcription levels. RNA sequencing performed at generation G17 produced > 120 M reads across four replicates for each line. Though ~10% of these reads were filtered out based on sequence and mapping quality, this allowed detecting transcription signal in adult females for 10,829 genes. Among them, 2596 genes were found differentially transcribed in at least one selected line as compared to the non-selected Tiassalé-S line ($FC \geq 1.5$ -fold and adjusted P value ≤ 0.005 , see Supplementary Table S3 online). A strikingly higher number of genes were differentially transcribed in the Delta-R (1439 genes) and Clothia-R (1974 genes) lines as compared to the Fludo-R line (462 genes, Supplementary Fig. S4), supporting a lesser adaptive response in the Fludo-R line as compared to the two other selected lines. Only 31 and 17 genes were found over- and under-transcribed in all selected lines respectively. Gene Ontology (GO) term enrichment analysis performed on genes significantly over-transcribed in selected lines revealed a significant enrichment of terms associated with P450 activity in the Clothia-R line and in a lesser extent in the Fludo-R line (see Supplementary Fig. S5). These included the terms ‘monooxygenase activity’, ‘oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen’, ‘heme binding’ and ‘iron ion binding’. Terms associated with acetylcholine receptors were enriched in the Clothia-R and Delta-R lines including the terms ‘acetylcholine-activated cation-selective channel activity’ and ‘acetylcholine binding’. Enrichment analysis performed on genes significantly under-transcribed showed no enrichment of functions classically associated with resistance except a slight enrichment of terms associated with P450 and esterase activities in the Fludo-R line.

Focusing on gene families associated with known resistance mechanisms revealed different gene transcription profiles in each selected line as compared to the non-selected Tiassalé-S line (Fig. 4). Five P450s belonging to *CYP325*, *CYP6* and *CYP4* families, six esterases, two UDPGTs (*AGAP006775* and *AGAP009562*) and four cuticular proteins were over-transcribed in the Delta-R line. Among them only *CYP4J10* was previously shown to be over-transcribed in association with pyrethroid resistance. The Clothia-R line showed an over-transcription of multiple candidate genes belonging to families commonly associated with insecticide resistance. This included 16 P450s, most belonging to the *CYP6*, *CYP9*, *CYP12* and *CYP4* families. Some of them (*CYP6M1*, *CYP12F1*, *CYP4C27*, *CYP6P1*, *CYP4G16*, *CYP6M3*, *CYP6Z3*, *CYP6Z2*, *CYP4H24*, *CYP6Z1*, *CYP6P3*, *CYP6P4*) were previously associated with insecticide resistance in *An. gambiae* or showed a high protein similarity with P450s conferring neonicotinoid resistance in other insect species (see “Methods”). Five carboxylesterases were also over-transcribed in the Clothia-R line, with *COEAE2G* previously associated with insecticide resistance. Nine transferases were also over-transcribed in the Clothia-R line, most of them belonging to the UDPGT family. In addition to detoxification enzymes, clothianidin selection was also associated with the over-transcription of six ABC transporters and six cuticular proteins, among which *CPR21* and *CPAP3-A1b* were previously associated with resistance. In addition, clothianidin and deltamethrin selection led to the over-transcription of multiple nicotinic acetylcholine receptor subunits. Fewer candidate genes were over-transcribed in the Fludo-R line with

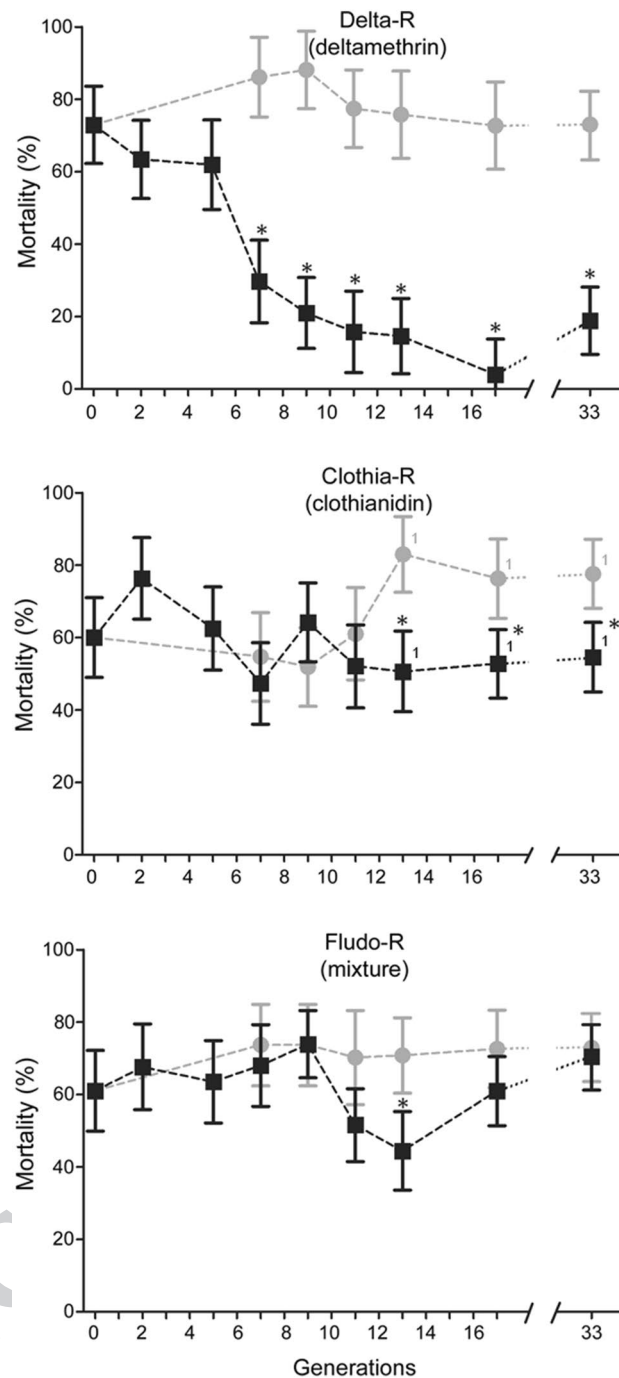


Figure 1. Resistance dynamics of each line along the selection process. Black squares: resistance of each selected line to the insecticide used for selection. Grey dots: resistance of the non-selected Tiassalé-S line. Resistance levels were compared using bottle assays and are expressed as mean % mortality $\pm$ 95% Wald confidence interval. Comparisons between each line and the Tiassalé-S line at each time point were performed using a Fisher test on mortality proportions ($*p < 0.05$). ¹Indicate that a new clothianidin solution was used for monitoring resistance levels at G13, G17 and G33, leading to higher clothianidin mortality rates as compared to previous generations.

most of them being shared with the Clothia-R line. This included four *CYP4s* (*CYP6AH1*, *CYP4D17*, *CYP4C17* and *CYP4D15*), one esterase (*AGAP011509*), two sulfotransferases (*AGAP029784*, *AGAP029783*), one GST (*GSTD11*) and two ABC transporter (*ABCCA3*, *ABCG18*). Only one UDPGT gene (*AGAP006775*) was over-transcribed in the three selected lines as compared to the non-selected Tiassalé-S line.

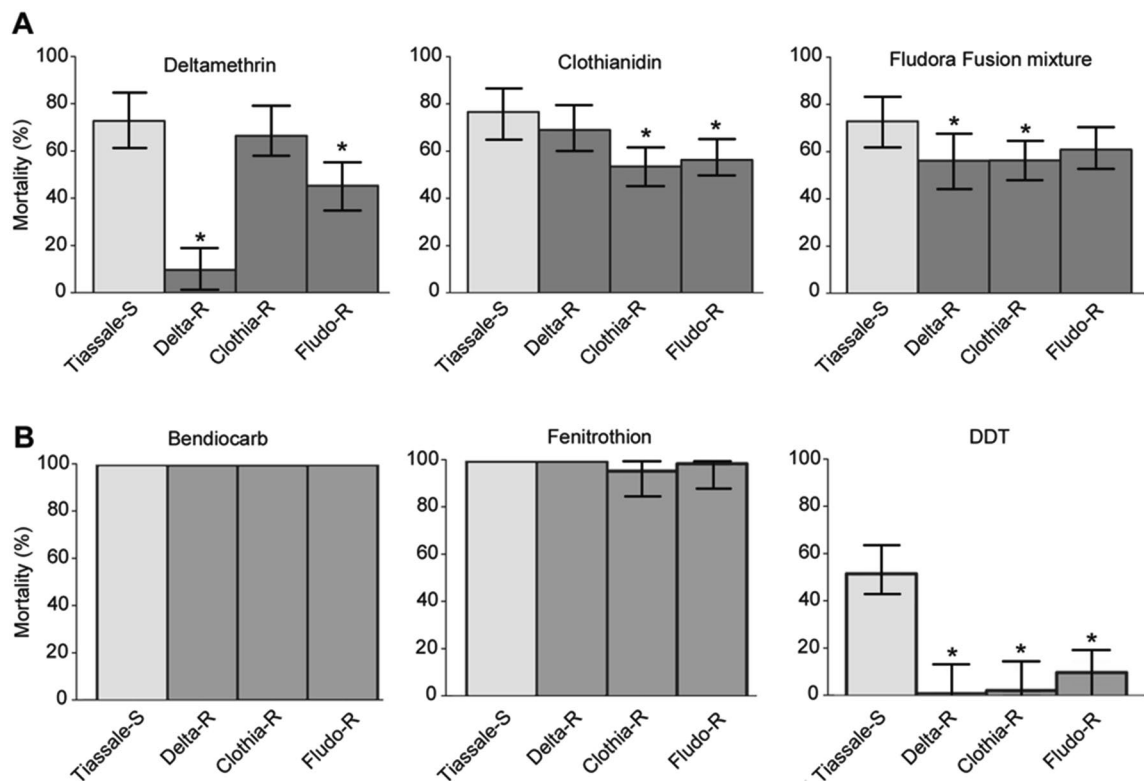


Figure 2. Cross-resistance of each line to insecticides. Cross-resistance profiles of each line to insecticides used for selection (A) and to other insecticide families used for vector control (B). All lines were compared at generation G17. Resistance levels to the insecticides used for selection were compared using bottle assays while resistance levels to other insecticides were compared using WHO test tubes equipped with papers impregnated with 0.5% bendiocarb, 1% fenitrothion and 4% DDT. Mortality rates are expressed as mean % mortality $\pm$ 95% Wald confidence interval and were compared to the unselected line using a Fisher test on mortality proportions (* $p < 0.05$).

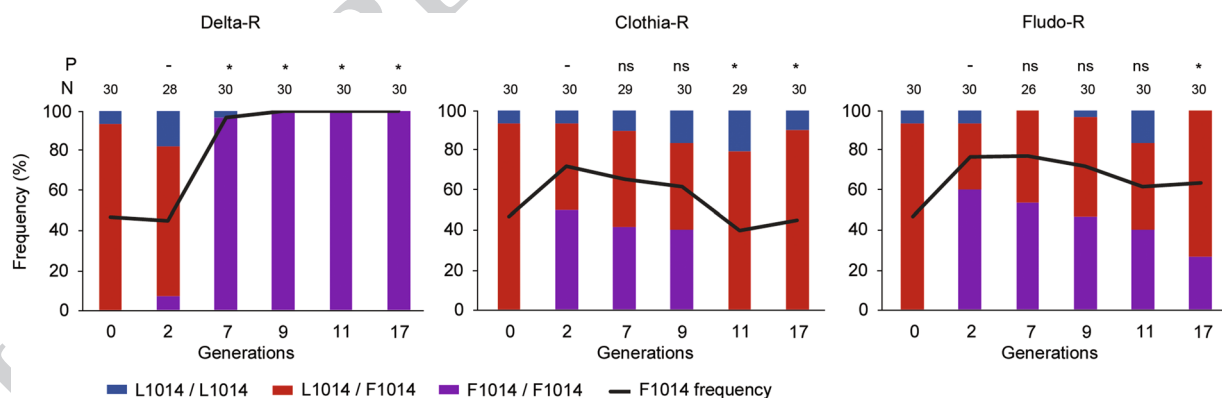


Figure 3. Dynamics of the L1014F kdr mutation along the selection process. For each line, the L1014F kdr mutation was genotyped in individual mosquitoes using the allele-specific qPCR TaqMan assay described in Bass et al.⁶⁶. For each selected line, both genotype and allele frequencies are reported. N number of individuals genotyped. P significance of genotype frequencies changes as compared to generation G2 (Chi² test, ns non-significant, * $P < 0.05$).

Gene polymorphism. RNA-seq allowed detecting 145,008 bi-allelic substitutions or indels being polymorphic between the Tiassalé-S line and any selected line (see “Methods”). These SNPs were mostly located within gene boundaries (>99%) and covered ~44% of *An. gambiae* genes. Half of the genes with a detected polymorphism contained at least 15 variations. These 145 K variations led to >200 K predicted genic effects according to AgamP4.12 annotation, of which ~8.3% affected the protein sequence. Looking for selection signatures differentiating the Tiassalé-S line from each selected line based on allele frequency variations identified less differential SNPs in the Delta-R line (283, 0.19%) than in the Clothia-R line (2632, 1.79%) and the Fludo-R line (1397,

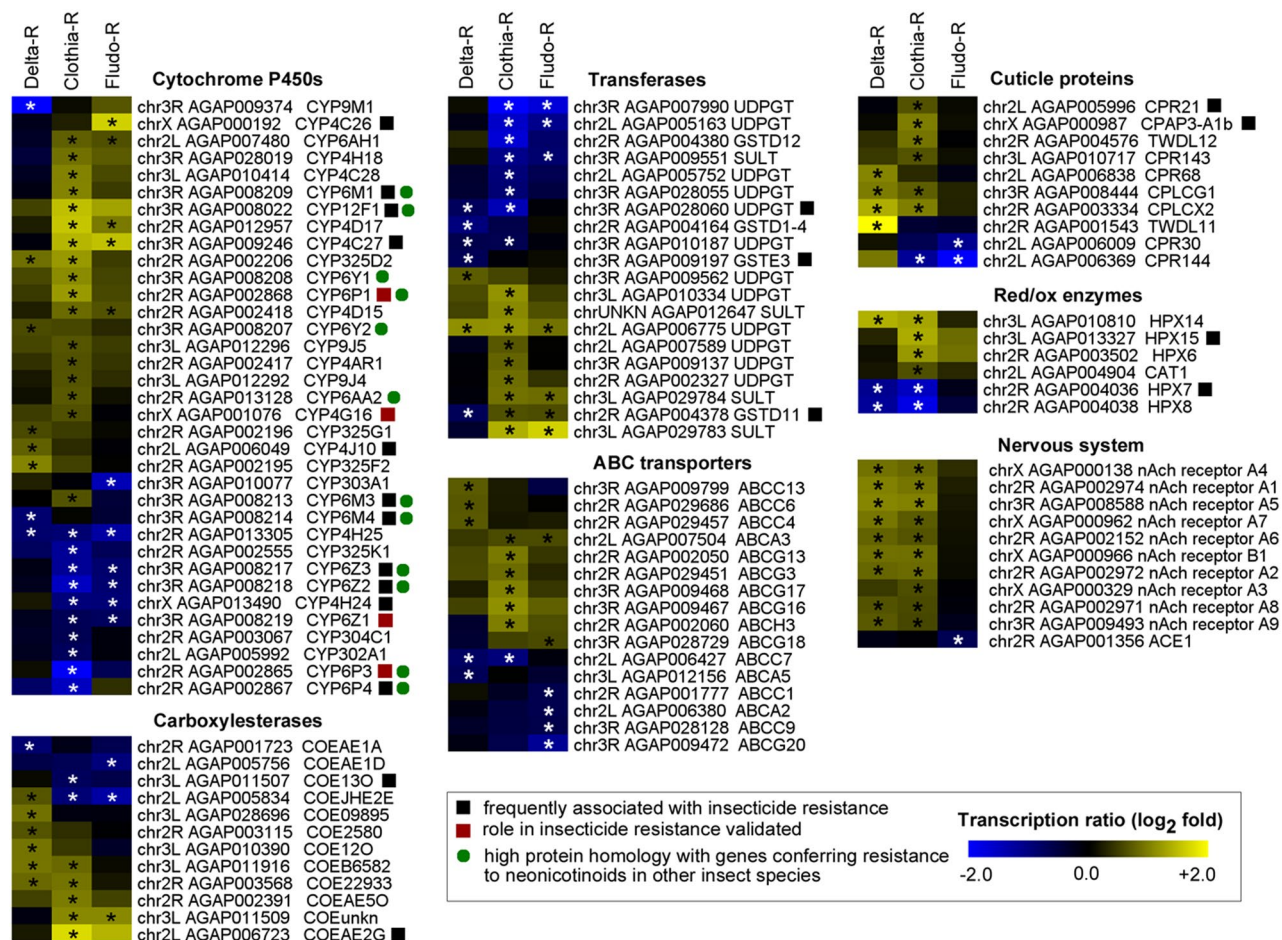


Figure 4. Transcription profiles of candidate genes associated with resistance. All candidate genes differentially transcribed in at least one selected line are shown. Colour scale shows the mean Log₂ Fold Change between each selected line and the parental Tiassalé-S line. Stars indicate a significant differential transcription (FC > 1.5-fold and corrected P value ≤ 0.005). Black squares indicate genes frequently associated insecticide resistance. Red squares indicate functionally validated resistance genes. Green dots indicate genes showing high protein homology with genes conferring resistance to neonicotinoids in other insect species.

0.96%). A similar trend was also observed using the Bayesian F_{ST} -based approach also slightly more outliers were identified (from 0.95% to 1.95%). Summing up outliers/differential SNPs at the gene level and projecting them on the AgamP4 genome revealed different selection signature profiles between the three selected lines (Fig. 5 and Supplementary Table S6 online). Only a few loci showed strong selection signatures in the Delta-R line, none matching with gene previously associated with insecticide resistance. No selection signature was observed near the *Kdr* mutation locus because the low transcription level of the VGSC gene impaired the detection of polymorphisms. The closest polymorphic SNPs located ~80 Kb upstream and ~140 Kb downstream of the VGSC gene did not show any significant selection signature. Conversely, the Clothia-R line showed multiple loci showing strong selection signatures essentially located on chr 2R, 3R and 3L. The two loci located on chr 2R at ~5.5 Mb and on chr 3L at ~19.8 Mb were not associated with any candidate gene but the locus located on chr 3R at ~6.9 Mb matched the *CYP6M* locus previously associated with insecticide resistance. Finally, the Fludo-R line showed some selection signatures but none of them were overlapping those observed in the two other lines. The two strongest selection signatures observed on chr 3R at ~10 Mb and on chr 3R at ~11 Mb did not match any candidate gene or known resistance locus.

Association of CYP6Ms with clothianidin resistance. Among the 105 P450s present in *An. gambiae* genome, 30 belong to the *CYP6* gene family among which 14 were located in the *CYP6M* locus showing a strong and specific selection signature in the Clothia-R line (Fig. 6A). In addition to *CYP6M2* known to metabolize pyrethroids, homology analysis showed that this cluster contains 8 *CYP6* genes (*CYP6Y2*, *CYP6Y1*, *CYP6M1*, *CYP6M3*, *CYP6M4*, *CYP6Z1*, *CYP6Z2*, *CYP6Z3*) showing high protein homology with P450s conferring neonicotinoid resistance in other insects (see “Methods”). Among them, *CYP6Y1*, *CYP6M1* and *CYP6M3* were all over-transcribed in the Clothia-R line.

First, the association between *CYP6M1*, *CYP6M2* and *CYP6M3* transcription levels and clothianidin resistance was examined at generation G31 using RT-qPCR. The transcription level of each gene was compared between the Tiassalé-S and the Clothia-R lines in combination with pre-exposure to the P450 inhibitor piperonyl

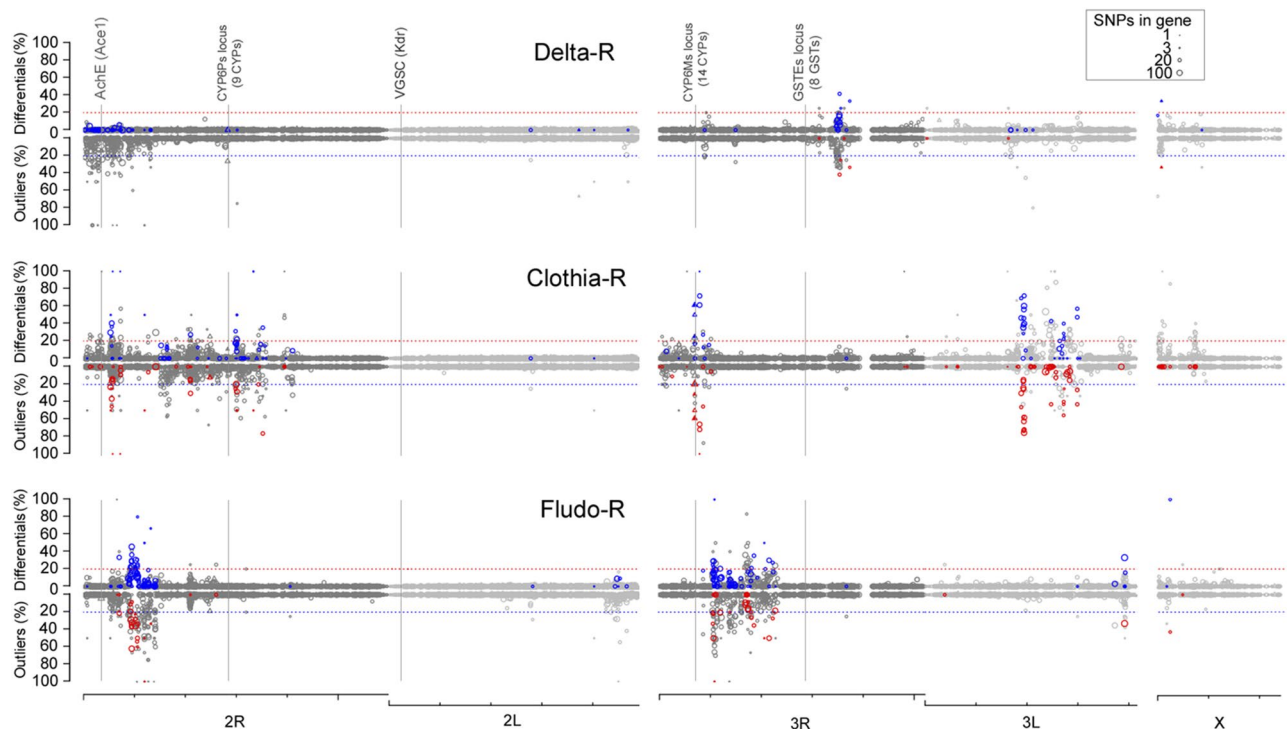
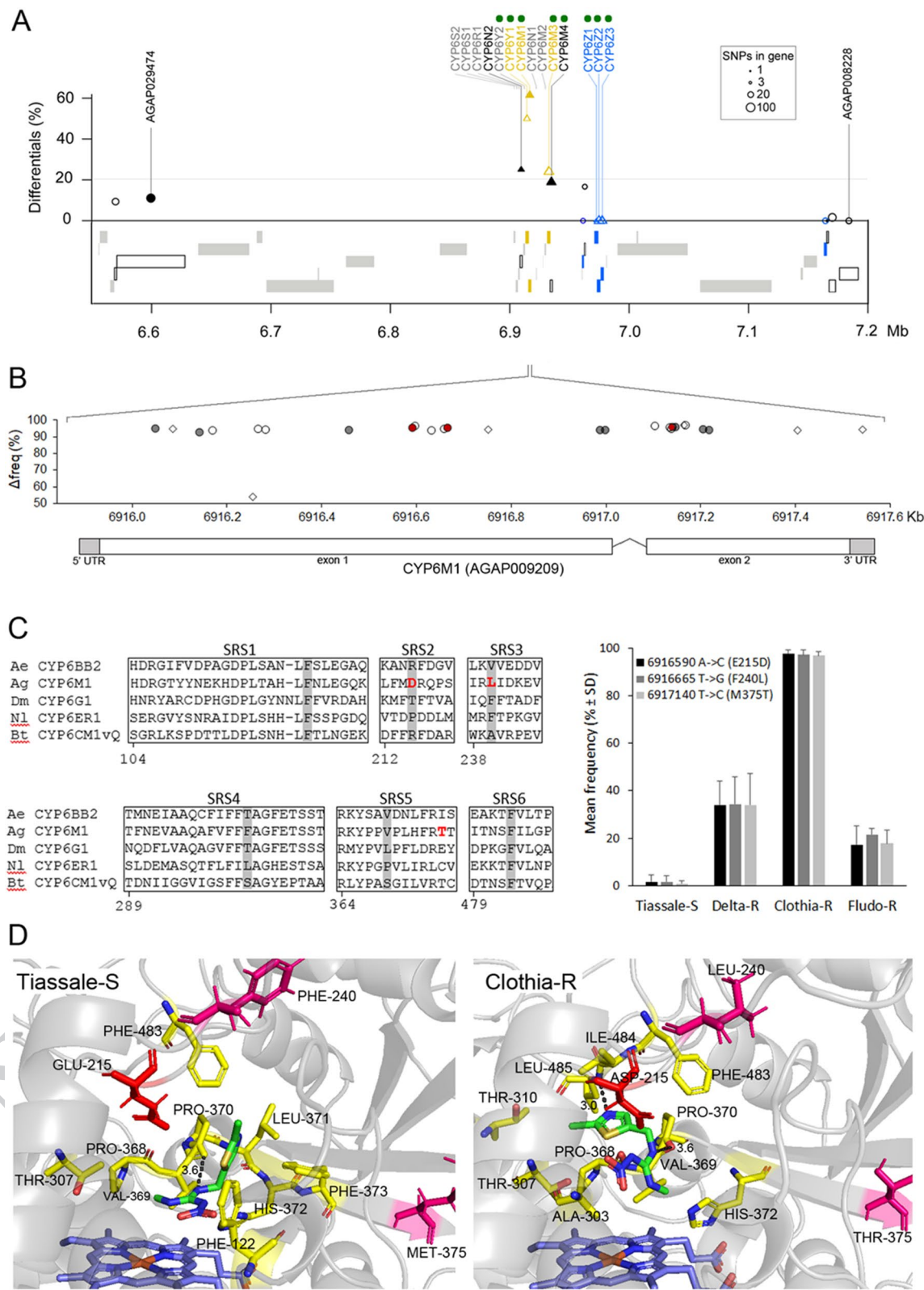


Figure 5. Selection signatures observed in each selected line. Selection signatures as compared to the non-selected Tiassalé-S line were computed using the 145,008 bi-allelic polymorphic SNPs detected by RNA-seq. The upper Y axis shows the proportion of differential SNPs per gene as obtained by the frequency-based approach while the lower Y axis shows the proportion of outliers per gene as obtained by the Fst-based approach. For each approach, blue/red marks indicate genes showing a differential/outlier proportion higher than 20% with the alternative approach (red/blue dashed lines). Symbol size is proportional to the number of polymorphic SNPs per gene. Triangles indicate candidate genes potentially involved in insecticide resistance. Filled symbols indicate the presence of differential SNPs/outliers affecting protein sequence. Loci commonly associated with insecticide resistance in *An. gambiae* are indicated (VGSC, AChE, CYP6Ps cluster, CYP6Ms cluster and GSTEs cluster). The genomic scale shows chromosome arms with ticks every 10 Mb.

butoxide (PBO) and subsequent exposure to clothianidin (Supplementary Fig. S7). Although not significant ($P=0.07$), *CYP6M1* showed a slight over-transcription in the Clothia-R line as compared to the Tiassalé-S line while *CYP6M2* and *CYP6M3* were clearly under-transcribed. The over-transcription of *CYP6M1* in the Clothia-R line further increased in survivors ($P=0.0014$), suggesting that its over-expression is associated with clothianidin survival. Exposing Clothia-R individuals to 4% PBO alone did not significantly induce *CYP6M1* transcription ($P=0.19$). Pre-exposing Clothia-R individuals to PBO before clothianidin exposure significantly decreased survival by 20% ($P<0.05$). Such exposure also affected *CYP6M1* transcription level in survivors suggesting a lower survival of individuals over-transcribing *CYP6M1* following its inhibition by PBO.

Then, polymorphisms affecting *CYP6M1* showing the strongest selection signature were further investigated. This gene contained 28 differential/outlier SNPs, among which 11 were non-synonymous (Fig. 6B) leading to the following amino acid changes: V35I, I66L, G171D, E215D, F240L, D347E, D351E, M375T, A377S, F396L, S401A. Among them, E215D, F240L and M375T were located within *CYP6M1* substrate recognition sites SRS2, SRS3 and SRS5 respectively (Fig. 6C). In addition, E215D and F240L matched positions previously shown to interact with the binding of the neonicotinoid imidacloprid in *B. tabaci* CYP6CM1vQ, *D. melanogaster* CYP6G1, *N. lugens* CYP6AR1 and *Ae. aegypti* CYP6BB2. These point-mutations were present at low frequency in the Tiassalé-S line (~1.6%) and strongly enriched in the Clothia-R line (~97%) while their frequency remained lower in other selected lines. Comparing in silico models obtained for the Tiassalé-S and Clothia-R *CYP6M1* proteins docked with clothianidin allowed identifying residues most likely interacting with the ligand (Fig. 6D). This analysis suggested a 17% increase in the volume of the binding pocket in the Clothia-R variant ($869 \text{ \AA}^3$) as compared to the Tiassalé-S variant ($738 \text{ \AA}^3$). The presence of a hydrogen bond between clothianidin and the Val-369 (distance of $3.6 \text{ \AA}$) was predicted in both variants though another hydrogen bond with Leu-485 was predicted in the Clothia-R variant due the rotation of clothianidin in the active site. This rotation also led to a lower distance between the Asp-215 and clothianidin suggesting an interaction of this residue with the ligand in the Clothia-R variant. This rotation also led to a different positioning of the nitro- and methyl- groups of clothianidin whereas the nitroguanidine moiety was still facing the heme, suggesting that preferred metabolites could be desmethyl-clothianidin, desmethyl-denitro-clothianidin or clothianidin-urea^{29,30}. Overall, although the amino acid changes identified in the SRS regions between Tiassalé-S and Clothia-R variants did not significantly differed in their physio-chemical properties, in silico models suggest that they may affect the positioning of clothianidin within *CYP6M1* active site and subsequent enzyme-ligand interactions.



◀ **Figure 6.** Response to clothianidin selection on the CYP6Ms locus. (A) Overview of RNA-seq data at the CYP6M locus for the Clothia-R line. The Y axis shows the proportion of differential SNPs per gene as obtained by the frequency-based approach. Genes in grey were not covered by polymorphic SNPs. Significant transcription level variations in the Clothia-R line as compared to the non-selected Tiassalé-S line are indicated by colours (yellow: over-transcribed, blue: under-transcribed, black: not differentially transcribed). Triangles indicate candidate genes. Filled symbols indicate the presence of differential/outlier SNPs affecting protein sequence. Green dots indicate genes showing high protein homology with genes conferring resistance to neonicotinoids in other insect species. (B) Distribution of differential SNPs on *CYP6M1*. The Y axis shows the frequency variation between the Clothia-R line and the Tiassalé-S line. Empty symbols: synonymous variations, filled symbols: non-synonymous variations. Symbol form indicate that the variant (circles) or the reference (lozenges) allele is enriched in the Clothia-R line. Red symbols indicate the two non-synonymous variations affecting the conformation of the active site. (C) Focus on non-synonymous variations affecting the active site. Left: non-synonymous variations affecting CYP6M1 substrate recognition site regions (SRS) in the Clothia-R variant. Amino acid in grey are those shown to interact with the binding of the neonicotinoid imidacloprid in *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ (Karunker et al.⁴²), *Nilaparvata lugens* CYP6ER1 (Pang et al.⁷⁵) and *Aedes aegypti* CYP6BB2 (Riaz et al.³⁸). Right: allele frequencies of the two non-synonymous variations likely interacting with the binding of clothianidin across all lines. D: In silico models of CYP6M1 protein variants identified in the Tiassalé-S and Clothia-R lines docked with heme (blue) and clothianidin (green). The best models obtained according to Rosetta-computed force fields are shown for each variant. Yellow residues are within 3.5 Å of the ligand. Residues differing between the two variants in SRS regions are shown in magenta. The Glu/Asp-215 located within 3.5 Å of the ligand in the Clothia-R variant but not in the Tiassalé-S variant is shown in red. Dark dashed lines show hydrogen bonds between the ligand: Val-369 (both variants), Leu-485 (Clothia-R variant only).

Discussion

The pyrethroid-neonicotinoid combination Fludora Fusion was pre-qualified for IRS usage by the World Health Organization in December 2018³¹. Field trials performed in multiple African countries confirmed the long lasting effect of this combination on various sprayed surfaces and its good efficacy against pyrethroid-resistant malaria vectors^{25,26}. Though resistance risk assessment is not mandatory in the public health insecticides evaluation scheme, understanding the resistance dynamics of novel insecticide-based product is essential for anticipating resistance management strategies and extend their lifespan. In this context, the aim of the present study was to investigate through a controlled-selection experiment the potential of the African malaria vector *An. gambiae* to develop resistance this novel insecticide combination across multiple generations and investigate the associated mechanisms. Because the operational advantage of this novel product essentially stands on the association of two active ingredients with distinct modes of action, our controlled selection experiment compared resistance dynamics to each insecticide separately and to their combination. As neonicotinoid resistance alleles may already be circulating in mosquito populations indirectly exposed to neonicotinoids used in agriculture^{28,28}, a field-derived *An. gambiae* line originating from the agricultural area of Tiassalé, Côte d'Ivoire was used as a parental line selection.

Fludora Fusion mixture and its components select different adaptive responses. Previous studies showed that *An. gambiae* from the Tiassalé area (Côte d'Ivoire) are highly resistant to the pyrethroid deltamethrin, the carbamate bendiocarb, the organochlorine DDT and moderately resistant to the organophosphate fenitrothion³². This multi-resistance phenotype was associated with a high frequency of the *Kdr* west L1014F mutation (~80%), a moderate frequency of the ace1 G119S mutation (~50%) and the over-transcription of multiple P450s previously associated with insecticide resistance³³. Bioassays performed on the Tiassalé-S line confirmed its lower resistance to insecticides following the introgression of susceptible alleles. This was confirmed by the lower frequencies of the *Kdr* west L1014F and the Ace1 G119S mutations with most individuals carrying them being heterozygotes. As predicted by the presence of pyrethroid-resistance alleles in the Tiassalé-S line, deltamethrin selection rapidly led to an increased resistance to this insecticide in the Delta-R line. This resistance phenotype was tightly associated with the increased frequency of the *Kdr* west mutation, confirming the key role of this mutation in deltamethrin resistance^{9,12}. Only a few detoxification enzymes were over-transcribed in the Delta-R line not including key pyrethroid metabolizers such as *CYP6M2* and *CYP6P3* previously identified in Tiassalé^{15,33} or any other detoxification enzyme commonly associated with insecticide resistance^{14,34}. Such absence of key metabolic enzymes in the Delta-R line suggests that the selection pressure applied (>50% mortality) rather selected for individuals carrying the *Kdr* west mutation than those carrying metabolic resistance alleles. Hence, the rapid selection of this major mutation could have prevented the selection of metabolic resistance alleles of lower importance in deltamethrin resistance³⁵. This was supported by polymorphism data showing no selection signature at metabolic resistance loci in the Delta-R line. Overall, this supports that the selection of target site resistance mechanisms are favored under intense selection pressure^{36,37}.

No such increased resistance was observed with Fludora Fusion mixture after 33 generations, suggesting that in our experimental conditions, the clothianidin-deltamethrin combination prevented the selection of resistance alleles having a significant impact on the resistance phenotype. The gradual decreased frequency of the *Kdr* west mutation in the Fludo-R line also supports the role of clothianidin in precluding its selection by the deltamethrin-clothianidin mixture.

However, we showed that selection with the neonicotinoid clothianidin alone led to an increased resistance to this insecticide although the resistance level was moderate and remained stable. RNA-seq data generated

from the Clothia-R line suggests that detoxification genes previously associated with insecticide resistance are affected by clothianidin selection. This included multiple P450s from *CYP6* and *CYP12* families. Though drift may have occurred during the selection process, the impact of clothianidin selection on detoxification enzymes associated with resistance was supported by the strong specific selection signature observed for the Clothia-R line at the *CYP6M* locus. Indeed, many *CYP6* genes from this P450 cluster show a high protein similarity with P450s conferring resistance to neonicotinoids in other insect species, including *Ae. aegypti* CYP6BB2³⁸, *D. melanogaster* CYP6G1, CYP12D1 and CYP6A8^{39–41} and *B. tabaci* CYP6CM1vQ⁴². Within the *CYP6M* locus, *CYP6M1* showed the strongest selection signature. Although such experiments should be interpreted with caution because of the limited number of replicates, the over-transcription of *CYP6M1* in the Clothia-R line observed by RT-qPCR and its PBO-dependent association with clothianidin survival also supports its contribution to the resistance phenotype. In terms of polymorphisms, *CYP6M1* was affected by multiple non-synonymous mutations with two of them (E215D and F240L) located at positions previously suggested to interact with the neonicotinoid imidacloprid in *B. tabaci* CYP6CM1vQ, *D. melanogaster* CYP6G1, *N. lugens* CYP6AR1 and *Ae. aegypti* CYP6BB2^{38–42}. In silico modelling of *CYP6M1* variants suggested that structural differences associated with these amino acid changes enhance clothianidin metabolism in the Clothia-R line. Although this needs to be functionally validated, the present study suggests that both transcriptional regulation and variant selection of *CYP6M1* contribute to clothianidin resistance in *An. gambiae*. From a larger perspective, the present study supports the key role of P450s in neonicotinoids resistance as previously observed in other insect species^{41,43–46}.

In addition to detoxification enzymes, RNA-seq data pointed out the striking over-transcription of multiple nicotinic receptor subunits in the Delta-R and Clothia-R lines though no selection signatures were observed at these *loci*. Furthermore, no differential non-synonymous SNP was detected within these genes despite a good coverage, suggesting the absence of neonicotinoid target-site mutations in these lines. It has been shown that the modification of synaptic Na⁺ homeostasis by 1014F Kdr mutation lead to a decrease of intracellular Ca²⁺ concentration which in turn affects synaptic transmission⁴⁷. As neonicotinoids also affect intracellular Ca²⁺ concentration⁴⁸, it is probable that the over-expression of nicotinic receptors observed in the Delta-R and Clothia-R lines rather reflect physiological compensation mechanisms to altered synaptic transmission than direct resistance mechanisms. Finally, a significant increase of DDT resistance was observed in all selected lines as compared to the Tiassalé-S line. This increased DDT resistance is likely associated with the high frequency of the *kdr* mutation in the Delta-R line, but this is less likely in the Clothia-R and Fludora-R lines showing lower *kdr* frequencies. However, genes encoding detoxification enzymes commonly associated with DDT resistance such as *GSTE2*⁴⁹, *CYP6Z1*⁵⁰ and *CYP6M2*^{14,17,33} were not over-transcribed in these two lines, suggesting that other resistance alleles might explain the observed phenotype. For instance, the over-transcription of *CYP4G16* in these lines in conjunction with multiple cuticle proteins is of interest as this particular P450 was associated with cuticle-based resistance in *An. gambiae*^{51,52}.

Pyrethroid-neonicotinoid combination as a new tool for vector control in Africa. The use of the same insecticide classes targeting only two biochemical targets (the AchE and the VGSC) for decades has led to the selection and spread of insecticide resistance throughout Africa⁵³. Insecticide resistance is now considered as a significant burden for malaria control with *Anopheles* populations often being resistant to multiple insecticide families⁷. Pyrethroid resistance is of major concern as these insecticides are mainly used for impregnating bednets^{54,55}. In this context, the development of novel vector control products that can be used for controlling pyrethroid resistance has been encouraged by WHO⁵⁶. Among them, IRS formulations combining two insecticides with different modes of action such as Fludora Fusion are of high interest. Though this IRS combination proved to be efficient for several months against African malaria vectors^{23–25}, its long-term efficacy and its impact on insecticide resistance dynamics remains to be confirmed.

Although our controlled selection experiment was performed on a single field-derived *An. gambiae* line and our results may have been impacted by drift effects, the absence of resistance development to FludoraFusion mixture suggest that clothianidin/deltamethrin combination represents an added value to current insecticides used for controlling malaria vectors in Africa. In particular, the potential of clothianidin to prevent the selection of *Kdr* mutations appears of high interest for managing pyrethroid resistance^{57,58}. In turn, the selection of P450s associated with clothianidin resistance was impaired when deltamethrin was added, suggesting the added value of combining these two insecticides in delaying the emergence of neonicotinoid resistance. Such results are also in favor of the concomitant use of pyrethroid-impregnated bednets and neonicotinoid-based IRS products for vector control within the same location.

The present study also suggests that the use of clothianidin alone can rapidly select for metabolic resistance alleles in *An. gambiae*. P450-mediated cross-resistance between pyrethroids and neonicotinoids has previously been observed in various insect species^{59–61} and our results support that this may also occur relatively rapidly in *An. gambiae*. Field studies are now needed to understand if these resistance alleles are only present in agricultural areas where neonicotinoids are regularly used or have already spread throughout Africa, and if they will be selected along the deployment of neonicotinoids for malaria control. In this frame, the candidate genes identified here provides the first set of neonicotinoid resistance markers in *An. gambiae*.

Conclusions

The present study supports the potential of neonicotinoid-pyrethroid combination as a novel vector control tool having the ability to delay the selection of resistance. As such combination appears to show a good efficacy against pyrethroid resistant populations, their deployment within an integrated vector control framework and under careful monitoring may be of added value for managing insecticide resistance in African malaria vectors.

Conversely, the deployment of neonicotinoids alone rises concerns as this may rapidly lead to the emergence and spread of neonicotinoid resistance alleles in malaria vectors as observed in other insect species.

Methods

Use of animals. Blood feeding of adult mosquitoes was performed on mice. Mice were maintained in the animal house of the federative structure Environmental and Systems Biology (BEeSy) of Grenoble-Alpes University agreed by the French Ministry of animal welfare (agreement n° B 38 421 10 001) and used in accordance to European Union laws (directive 2010/63/UE). The use of animals for this study was approved by the ethic committee ComEth Grenoble-C2EA-12 mandated by the French Ministry of higher Education and Research (MENESR). The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

Mosquitoes. *A. gambiae* larvae were collected in 2010 in the vicinity of Tiassalé in the south of Côte d'Ivoire, an intensive agricultural area which has high coverage of pyrethroid-impregnated mosquito nets together with an intensive use of pesticides for crop protection including pyrethroids, organophosphates, carbamates and neonicotinoids⁶². Previous studies showed that malaria vectors from this area carry multiple resistance alleles conferring resistance to various insecticide families including pyrethroids, DDT, carbamates and organophosphates^{32,33,63}. After species identification, *An. gambiae sensu stricto* specimens were used to create the Tiassalé strain that was then kept without insecticide selection pressure at the Centre Suisse de Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (CSRS). In order to maximize the dynamic range of resistant allele frequency variations during the selection process, a moderately resistant line (Tiassalé-S line) created by mass-crossing the Tiassalé line once with the fully susceptible line Kisumu was used for the controlled selection experiment. The Tiassalé-S line was then maintained without selection pressure for two generations before selection. All the lines described thereafter were maintained in the LECA tropical insectaries under standard conditions (29 °C, 90% relative humidity, 14 h/10 h light/dark period). Larvae were bred in deionized water and fed with TetraMin fish flakes. Adults were fed on filter papers impregnated with a 5% honey solution and blood feeding of adult females was performed on mice.

Controlled selection. The Tiassalé-S line was divided into four distinct lines. The first line (Tiassalé-S) was kept without selection and used as control for the selection experiment. The three other lines were selected in parallel with the pyrethroid deltamethrin (Delta-R line), the neonicotinoid clothianidin (Clothia-R line) or a mixture of deltamethrin and clothianidin in equivalent proportion (8:1 w/w) to *Fludora Fusion* (Fludo-R line). Because filter paper impregnation is not appropriate for clothianidin (crystallization of the active ingredient) all insecticide selections were performed using 250 mL glass bottles impregnated with insecticide. All insecticides used for bottle impregnation were obtained as pure active ingredients from Sigma. Deltamethrin was diluted in 100% acetone while clothianidin and clothianidin/deltamethrin mixture were diluted in an acetonic solution containing 17% (v/v) of mero solvent (MERO EC733, an emulsifiable concentrate containing 81.7% of rapeseed fatty acid esters in ethoxy-7-tridecanol). Bottles were impregnated with 1 mL of insecticide solution. For each line, insecticide selection consisted in introducing at least 15 batches of 20 non-blood fed females into insecticide-impregnated bottles. Doses used for selection were initially calibrated in order to reach 60% mortality in the in the Tiassalé-S line as follows: deltamethrin 10 µg/mL; clothianidin 0.45 µg/mL; clothianidin/deltamethrin mixture 0.45/0.05625 µg/mL (w/w ratio of 8:1, thereafter designated as Fludora Fusion mixture). Exposure times were as follows: deltamethrin 15 min, clothianidin 20 min, Fludora Fusion mixture 15 min. These times were slightly adjusted through the selection process in order to maintain an equivalent selection pressure between lines (between 50–70% mortality). Mortality rates were recorded after a recovery time of 72 h in order to consider the slower effect of clothianidin and Fludora Fusion mixture. Survivors were then transferred into new cages and blood-fed to generate eggs for the next generation. Selection was performed for each line at each generation until G33 except for generations G3, G4, G8, G13, G15, G17, G20, G22, G27, G29 and G32 in order to limit drift effects as population size was low (<200 emerging females) for one line.

Resistance monitoring through the selection process. The resistance profile of the parental line Tiassalé-S to the four main insecticide classes was characterized before the start of the selection experiment (G0) using Standard WHO susceptibility assays. Insecticide exposures were performed according to WHO standard procedures⁶⁴ using test tubes equipped with filter papers impregnated with the following insecticides: deltamethrin 0.05%; DDT 4%; bendiocarb 0.5% and fenitrothion 1%. Exposure time was fixed to 1 h for each insecticide. At least five lots of 20 five-day-old adult females were tested for each insecticide. Mortality rate was recorded after a 24 h recovery time during which mosquitoes were provided a 5% honey solution. Mortality rates were expressed as mean mortality ± Wald's confidence intervals.

The resistance level of each selected line to its respective insecticide was monitored at generations G0 (parental Tiassalé-S line), G2, G5, G7, G9, G11, G13, G17 and G33. Insecticide testing was performed using CDC bottles impregnated with a constant dose of insecticide corresponding to the initial dose used for selection (see above). Exposures were performed on 5 batches of 20 non-blood fed females per insecticide. Mortality rates were recorded after a 72 h recovery time in order to consider the slower effect of clothianidin. The resistance level of the non-selected Tiassalé-S line to each insecticide was also monitored in order to account for variations across generations inherent to insecticide solution preparation. Mortality rates were expressed as mean mortality ± Wald's confidence intervals. Differences between each selected line and the control line Tiassalé-S at each generation were tested using Fisher exact tests on mortality proportions (N = 5). At G17, the resistance level of each line to the three insecticides were compared using the same methodology in order to assess cross

resistance patterns between lines. The resistance levels of each line to DDT, bendiocarb and fenitrothion were also measured at G17 using standard WHO susceptibility assays as described above.

Target sites mutations. The frequencies of target-site mutations previously identified in the Tiassalé strain (*Kdr* west L1014F and *Ace1* G119S) were monitored for each selected line through individual genotyping. *Kdr* L1014F mutation was genotyped at generations G0, G2, G7, G9, G11 and G17. Because the acetylcholinesterase was not targeted by any insecticide used for selection, the frequency of the *ace1* G119S was only genotyped at G0 and G17. At each generation, genomic DNA was extracted from 30 adult females of each line using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method⁶⁵. Genomic DNA was resuspended in 20 µL nuclease-free water, quantified using the Qubit DNA BR assay (ThermoFisher Scientific) and diluted to 0.5 ng/µL for genotyping. The *Kdr* L1014F and *Ace1* G119S mutations were genotyped using the TaqMan qPCR methods described in⁶⁶. Quantitative PCR reactions were performed on a CFX96 Real Time system (Bio-Rad) with PCR cycles as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 45 s. For each mutation, individuals were scored as homozygous susceptible/resistant or heterozygous based on the intensity of the HEX/FAM channels at the end of the PCR reaction as compared to positive and negative samples of known genotypes. Changes in genotype frequencies were tested at each generation using a Chi² test. For *Kdr* mutation, changes were tested as compared to generation G2 as generation G0 showed an abnormal excess of heterozygotes likely resulting from the initial controlled cross between the resistant line Tiassalé (carrying *Kdr* mutation at high frequency) and the fully susceptible line Kisumu.

RNA library preparation and sequencing. Differential gene expression between each selected line and the non-selected line Tiassalé-S was investigated at the whole transcriptome level at G17 using RNA-sequencing (RNA-seq). For each line, four pools of 30 three-day-old non-blood fed females not previously exposed to insecticide were used. Total RNA was extracted from each pool separately using Trizol (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Total RNA was then treated with DNase to remove genomic DNA contaminants. RNA-seq libraries were prepared from 150 ng total RNA using NEBNext® Ultra™ II Directional RNA library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) following manufacturer's instructions. Libraries were quantified using the Qubit DNA BR assay (ThermoFisher Scientific) and quality checked on a Bioanalyzer (Agilent). Libraries were sequenced in multiplex as single 75 bp reads on a NextSeq 500 sequencer (Illumina) by Helixio (Clermont-Ferrand, France). After unplexing and quality check using FastQC, reads were loaded into Strand NGS V 3.2 (Strand Life Sciences) and mapped against the AgamP4 assembly and AgamP4.12 geneset using standard parameters (min identity 90%, max gaps 5%, min aligned length 35 bp, ignore reads with more than 5 matches, trim 3' ends of reads with average quality ≤ 20). Mapped reads were then filtered based on their sequence quality and mapping quality as follows: Mean read quality ≥ 20, number of N ≤ 5, alignment score ≥ 90, mapping quality ≥ 120, number of matches = 1. The remaining reads (~90% of sequenced reads) were used for subsequent analyses.

Differential gene transcription analysis. Differential Transcription analysis was performed on all protein coding genes with normalization and quantification based on the DE-Seq algorithm⁶⁷. Only the 10,829 genes showing a coverage ≥ 4 reads/kb in all replicates of all conditions were kept. Transcription levels between each selected line and the parental line Tiassalé-S were then compared across the four biological replicates using an ANOVA followed by a Tukey HSD test. P values were adjusted for multiple testing corrections using the Benjamini–Hochberg method⁶⁸. Genes showing a transcription ratio ≥ 1.5 fold in either direction and a P value ≤ 0.005 in any selected line as compared to the Tiassalé-S line were considered differentially transcribed following insecticide selection.

Gene ontology terms enrichment. For each line, genes significantly over- and under-transcribed were subjected to a Gene Ontology term (GO-term) enrichment analysis using the functional annotation tool DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>⁶⁹). Reference gene list consisted in the 10,829 genes detected by RNA-seq. For each line, over- and under-expressed genes were considered separately and GO-terms showing a Fisher's Exact test P value < 0.05 were considered enriched as compared to the reference list.

Focus on resistance genes. Heat maps reflecting transcription profiles of candidate genes (*i.e.* detoxification enzymes including cytochrome P450s, carboxy/cholinesterases; transferases; ABC-transporters; cuticle proteins; redox enzymes and nervous receptors) across all lines were generated using TM4 MeV⁷⁰. Genes previously associated with resistance to insecticides used in vector control were identified based on existing literature^{15,53,71,72}. Because neonicotinoid resistance mechanisms have been poorly investigated in *An. gambiae*, orthologous genes to those conferring neonicotinoid resistance in other insect species were identified by protein sequence homology using NCBI BlastP against AgamP4 proteins with default parameters. Only *An. gambiae* genes showing a protein homology score ≥ 300 (E value ≤ 1E-95) to known neonicotinoid resistance genes were retained (see Supplementary Table S8).

Polymorphism calling. Polymorphisms were called using strand NGS V 3.2 against all protein-coding genes of the AgamP4 assembly using standard parameters (ignore homopolymer stretches greater than 4 bp and adjacent positions, coverage ≥ 30 and ≤ 5000, reads supporting the variant allele ≥ 2, base quality ≥ 20, variant confidence score ≥ 200 and strand bias ≤ 25). Among variations passing these filters, only substitutions and indels were retained for further analyses. This calling and filtering strategy allowed detecting 166,220 polymorphisms

across all lines. The following genic effects were then computed based on AgamP4.12 annotation: synonymous coding, non-synonymous coding, start-lost, stop gained, stop-lost, frameshift coding, splice site, essential splice site, 5' UTR, 3' UTR, upstream (within 1500 bp of gene start), downstream (within 1500 bp of gene stop), near gene (within 100 bp of gene).

Selection signatures associated with insecticide selection. Selection signatures associated with insecticide selection were investigated using the 145,008 bi-allelic SNPs (substitutions or indels) that were polymorphic (i.e. showing $\geq 5\%$ allele frequency variation between the Tiassalé-S line and any selected line). A first approach consisted in comparing the mean allele frequency of each SNP between each selected line and the Tiassalé-S line across the four replicates using a Student's test followed with a Benjamini and Hochberg multiple testing correction⁶⁸. SNPs showing a mean frequency variation between any selected line and the Tiassalé-S line $\geq 50\%$ in either direction and a corrected P value ≤ 0.001 were considered as associated with insecticide selection (Differential SNPs). A second approach consisted in assessing F_{ST} departure from neutrality using the Bayesian method implemented in BayeScan version 2.1⁷³. A separated analysis was performed for each selected line consisting in contrasting the selected line versus the Tiassalé-S line across all replicates. Default settings were used except that prior odd was set to 1000 in order to increase stringency. Genes showing a BayScan Q-value of zero were considered as 'Outliers'. For each selected line, the proportions of 'Differential SNPs' and 'Outlier SNPs' per gene were computed and plotted along chromosomes using gene centers as genomic coordinates.

Impact of clothianidin selection on the CYP6M locus. The association of *CYP6M1*, *CYP6M2* and *CYP6M3* with clothianidin resistance were further studied at generation G31 using RT-qPCR. These genes were chosen based on their RNA-seq expression profile, selection signature and their potential role in insecticide resistance. For each gene the following conditions were compared: Tiassalé-S unexposed (Tiassalé-S); Clothia-R unexposed (Clothia-R); Clothia-R surviving clothianidin exposure (Clothia-R surv); Clothia-R exposed to the P450 inhibitor piperonyl butoxide PBO (Clothia-R PBO +); Clothia-R pre-exposed to PBO and surviving clothianidin exposure (Clothia-R PBO + surv). PBO exposure consisted in exposing batches of 25 mosquitoes to 4% PBO for 1 h in glass bottles as described in²⁸. Clothianidin exposure consisted in exposing batches of 25 mosquitoes for 1 h to the same dose of clothianidin used for selection (0.45 $\mu\text{g/mL}$). Mosquitoes from all conditions were sampled at 72 h post clothianidin exposure (6-days old). Such recovery time allowed considering the slow effect of clothianidin together with minimizing gene induction/repression effects that may follow insecticide exposure. For each condition, total RNA was extracted from four pools of 12 to 20 mosquitoes using Trizol (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Two μg total RNA were treated with DNase I (Invitrogen) and reverse transcribed using superscript III (Invitrogen) and Oligo DT₂₀ primer according to manufacturer's instructions. cDNA samples were then diluted to 1/100 for qPCR amplification. Each sample was amplified as three PCR replicates. Quantitative PCR reactions were performed on a CFX qPCR system (Bio-Rad). Each qPCR reaction contained 12.5 μL iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.75 μL of each primer (10 μM each), 6 μL nuclease-free water and 5 μL diluted cDNA template. PCR cycles were as follows: 95 °C 3 min followed by 40 cycles consisting of 95 °C for 15 s and 30 s at 60 °C. Specific primer pairs were used for each gene (see Supplementary Table S8) and amplification specificity was verified by melt curve analysis. Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_t$ method taking into account PCR efficiency⁷⁴ using the gene encoding the ribosomal protein S7 (AGAP010592) as control. Results were expressed as mean transcription fold change ($\pm$ SD) across the four biological replicates as compared to unexposed Tiassalé-S individuals. Differences across conditions were tested using an ANOVA across all conditions followed by Fischer tests between pairs of conditions ($N = 4$). **AQ1**

Differential SNPs impacting *CYP6M1* (AGAP008209) were further examined. Amino acid changes resulting from differential non-synonymous SNPs were mapped to CYP6M1 protein sequence and aligned using ClustalW against the protein sequence of four CYP6s known to metabolize neonicotinoids: *Drosophila melanogaster* CYP6G1^{39–41}, *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ⁴², *Nilaparvata lugens* CYP6ER1⁷⁵ and *Aedes aegypti* CYP6BB2³⁸. P450 substrate recognition sites (SRS) were identified from protein alignment as defined from CYP3A4 structure⁷⁶. The impact of amino acid changes selected by clothianidin on CYP6M1 structure and clothianidin docking was then investigated by comparing the protein models obtained for the two distinct CYP6M1 variants identified in the Tiassalé-S and Clothia-R lines. For each variant, the amino acid sequence used for protein modelling differed by the 11 amino acid changes showing a differential frequency higher than 50% (see Supplementary Fig. S9). CYP6M1 protein models were computed by the SWISS-MODEL server using the crystallized human P450 CYP3A4 as template (protein Accession 5VCD). The Rosetta algorithm was then used to refine protein structure and to compute the most probable positions for the heme and clothianidin in the active site of each variant according to Rosetta-computed force fields⁷⁷. The volume of the binding pockets of each variant was estimated using POVME 2.0⁷⁸.

Data availability

RNA-seq sequence data reported in this study have been deposited to the European Nucleotide Archive (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession numbers PRJEB44777. The other datasets used and/or analyzed during the current study are available as supplementary information and/or from the corresponding author on reasonable request.

Received: 29 June 2021; Accepted: 20 September 2021

References

1. WHO. *World Malaria Report*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721> (2019).
2. Benelli, G. & Beier, J. C. Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Trop.* **174**, 91–96 (2017).
3. Okumu, F. & Moore, S. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: A review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar. J.* **10**, 208 (2011).
4. Padonou, G. G. *et al.* Impact of three years of large scale indoor residual spraying (IRS) and insecticide treated nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasites Vectors* **5**, 72 (2012).
5. Maharaj, R., Mthembu, D. J. & Sharp, B. L. Impact of DDT re-introduction on malaria transmission in KwaZulu-Natal. *S. Afr. Med. J.* **95**(11), 871–874 (2005).
6. Coleman, M., Casimiro, S., Hemingway, J. & Sharp, B. Operational Impact of DDT Reintroduction for Malaria Control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *J. Med. Entomol.* **45**(5), 885–890 (2008).
7. Ranson, H. & Lissenden, N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: A worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol.* **32**(3), 187–196 (2016).
8. Nkya, T. E., Akhouayri, I., Kisinza, W. & David, J. P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 407–416 (2013).
9. Liu, N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research. *Ann. Rev. Entomol.* **60**, 537–559 (2015).
10. Djègbè, I. *et al.* molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. *Parasites Vectors* **7**, 409 (2014).
11. Yahouédo, G. A. *et al.* Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasites Vectors* **9**, 385 (2016).
12. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F. & Berge, J. B. Devonshire AL (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* **7**, 179–184 (1998).
13. Ranson, H. *et al.* 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**(5), 491–497 (2000).
14. David, J. P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A. & Paine, M. J. I. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120429 (2013).
15. Riveron, J. M. *et al.* Insecticide resistance in malaria vectors: An update at a global scale. In *Towards Malaria Elimination: A Leap Forward* (eds Mangin, S. & Dev, V.) (Intechopen, 2018).
16. Fossog Tene, B. *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* **8**(4), e61408 (2013).
17. Yahouédo, G. A. *et al.* Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* **7**, 11091 (2017).
18. Ingham, V. A., Wagstaff, S. & Ranson, H. Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. *Nat. Commun.* **9**, 5282 (2018).
19. Darriet, F. & Chandre, F. Combining piperonyl butoxide and dinotefuran restores the efficacy of deltamethrin mosquito nets against resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **48**(4), 952–955 (2011).
20. Ihara, M. *et al.* Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *J. Pestic. Sci.* **31**(1), 35–40 (2006).
21. Ngufor, C., Fongnikin, A., Rowland, M. & N'Guessan, R. Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.l. in southern Benin. *PLoS ONE* **12**(12), e0189575 (2017).
22. Agossa, F. R. *et al.* Efficacy of a novel mode of action of an indoor residual spraying product, SumiShield® 50WG against susceptible and resistant populations of *Anopheles gambiae* (s.l.) in Benin, West Africa. *Parasites Vectors* **11**, 293 (2018).
23. Oxborough, R. M. *et al.* Susceptibility testing of *Anopheles* malaria vectors with the neonicotinoid insecticide clothianidin; results from 16 African countries, in preparation for indoor residual spraying with new insecticide formulations. *Malar. J.* **18**, 264 (2019).
24. Fuseini, G., Phiri, W. P., von Fricken, M. E., Smith, J. & Garcia, G. A. Evaluation of the residual effectiveness of Fludora™ fusion WP-SB, a combination of clothianidin and deltamethrin, for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Acta Trop.* **196**, 42–47 (2019).
25. Fongnikin, A. *et al.* Efficacy of Fludora® Fusion (a mixture of deltamethrin and clothianidin) for indoor residual spraying against pyrethroid-resistant malaria vectors: Laboratory and experimental hut evaluation. *Parasites Vectors* **13**, 466 (2020).
26. Agossa, F. R. *et al.* Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora® Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa. *Malar. J.* **17**, 484 (2018).
27. Chouaibou, M. S. *et al.* Evidence of insecticide resistance selection in wild *Anopheles coluzzii* mosquitoes due to agricultural pesticide use. *BMC Infectious Disease of Poverty*. **8**, 64 (2019).
28. Fouet, C. *et al.* Resistance of *Anopheles gambiae* to the new insecticide clothianidin associated with unrestricted use of agricultural neonicotinoids in Yaounde, Cameroon. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.08.06.239509> (2020).
29. Ford, K. A. & Casida, J. E. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res Toxicol.* **19**(11), 1549–1556 (2006).
30. Korzekwa, K. Enzyme kinetics of oxidative metabolism: Cytochromes P450. *Methods Mol Biol.* **1113**, 149–166 (2014).
31. WHO. Prequalification Team Vector Control Decision Document Fludora Fusion. 2018; <https://extranet.who.int/pqweb/vector-control-product/fludora-fusion>
32. Edi, C., Koudou, B. G., Jones, C. M., Weetman, D. & Ranson, H. Multiple-insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, southern Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis.* **18**(9), 1508–1511 (2012).
33. Edi, C. V. *et al.* CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet.* **10**(3), e1004236 (2014).
34. Mohammed, B. R., Malang, S. M., Kawe, S., Agbede, R. I. S. & Finn, R. D. Cytochrome P450s in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and insecticide resistance in Africa: A mini review. *Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res.* **6**, 3 (2017).
35. Contreras-Perera, Y. *et al.* Impact of deltamethrin selection on kdr mutations and insecticide detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* from Mexico. *Parasites Vectors* **13**, 224 (2020).
36. Chandre, F. *et al.* Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* **14**, 81–88 (2000).
37. Shi, L. *et al.* Development of resistance to pyrethroid in *Culex pipiens pallens* population under different insecticide selection pressures. *Plos Negl. Trop. Dis.* **9**(8), e0003928 (2015).
38. Riaz, M. A. *et al.* Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquat. Toxicol.* **126**, 326–337 (2012).
39. Joußen, N., Heckel, D. G., Haas, M. & Schuphan, I. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest. Manage. Sci.* **64**, 65–73 (2008).
40. Sparks, T. C. *et al.* Differential metabolism of sulfoximine and neonicotinoid insecticides by *Drosophila melanogaster* monooxygenase CYP6G1. *Pestic. Biochem. Physiol.* **103**(3), 159–165 (2012).

41. Le Goff, G. *et al.* Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **33**(7), 701–708 (2003).
42. Karunker, I. *et al.* Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **39**(10), 697–706 (2009).
43. Bass, C. *et al.* Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**(48), 19460–19465 (2013).
44. Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S. & Nauen, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **121**, 78–87 (2015).
45. Hamada, A., Stam, L., Nakao, T., Kawashima, M. & Banba, S. Differential metabolism of neonicotinoids by brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, CYP6ER1 variants. *Pestic. Biochem. Physiol.* **165**, 104538 (2020).
46. Matsuda, K., Ihara, M. & Sattelle, D. B. Neonicotinoid insecticides: Molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 241–255 (2020).
47. Perrier, S. *et al.* Compensatory mechanisms in resistant *Anopheles gambiae* AcerKis and KdrKis neurons modulate insecticide-based mosquito control. *Commun. Biol.* **4**, 665 (2021).
48. List, O. *et al.* Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J. Neurochem.* **130**(4), 507–513 (2014).
49. Ranson, H. *et al.* Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **359**(2), 295–304 (2001).
50. Chiu, T.-L., Wen, Z., Rupasinghe, S. G. & Schuler, M. A. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(26), 8855–8860 (2008).
51. Balabanidou, V. *et al.* Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**(33), 9268–9273 (2016).
52. Kefi, M. *et al.* Two functionally distinct CYP4G genes of *Anopheles gambiae* contribute to cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **110**, 52–59 (2019).
53. Corbel, V. & Guesson, R. N. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: A pragmatic review. In *Anopheles mosquitoes: New insights into Malaria vectors* (ed. Mangin, S.) (Intechopen, 2013).
54. Zaim, M., Aitio, A. & Nakashima, N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med. Vet. Entomol.* **14**(1), 1–5 (2000).
55. Hougard, J.-M. *et al.* Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Côte d'Ivoire. *Bull. Entomol. Res.* **93**(6), 491–498 (2003).
56. Turner, J. A., Ruscoe, C. N. E. & Perrior, T. R. Discovery to development: Insecticides for malaria vector control. *Chimia (Aarau)*. **70**(10), 684–693 (2016).
57. Nwane, P. *et al.* Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations in Cameroon: Spread of the L1014F and L1014S mutations. *BMC Res Notes*. **4**(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-463> (2011).
58. Fryxell, R. T. *et al.* The knockdown resistance mutation and knockdown time in *Anopheles gambiae* collected from Mali evaluated through a bottle bioassay and a novel insecticide-treated net bioassay. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **28**(2), 119–122 (2012).
59. Nauen, R. & Denholm, I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **58**(4), 200–215 (2005).
60. Wei, X. *et al.* Cross-resistance pattern and basis of resistance in a thiamethoxam-resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pestic. Biochem. Physiol.* **138**, 91–96 (2017).
61. Ma, K. *et al.* Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pestic. Biochem. Physiol.* **157**, 204–210 (2019).
62. Chouaibou, M. S. *et al.* Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Côte d'Ivoire. *Malar J.* **15**, 426 (2016).
63. Camara, S. *et al.* Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (s.l.) from Côte d'Ivoire. *Parasites Vectors* **11**, 19 (2018).
64. WHO. *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*, Second edition. WHO Libr Cat Data Test. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511575/en/> (2016).
65. Collins, F. S. *et al.* Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science* **235**(4792), 1046–1049 (1987).
66. Bass, C., Nikou, D., Vontas, J., Williamson, M. S. & Field, L. M. Development of high-throughput real-time PCR assays for the identification of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **96**(2), 80–85 (2010).
67. Anders, S. *et al.* Differential expression analysis for sequence count data via mixtures of negative binomials. *Adv. Environ. Biol.* **7**(10), 2803–2809 (2010).
68. Benjamini, Y., Hochberg, Y. & Benjamini, Y. H. Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* **57**, 289–300 (1995).
69. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**(1), 1–13 (2009).
70. Saeed, A. I. *et al.* TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**(2), 374–378 (2003).
71. Nkya, T. E. *et al.* Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multi-generational study in controlled conditions. *Parasites Vectors*. **7**, 480 (2014).
72. Bonizzoni, M. *et al.* RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites Vectors* **8**, 474 (2015).
73. Foll, M. & Gaggiotti, O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* **180**(2), 977–993 (2008).
74. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**(3), 2002–2005 (2001).
75. Pang, R. *et al.* Functional analysis of CYP6ER1, a P450 gene associated with imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Sci. Rep.* **6**(1), 34992 (2016).
76. Gotoh, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* **267**(1), 83–90 (1992).
77. Lemmon, G. & Meiler, J. Rosetta ligand docking with flexible XML protocols. *Methods Mol. Biol.* **819**, 143–155 (2012).
78. Durrant, J. D., Votapka, L., Sørensen, J. & Amaro, R. E. POVME 2.0: An enhanced tool for determining pocket shape and volume characteristics. *J. Chem. Theory Comput.* **10**(11), 5047–5056 (2014).

Acknowledgements

We thank the Centre Suisse de la Recherche Scientifique (CSRS) de Côte d'Ivoire for providing the Tiassalé mosquito line. We thank Fabrice Chandre, Pierrick Labbé, Muriel Raveton, Frederic Boyer and Vincent Corbel for useful comments on the study design and the interpretation of results. We also thank Thierry Gaude for providing technical assistance in mosquito rearing and blood feeding.

Author contributions

M.G.Z. contributed to study design, conducted experiments, contributed to data analysis and drafted the manuscript. J.M.B. contributed to RNA-seq data analysis and contributed to manuscript writing. J.T. provided technical help for mosquito rearing, bioassays and molecular work. F.L. provided technical help for molecular work. M.C., C.S. and B.K.F. provided the initial Tiassalé line and contributed to experiment design. J.M., F.S. and S.H. contributed to study design and funding acquisition. S.R. and J.P.D. conceived the study, analyzed data and wrote the manuscript. J.P.D. coordinated the study.

Competing interests

The funder (Bayer) has developed and commercialized a product based on the combination of insecticides used within this study and proposed the original hypothesis to be tested. The funder had no role in the study design, data collection, analysis and interpretation of results. JM, FS and SH were employed by Bayer. MGZ PhD was funded by Bayer and hosted at the Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA). JT position was funded by Bayer and hosted at LECA. All other authors declare no conflict of interest.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99061-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-P.D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

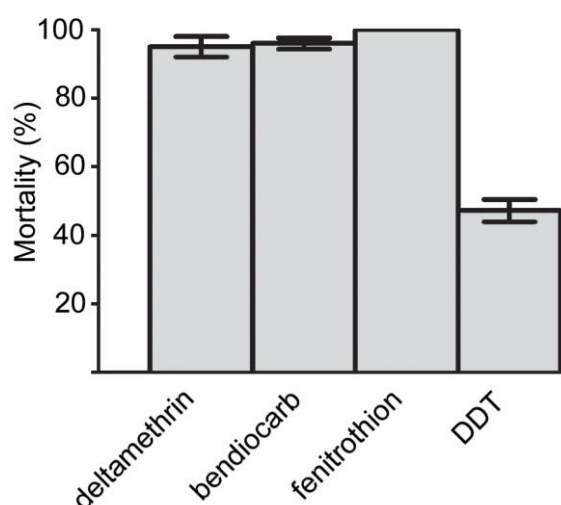
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Supplementary Fig. S1. Resistance of the parental Tiassalé-S line to insecticides commonly used for vector control. Insecticide susceptibility tests were performed using WHO test tubes equipped with papers impregnated with 0.05% deltamethrin, 0.5% bendiocarb, 1% fenitrothion and 4% DDT. Mortality rates are expressed as mean mortality $\pm$ 95% Wald confidence interval.



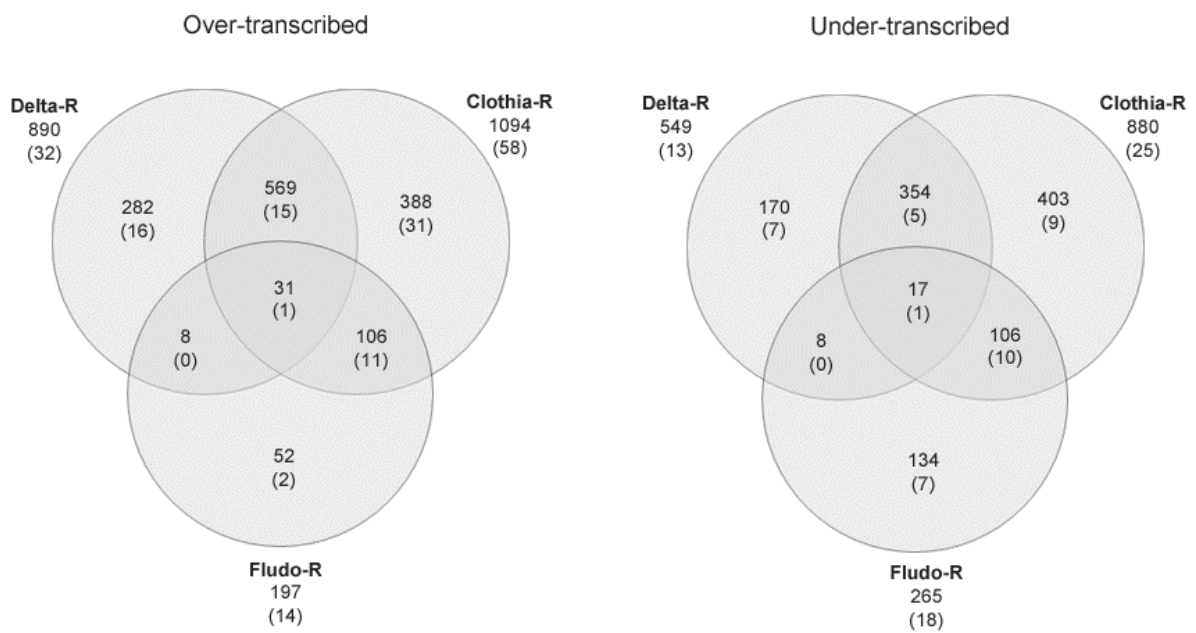
Supplementary Table S2. Ace1 genotyping data

Lines	Susceptible (119GG)	Heterozygote (119GS)	Resistant (119SS)	N	f(GG)	f(GS)	f(SS)	Chi2 P value ¹	f(S)	Chi2 P value ¹
Tiassale-S G0	22	1	2	25	78,6	3,6	7,1	-	0,10	-
Delta-R G17	27	2	1	30	90,0	6,7	3,3	0,695 (ns)	0,07	0.73 (ns)
Clothia-R G17	21	8	0	29	70,0	27,6	0,0	0,028 (*)	0,14	0.565 (ns)
Fludo-R G17	25	4	1	30	86,2	13,8	3,4	0,389 (ns)	0,10	1 (ns)

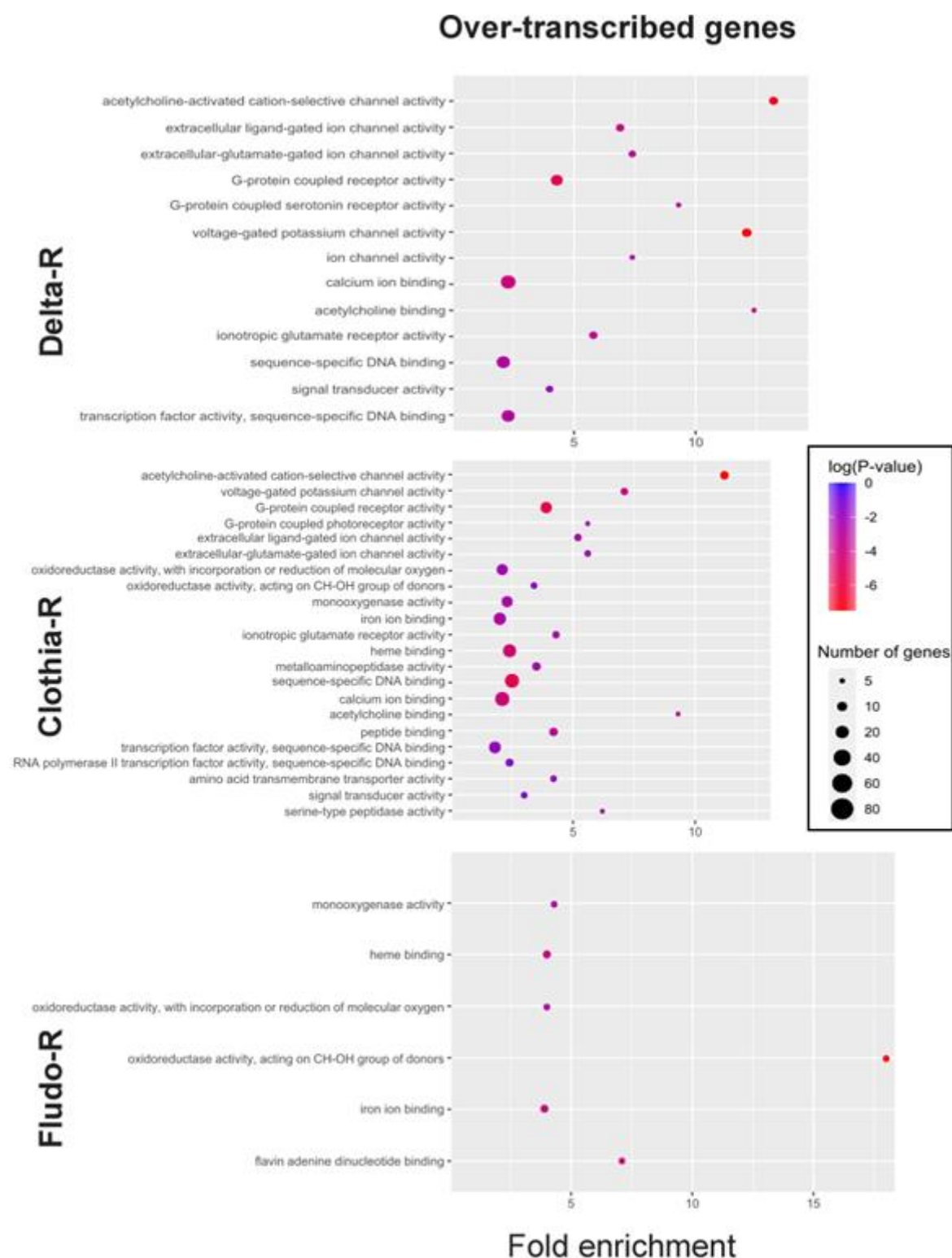
¹ Chi² tests between each selected line at G17 and the Tiassale-S line at G0 were performed on raw genotype and frequency data. ns: P > 0.05, * P < 0.05.

Supplementary Table S3. Transcription data obtained for all genes detected by RNA-seq. See separated supplementary file.

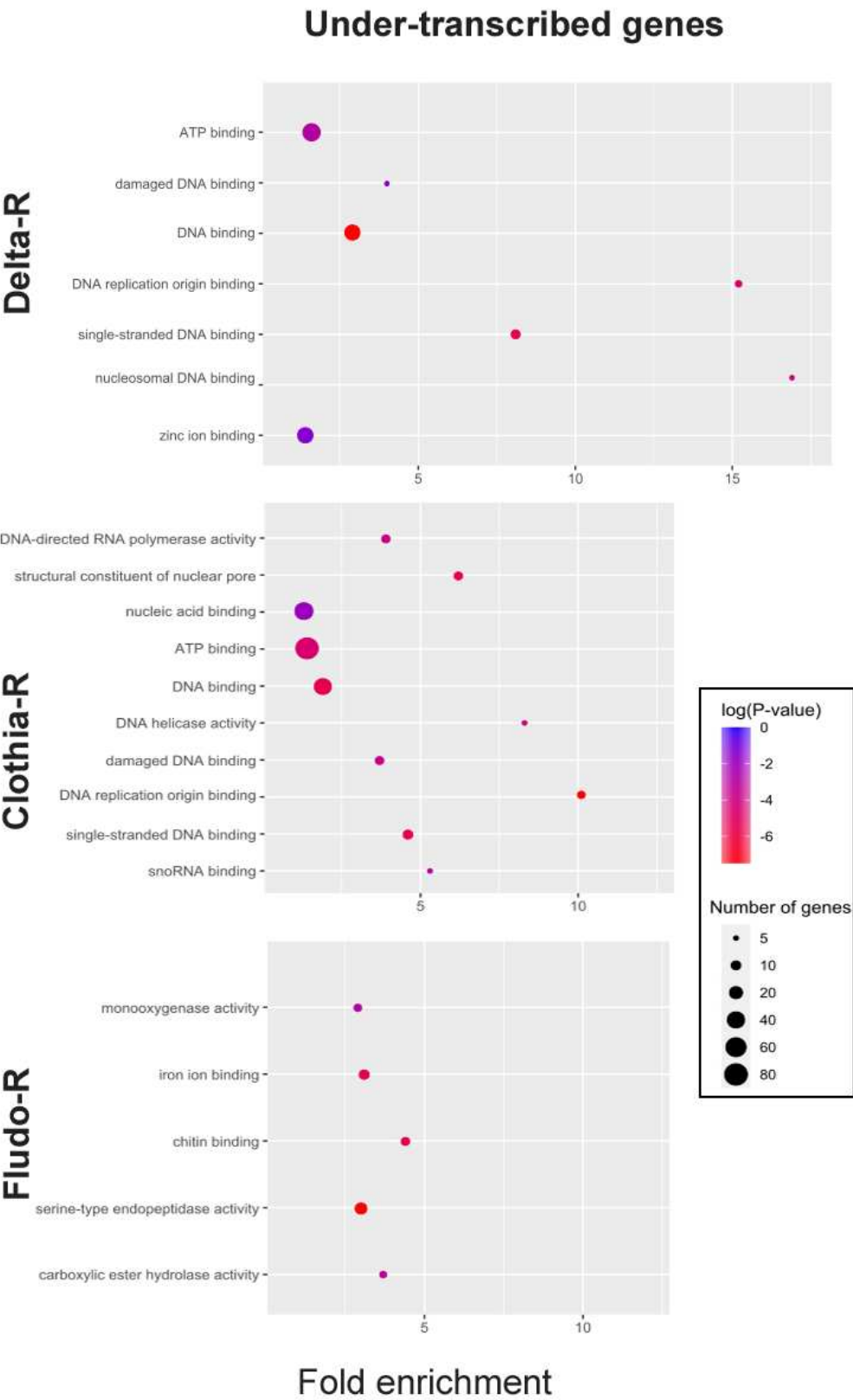
Supplementary Fig. S4. Overview of genes differentially transcribed in the three selected lines. The number of genes is indicated for each line. Numbers within brackets refer to candidate genes potentially involved in insecticide resistance (see methods).



Supplementary Fig. S5. Overview of GO term enrichment analysis. Functional pathways enrichment analyses were based on genes significantly over- and under-transcribed in each selected line as compared to Tiassalé-S line using DAVID functional annotation tool (modified Fisher's exact test with $P < 0.05$). Only GO terms from the « biological process » family showing an enrichment associated with a P value < 0.05 and a minimum number of 9 genes are shown. Fold-enrichment (x axis), P value (color scale) and class size (dote size) are indicated.

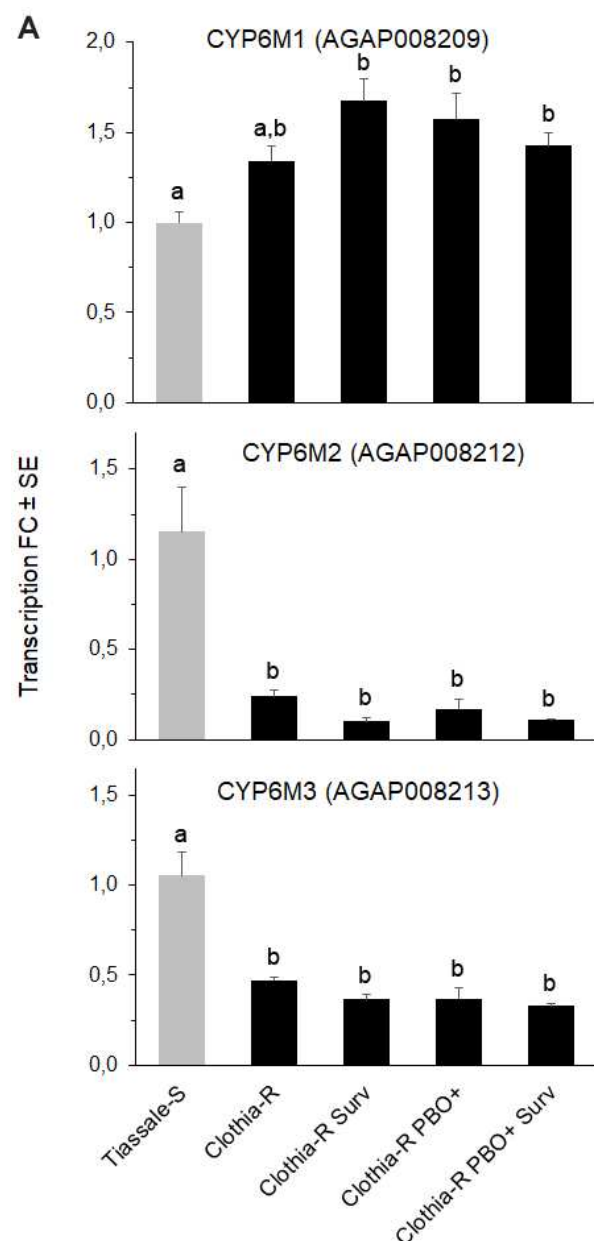


Supplementary Fig. S5 (continued)



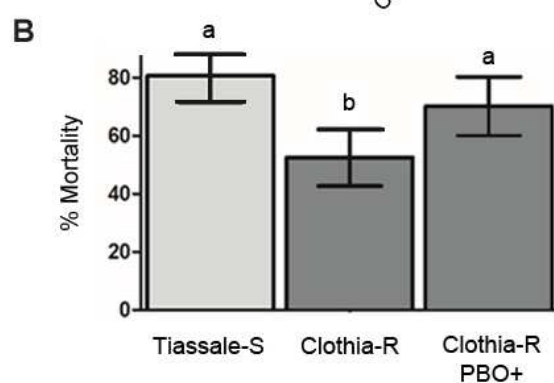
Supplementary Table S6. SNPs data obtained from RNA-seq. Only genes containing polymorphic SNPs are shown. See separated supplementary file.

Supplementary Fig. S7. Association of *CYP6M* genes transcription levels with clothianidin resistance.



A: Transcription profiles of *CYP6M* genes in the following conditions: Tiassalé-S unexposed (Tiassalé-S); Clothia-R unexposed (Clothia-R); Clothia-R surviving to clothianidin exposure (Clothia-R Surv); Clothia-R exposed to PBO (Clothia-R PBO+); Clothia-R exposed to PBO and surviving to clothianidin exposure (Clothia-R PBO+ Surv). Mosquitoes from all conditions were sampled at the same time corresponding to 72h after clothianidin exposure (6-days old). Transcription profiles were obtained by RT-qPCR using four biological replicates per condition. Letters indicate significance between pairs of conditions ($P < 0.05$).

B: Effect of PBO pre-exposure on the survival of Clothia-R individuals to clothianidin. Mosquitoes were exposed to 4% PBO for 1h prior exposure to 0.45 $\mu\text{g/mL}$ clothianidin for 1h. Mortality was recorded 72h after exposure. Letters indicate significance between conditions ($P < 0.05$).



Supplementary Table S8. *An. gambiae* genes showing high protein homology with genes conferring resistance to neonicotinoids in other insect species.

Species	Gene name	References	Degree of evidence	<i>An. gambiae</i> orthologs (BlastP score)
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>CYP6G1</i>	Joußen et al 2008; Sparks et al 2012; Le Goff et al 2003	Confers resistance to neonicotinoids in transgenic flies, metabolizes imidacloprid	CYP6P1 (320), CYP6P4 (318), CYP6P3 (315), CYP6M3 (312), CYP6Y2 (300)
	<i>CYP12D1</i>	Le Goff et al 2003	Confers resistance to neonicotinoids in transgenic flies	CYP12F1 (372)
	<i>CYP6A8</i>	Le Goff et al 2003	Confers resistance to neonicotinoids in transgenic flies	CYP6M4 (460), CYP6M3 (459), CYP6Y1 (456), CYP6P4 (446), CYP6Y2 (428), CYP6M1 (425), CYP6P3 (416), CYP6P1 (390) CYP6AA2 (373), CYP6Z2 (302), CYP6Z3 (300)
<i>Bemisia tabaci</i>	<i>CYP6CM1</i>	Karunker et al 2009	Confers resistance to neonicotinoids, metabolizes imidacloprid	CYP6M3 (309)
<i>Myzus persicae</i>	<i>CYP6CY3</i>	Bass et al 2013	Confers resistance to neonicotinoids in transgenic flies, metabolizes imidacloprid in vitro	CYP6M4 (376), CYP6Y1 (373), CYP6M3 (354), CYP6Y2 (353), CYP6P3 (351), CYP6P4 (350), CYP6M1 (342), CYP6AA2 (313), CYP6P1 (304)
<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>CYP6ER1</i>	Pang et al 2016, Bao et al 2016, Hamada et al 2020,	Confers resistance to neonicotinoids in transgenic flies, metabolizes imidacloprid in vitro	CYP6M3 (313), CYP6P4 (301)
	<i>CYP6AY1</i>	Bao et al 2016	Confers resistance to neonicotinoids, metabolizes imidacloprid in vitro	CYP6M3 (385), CYP6M4 (385)
<i>Aedes aegypti</i>	<i>CYP6BB2</i>	Riaz et al 2012	Associated with resistance to neonicotinoids and imidacloprid metabolism	CYP6P4 (576), CYP6P3 (554), CYP6P1 (498), CYP6M3 (469), CYP6M4 (450), CYP6Y2 (414), CYP6Y1 (406), CYP6M1 (390), CYP6AA2 (372), CYP6Z2 (322), CYP6Z3 (310), CYP6Z1 (304)
	<i>CYP6N12</i>	Riaz et al 2012	Associated with resistance to neonicotinoids and imidacloprid metabolism	CYP6M3 (588), CYP6M4 (561), CYP6Y1 (523), CYP6Y2 (520), CYP6M1 (516), CYP6P4 (510), CYP6P3 (489), CYP6P1 (452), CYP6AA2 (416), CYP6Z2 (352), CYP6Z3 (347), CYP6Z1 (339)

Supplementary Table S9. Primers used for RT-qPCR.

Target gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Product length (bp)
RPS7 (AGAP010592)*	TTCAACAACAAGAAGGCGATCA	ACGGGTCTGTACCTTCTGGA	149
CYP6M1 (AGAP008209)	TTTTGAAAGAATCCCTACGCAAG	GCTCGGGAATAGACTCGCA	162
CYP6M2 (AGAP008212)	GCACAACGGAGAGATGTCGT	TGCGCAGTGATTCAATTAAGAATTTG	77
CYP6M3 (AGAP008213)	GAGACATCTTCCACGCTGCT	TGCGAAGACTCTCCTTCAGT	178

* housekeeping gene used for normalization

Supplementary Fig. S9. Amino acid sequence of the two CYP6M1 variants identified in the Tiassalé-S and Clothia-R lines and used for protein modelling. For each variant, the amino acids in grey boxes differed by more than 50% frequency as compared to the reference genome AgamP4.12 sequence (AGAP008209). Amino acids in red are those supported by an allele frequency variation >50% between the Tiassalé-S line and the Clothia-R line.

An. gambiae CYP6M1 (Tiassalé-S line)

MWFPTIEVLVALLALLGGAVYFIVRKQSYWKERG**V**PHPKPTFFFGSFKDAGTKIHFTEEVERHY**AI**YKGKHPFIGVY**ML**TTTPV
 VLPLDLELIKAIFVKDFQYFHDRGTYYNEKHDPLTAHLFNLEGQKWRNLRNKMTPTFTSGKMKMMFPTVVAAGQQLRDFMEEN
 VQKH**G**EMELKDVMARYTTDVIGTCAFGIECNMRDPDAEFRAMGKLF**M**ERQPSQFVNMMVQFSPKLSRLLGIR**F**IDKEV**S**AFF
 LKVVRDTIDYRV**K**NGIQRNDFMDLMIRMLQNTENPEEALT**F**NEVAAQAFVFFFAGFETSSTLLTWTL**Y**ELALNPEVQEKGRQC
 VQEVLAHNGEMTY**D**AI**H**DMKYLDQILKESLRKYPPVPLHFR**MTA**QNYRVDPDTSVIEAGT**ML****F**IP**I**F**S**IQRDASLFPEPEKEF
 DPERFSAAAAAKRHPFAWTPFGEGPRVCIGLRFGMMQARIGLAYLLQGF**S**FAPYEKTSIPMKFITNSFILGPREGWLKVNKL
 ESKQG

An. gambiae CYP6M1 (Clothia-R line)

MWFPTIEVLVALLALLGGAVYFIVRKQSYWKERG**I**PHPKPTFFFGSFKDAGTKIHFTEEVERHY**AL**YKGKHPFIGVY**LL**TTTPV
 VLPLDLELIKAIFVKDFQYFHDRGTYYNEKHDPLTAHLFNLEGQKWRNLRNKMTPTFTSGKMKMMFPTVVAAGQQLRDFMEEN
 VQKH**D**EMELKDVMARYTTDVIGTCAFGIECNMRDPDAEFRAMGKLF**D**RQPSQFVNMMVQFSPKLSRLLGIR**L**IDKEV**S**AFF
 LKVVRDTIDYRV**K**NGIQRNDFMDLMIRMLQNTENPEEALT**F**NEVAAQAFVFFFAGFETSSTLLTWTL**Y**ELALNPEVQEKGRQC
 VQEVLAHNGEMTY**E**AI**H**EMKYLDQILKESLRKYPPVPLHFR**TT****S**QNYRVDPDTSVIEAGT**ML****L**IP**I**F**A**IQRDASLFPEPEKEF
 DPERFSAAAAAKRHPFAWTPFGEGPRVCIGLRFGMMQARIGLAYLLQGF**S**FAPYEKTSIPMKFITNSFILGPREGWLKVNKL
 ESKQG

Chapitre 3. Impact des polluants agrochimiques sur la réponse d'*An. gambiae* à Fludora® Fusion et à ses différents composants³

Publication II:

Titre: Exposure of *Anopheles gambiae* larvae to agrochemical pesticides found in breeding sites induces tolerance of adults to Fludora® Fusion and to its neonicotinoid component.

Auteurs: Marius Gonse Zoh¹, Jordan Tutagana¹, Behi K. Fodjo², Mouhamadou Chouaïbou², Christabelle G. Sadia², Justin McBeath³, Frederic Schmitt⁴, Sebastian Horstmann⁵, Jean-Philippe David¹ and Stéphane Reynaud^{1*}

Status : draft du manuscrit

Contribution personnelle : J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations, participé aux analyses présentées dans cet article, à la rédaction de l'article et à la mise en forme des figures.

3.1. Contexte scientifique

L'agriculture représente un secteur économique assez important en Afrique dont le succès et la rentabilité sont associés à l'utilisation de nombreux produits agrochimiques. Ces produits appartiennent pour la plupart à 3 familles de pesticides incluant les herbicides, les insecticides et les fongicides. Une étude menée dans une zone potentiellement liée aux activités agricoles dans le sud de la Côte d'Ivoire, a révélé la présence de nombreuses molécules déjà utilisées en santé publique dans les gîtes de reproductions des anophèles. Ces molécules comprenaient entre autres des pyréthrinoides, des carbamates, du DDT ainsi que d'autres molécules telles que les néonicotinoïdes, l'atrazine et le glyphosate (Chouaïbou et al. 2016). La présence de ces molécules agrochimiques dans les gîtes de reproduction des moustiques a sans doute une conséquence sur leur réponse aux insecticides chimiques utilisés en lutte antivectorielle.

³ Les figures et leurs légendes associées sont insérées à la fin du manuscrit

En effet, il a été démontré que les xénobiotiques présents dans les gîtes de reproduction des moustiques pouvaient affecter leur système de détoxification et conduire à une augmentation de leur tolérance aux insecticides (Poupardin et al. 2008 ; Riaz et al. 2009 ; Suwanchaichinda & Brattsten 2001). Par exemple, Riaz et al. (2009) ont montré que l'exposition de larves d'*Ae. aegypti* à une dose sub-létale de glyphosate et de benzo[a]pyrène, augmentait leur tolérance à l'imidaclopride et à la perméthrine. De même, l'exposition de larves d'*Ae. aegypti* à une dose sub-létale de sulfate de cuivre, fréquemment utilisé en agriculture comme fongicide, pouvait conduire à une tolérance accrue à la perméthrine (Poupardin et al. 2010, 2008). Dans ces études, l'augmentation de la tolérance des moustiques exposés aux polluants a été fréquemment associée à la sur-transcription de multiples gènes codant pour des enzymes de détoxification, des protéines cuticulaires et des transporteurs de xénobiotiques (David et al. 2010 ; Poupardin et al. 2010). Plus récemment, l'exposition des larves de *An. gambiae* à des substances phytochimiques a révélé une induction significative de transcrits principalement associés aux protéines cuticulaires et aux enzymes de détoxification (Mang'era et al. 2021).

Ainsi, même si les effets des xénobiotiques sur la tolérance larvaire des moustiques sont bien documentés, leurs effets sur la tolérance aux insecticides chez les adultes parfois observés dans les expérimentations restent encore mal documentés. Il s'avère donc important de tester l'effet des produits agrochimiques, fréquemment présents dans les gîtes larvaires des vecteurs du paludisme en Afrique, sur l'efficacité du mélange Fludora® Fusion et de ses différents composants chez les adultes. En effet ce phénomène pourrait avoir un impact sur l'efficacité de cette formulation et plus largement sur la lutte antivectorielle.

3.2. Objectifs de l'étude et approches utilisées

Dans ce contexte, la question de l'impact de l'exposition des larves d'anophèles aux résidus de pesticides présents dans les gîtes de reproduction sur la tolérance des adultes au mélange Fludora® Fusion et à ses différents constituants a été abordée. Nous avons choisi d'aborder cette question au laboratoire à l'aide d'une expérimentation permettant un contrôle de la durée d'exposition mais également de la nature et de la dose des pesticides utilisés. De manière à simuler une contamination diffuse des gîtes larvaires par de multiples molécules actives, nous avons utilisé un mélange de composés agrochimiques représentatifs d'une zone à forte activité agricole. Ce mélange était composé de différents **herbicides** [5.3ml.L⁻¹ Glyphader® (Glyphosate); 5.3 ml.L⁻¹ Garil® (amide; pyrimidine)] **fongicides** [5.3mL.L⁻¹ Banko plus® (chlorothalonil; Organophosphoré; carbendazime; Carbamates)] et **insecticides** ([3.125 ml.L⁻¹

Legumax® (deltaméthrine); 2.5ml.L⁻¹ K-Optimal® (lambdacyhalothrine, acetamipride); 1.5 ml.L⁻¹ Verso 480® (Chlorpyrifos-éthyl, Organophosphorés) et 66.7g.L⁻¹ Furadan® (carbamate)] régulièrement utilisés dans la localité de Tiassalé où les rizières sont largement représentées en bordure des gîtes à anopheles (Chouaïbou et al. 2016). Ce mélange à proportions égales a ensuite été dilué afin de simuler une contamination sub-létale des gîtes larvaires et de focaliser l'étude sur les effets plastiques associés au phénotype de résistance. En effet, l'effet de la sélection à long terme d'allèles de résistance au stade larvaire par les composés agrochimiques est actuellement étudié avec ce même mélange agrochimique dans le cadre de la thèse de Christabelle Sadia (CSRS, Côte d'Ivoire).

L'expérimentation mis en place a consisté à exposer 4 réplicas de 400 larves de stade 3 issues de la lignée Tiassalé-S (voir chapitre I) pendant 72h à une dose sub-létale du mélange de pesticides. Des larves non-exposées issues de la même lignée ont été utilisées comme contrôle. Afin d'obtenir une faible mortalité larvaire à l'issue de l'exposition (<15%), le mélange de pesticides a été dilué 100000 fois. A la suite de l'exposition larvaire, les nymphes ont été maintenues dans un milieu contaminé jusqu'à l'émergence des adultes. Des bio-essais comparatifs ont ensuite été réalisés sur les adultes (femelles âgées de 3-5 jours n'ayant pas reçu de repas sanguin) issus des larves exposées ou non afin d'évaluer l'impact de l'exposition sur la tolérance à la combinaison Fludora® Fusion ainsi qu'à ses deux composants (deltaméthrine et clothianidine). Pour chaque insecticide testé, une dose diagnostique engendrant une mortalité de 60-80% chez des individus non-exposés de la lignée Tiassalé-S a été utilisée. Une analyse comparative de l'effet de l'exposition au mélange agrochimique sur les niveaux de transcription des gènes a ensuite été réalisée par RNA-seq chez les larves de stade 4 ainsi que chez les adultes (femelles âgées de 3-5 jours n'ayant pas reçu de repas sanguin). Les niveaux de transcription entre les larves exposées et non exposées et entre les femelles adultes issues de ces larves ont été considérés comme différentiellement significative lorsque la valeur p ajustée était inférieure à 0,01 après correction des tests multiples.

3.3. Principaux Résultats

Les bio-essais comparatifs ont révélé une augmentation significative de la tolérance des individus issus des larves exposées au mélange agrochimique à la clothianidine (2.5 fois) et au mélange Fludora® Fusion (2.2 fois) (Figure 1 article 2). Bien qu'une légère augmentation de la tolérance à la deltaméthrine ait été également observée, celle-ci n'est pas apparue significative dans les conditions de notre expérimentation (N=4).

L'analyse transcriptomique par RNA-seq a permis de détecter 12852 gènes montrant un niveau d'expression détectable ($> 0,5$ RPKM) chez les larves et les femelles adultes. Plus de 3113 gènes ont montré un niveau de transcription différentiel ($P < 0,01$) chez les larves en association avec l'exposition (exposées versus contrôles). En comparaison, seulement 477 gènes ont été identifiés comme différemment transcrits ($P < 0,01$) chez les adultes issus des larves exposées comparativement aux adultes issus des larves non-exposées (contrôles). Enfin, 228 gènes ont été identifiés comme différemment transcrits dans les deux stades de vie dont 110 montraient une variation commune du niveau de transcription (sur-transcription ou sous-transcription chez les deux stades) (Supplementary, table1, article 2).

Les analyses d'enrichissement de fonctions (termes Gene Ontology, GO) réalisées sur les gènes sur-transcrits chez les larves exposées ont révélé un fort enrichissement des termes associé aux protéines cuticulaires. De manière inattendue, l'analyse d'enrichissement des gènes significativement sous-transcrits chez les larves, suite à l'exposition, a montré une légère surreprésentation des termes associés aux activités P450, GST et UDPGT (Supplementary, table 1, article 2). L'analyse d'enrichissement effectuée sur les gènes sur-transcrits chez les adultes n'a révélé aucun enrichissement significatif associé à des fonctions communément associées à la résistance aux insecticides (Supplémentary, tableau 3, article 2). Cependant, la même analyse effectuée sur les gènes sous-transcrits a montré un enrichissement significatif des termes GO associés à la cuticule et aux activités P450 (Supplémentary, tableau 4, article 2).

Une analyse détaillée des niveaux de transcription des familles géniques potentiellement associées aux mécanismes de résistance connus (enzymes de détoxification, protéines cuticulaires, transport et séquestration) a révélé des profils globaux de transcription distincts entre les larves et les femelles adultes (Figure 2, article 2). Chez les larves une sur-transcription de nombreux gènes potentiellement associés à la tolérance aux insecticides a été mise en évidence avec 91 gènes codant pour les protéines de la cuticule, onze gènes codant pour des P450s (familles CYP325, CYP6, CYP4, CYP301 et CYP307) ainsi que leurs partenaires redox (la NADPH cytochrome P450 réductase (CPR) et le cytochrome b5), deux gènes codant pour des COE (*COEAE50* et *COEJHE2E*), trois gènes codant pour des UGT / UDPGT (*AGAP007374*, *AGAP011564* et *UGT5A2*), deux pour des sulfotransférases (*AGAP012696* et *AGAP009551*) et enfin trois pour des transporteurs ABC (*ABCF2*, *ABCG3*, *ABCH3*). En plus des enzymes de détoxification et des transporteurs, l'exposition des larves au mélange de pesticides a entraîné une sur-transcription de gènes codants pour des protéines potentiellement

impliquées dans la séquestration des insecticides, notamment les protéines « sensory appendage » *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, les protéines chemosensorielles *CSP1* et *CSP5* ainsi que d'une protéine codant vraisemblablement pour un transporteur de cholestérol « Niemann-Pick type C1 » (*AGAP008137*). Enfin, quatre gènes codants pour des cibles des insecticides ont été identifiés comme sur-transcrits chez les larves exposées. Ces gènes incluent les sous-unités alpha 5, alpha 6 et bêta 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChr, cible des néonicotinoïdes), et le gène *Ace1* codant pour l'acétylcholinestérase (cible des organophosphorés et carbamates) (Figure 2, Article 2).

Chez les adultes, 7 gènes codants pour des protéines cuticulaires (dont *CPR144*, *CPR113*, *TWDL1*, *CPR111*, *CPR1*, *CPF2* et *CPF1*) ont été identifiés comme sur-transcrits chez les femelles de 3-5 jours issues des larves exposées au mélange agrochimique. Concernant les gènes codants pour des enzymes de détoxification et des transporteurs, l'analyse a révélé la sur-transcription de deux gènes codants pour des COE (*COE130* et *COE120*) et de deux gènes codant pour des transporteurs ABC (*ABCC11* et *ABCF3*). Enfin, nos données ont également révélé une sur-transcription de gènes codants pour des protéines impliquées dans la liaison aux insecticides comme l'hexamérine *AGAP001659*, la protéine Niemann-Pick C2 (*AGAP002851*) et la protéine « sensory Appendage » *SAP3* (Figure 2, article 2).

3.4. Discussion

Le développement larvaire des moustiques anophèles peut parfois s'effectuer dans des milieux contaminés par des xénobiotiques anthropiques ou naturels. De précédentes études ont démontré que les résidus de polluants y compris les pesticides agrochimiques présents dans les gîtes de reproduction des moustiques peuvent induire une augmentation significative de leurs tolérances à divers insecticides utilisés pour leur contrôle (Poupardin et al. 2010 ; Riaz et al. 2009 ; Suwanchaichinda and Brattsten 2001). Cependant, bien que l'effet des xénobiotiques sur la tolérance des vecteurs aux insecticides soit largement démontré chez les larves, le maintien de cet effet jusqu'à l'âge adulte reste encore mal décrit.

Dans cette étude, les bio-essais comparatifs entre les adultes femelles issus des larves exposées au mélange agrochimique et issues de larves non exposées n'ont pas révélé d'augmentation significative de tolérance à la deltaméthrine alors qu'une forte augmentation de tolérance à la clothianidine et au Fludora® Fusion a été observée. Cela suggère que

l'augmentation de la tolérance à Fludora® Fusion observée est principalement la conséquence de mécanismes affectant la tolérance à la clothianidine. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, une étude de transcriptomique comparative par RNA-seq entre les individus exposés ou non aux stades larvaires (immédiatement post exposition) et au stade adultes (femelles 3-5 jours) a été réalisée. Cette étude a révélé des profils de transcription différentielle contrastés entre larves et adultes suggérant un fort effet de l'exposition chez les larves mais des effets plus modérés chez les adultes potentiellement en lien avec des changements importants de niveaux de transcription entre les stades larvaire et adulte.

Il a été démontré que les xénobiotiques sont de bons inducteurs de certains gènes de détoxification chez les moustiques suggérant ainsi le rôle clé des enzymes de détoxification dans l'augmentation de la tolérance des larves de moustique aux insecticides chimiques suite à leur exposition (Poupardin et al. 2010). Les données de RNA-seq générées chez les larves exposées au mélange agrochimique ont révélé une sur-transcription marquée de nombreux gènes codant pour les protéines cuticulaires. Plusieurs de ces gènes incluant *CPAP3-A1b*, *CPLPX1*, *CPR127*, *CPR129*, *CPR30*, *CPLCG4*, *CPLG5* et *CPR131* ont déjà été identifiés comme sur-transcrits chez des populations d'anophèles résistantes aux insecticides (Awolola et al. 2009 ; Nkya et al. 2014 ; Yahouédo et al. 2017) suggérant que leur surexpression pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la tolérance observée. Récemment, la sur-transcription du gène *CPAP3-A1b* a été associée à la résistance à la clothianidine et au mélange Fludora® Fusion chez *An. gambiae* (voir chapitre I). Chez *Ae. aegypti*, la résistance au néonicotinoïde imidaclopride a également été associée à une sur-transcription marquée de certains gènes codants pour des protéines cuticulaires (Riaz et al. 2012). Les adultes issus des larves exposées ou non montrent des profils très différents au niveau des gènes codants pour les protéines cuticulaires, probablement en lien avec de fortes variations d'expression de ces gènes selon les stades et d'un important remaniement de leur expression lors de la phase nymphale (Poupardin et al., 2010). Néanmoins, une partie des protéines cuticulaires sur-transcrites chez ces adultes ont été également trouvées sur-transcrites chez les larves exposées suggérant que pour certaines d'entre elles, l'effet d'induction au stade larvaire peut se prolonger chez les adultes. Cependant, aucun de ces gènes n'a été précédemment associés à la résistance aux insecticides suggérant que les protéines cuticulaires sélectionnées par l'utilisation récurrente des insecticides ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui répondent à une exposition.

Concernant les enzymes de détoxification, bien que les analyses d'enrichissement de termes GO n'aient pas montré une réponse massive de ces enzymes, l'exposition des larves a néanmoins induit une sur-transcription de plusieurs gènes codants pour des cytochromes P450 ainsi que leurs partenaires redox, (la CPR et le cytochrome b5). Plusieurs des P450 sur-transcrits chez les larves, notamment *CYP6M3*, *CYP325A3*, *CYP4C27* et *CYP6AF1*, ont déjà été associés à la résistance aux insecticides (Antonio-Nkondjio et al. 2016 ; Atoyebi et al. 2020 ; David et al. 2005 ; Djouaka et al. 2008). De plus, la sur-transcription de *CYP6M3* et *CYP4C27* a aussi été associée à la résistance constitutive des femelles adultes à la clothianidine et au mélange Fludora® Fusion chez *An. gambiae* (voir chapitre I). Plusieurs autres gènes codants pour les COE et des enzymes de phase II ont été également sur-transcrits chez les larves. Parmi eux, le gène *COAE50* a également été associé à la résistance constitutive à la clothianidine et au mélange Fludora® Fusion chez *An. gambiae* (voir chapitre I). Seul deux carboxylestérases (*COE120* et *COE130*) ont été identifiées comme sur-transcrites chez les adultes. Bien que la surexpression de *COE130* ait précédemment été associée à une résistance au DDT (David et al. 2005), le métabolisme de la clothianidine par cette enzyme reste improbable. En effet, le métabolisme de la clothianidine semble reposer majoritairement sur une oxydation par les cytochromes P450 ou l'aldéhyde oxydase suivie d'une glucuronidation par des UDPGTs (Shi et al. 2009). Néanmoins, l'absence d'induction de la transcription des enzymes de détoxification chez les adultes, en particulier des gènes CYP, ne signifie pas pour autant que les protéines ne sont pas sur-exprimées. En effet, il a été montré que la durée de vie des cytochromes P450 in vivo est très variable de 40 à 140 h, (Grimm et al. 2009). Ainsi, il est possible que certains P450s induits au stade larvaire puissent conserver une surexpression protéique (non détectable par RNA-seq) chez les femelles adultes en lien avec leur tolérance accrue au mélange Fludora® Fusion et à la clothianidine.

Plusieurs gènes codants pour des protéines potentiellement impliquées dans le transport ou la séquestration des xénobiotiques pourraient également être impliqués dans le phénotype observé. Parmi eux, les transporteurs ABC ont déjà été associés à la résistance aux insecticides chez les moustiques (Pignatelli et al. 2017). Dans notre étude, six gènes codants pour les transporteurs ABC ont été montrés sur-transcrits chez les larves exposées aux mélanges de pesticides. Deux de ces gènes (*ABCG3* et *ABCH3*) ont été identifiés comme sur-transcrits chez la lignée Clothia-R résistante à la clothianidine (voir chapitre I). Chez les adultes, deux gènes codants pour les transporteurs ABC (*ABCG15* et *ABCC11*) ont également été sur-transcrits. Ces deux ABC transporteurs appartiennent aux familles des ABCC et ABCG qui sont des familles

retrouvées associées à la résistance aux insecticides (Dermauw & Van Leeuwen 2014). Concernant les autres familles de protéines potentiellement impliquées dans le transport ou la séquestration des insecticides, quatre gènes codants pour des protéines « appendices sensory » (SAP) ainsi que deux gènes codants pour les protéines chemosensorielles (CSP) ont été trouvés sur-transcrits chez les larves exposées. Chez les adultes, un gène codant pour une hexamérine, un gène codant pour les protéines « appendices sensory » (SAP3) et 1 gène codant pour une protéine Niemann-Pick Type C-2 ont aussi été identifiés comme étant sur-transcrits. Il a été déjà montré précédemment que le gène *SAP2* est associé à la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. gambiae* et l'induction de son expression a été associée à une préexposition aux pyréthrinoïdes (Ingham et al. 2020). De manière intéressante, les membres de la famille CSP semblent aussi inductibles par les xénobiotiques comme par exemple les néonicotinoïdes chez la mouche blanche *Bemisia tabaci* (Liu et al. 2016). De même, il a été démontré que les hexamérines d'insectes peuvent parfois se lier aux insecticides et qu'elles sont fréquemment surexprimées chez les populations de moustiques résistantes aux insecticides, suggérant un rôle direct dans la résistance par séquestration (David et al. 2014 ; Haunerland & Bowers 1986). Enfin, les protéines « Niemann-Pick de type C-2 » (impliquées dans le transport du cholestérol et parfois liées à une déficience des activités P450 chez les mammifères), pourraient aussi agir comme des transporteurs de substances chémiochimiques et d'autres composés hydrophobes comme les insecticides (Zhu et al. 2018).

Enfin, les données RNA-seq ont également mis en évidence une sur-transcription de plusieurs sous-unités des récepteurs nicotiques et du gène codant pour l'acétylcholinestérase chez les larves exposées au mélange de pesticides. Comme déjà observé lors de notre expérimentation de sélection (voir chapitre I), Il est probable que cette sur-transcription reflète des mécanismes de compensation physiologique à l'altération de la transmission synaptique par le mélange de pesticides. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été décrit chez les vertébrés et ainsi que chez les insectes (Taillebois et al. 2014).

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que l'exposition des larves à un mélange de pesticides peut entraîner une augmentation de la tolérance au mélange Fludora® Fusion chez les femelles adultes principalement en lien avec son composant néonicotinoïde, la clothianidine. Ces résultats complètent les résultats précédemment obtenus par des approches de sélections contrôlées en laboratoire ou par des études sur le terrain sur le rôle des polluants agrochimiques dans les variations de tolérance aux insecticides utilisés en LAV mais aussi sur le rôle de ces

polluants dans la sélection préférentielle de certains mécanismes de résistance. Par exemple, la sélection d'une lignée d'*An. gambiae* au stade larvaire avec un mélange de pesticides agricole pendant 20 générations a conduit à une augmentation progressive de la résistance au DDT, à la deltaméthrine et au bendiocarbe au stade adulte en lien avec la résistance métabolique (Nkya et al. 2014). En outre, des études ont montré qu'une population d'*An. gambiae* de Côte d'Ivoire provenant d'une zone à forte activité agricole montrait une résistance élevée à différents insecticides comme la deltaméthrine, le bendiocarbe, et le DDT (Chouaïbou et al. 2016 ; Edi et al. 2012). Ce phénotype de résistance multiple a été associé à une fréquence élevée de la mutation Kdr L1014F et à la sur-transcription de plusieurs P450s précédemment associés à la résistance aux insecticides (Edi et al. 2014). Plus récemment, une étude de terrain dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne a suggéré la présence d'allèles de résistance aux néonicotinoïdes dans des populations d'*An. coluzzi* provenant de zone d'agriculture intensive (Chouaïbou et al. 2019 ; Fouet et al. 2020 ; Oxborough et al. 2019).

Les interactions entre la plasticité phénotypique induite par l'environnement et les processus adaptatifs sont des phénomènes complexes. Ces interactions, très probables dans les environnements naturels exposés aux pesticides restent néanmoins difficiles à prédire en terme d'adaptation. Théoriquement, la plasticité phénotypique peut aller à l'encontre de la sélection (la plasticité sur un trait donné diminue sa sensibilité à la sélection) mais peut aussi favoriser la sélection de certains allèles adaptatifs selon le contexte écologique (Ghalambor et al. 2007). Selon la théorie « soma flexible stem » il est prédit que des populations/espèces provenant d'environnements plus variables présentent des niveaux plus élevés de plasticité qui pourraient les pré-adapter aux conditions extrêmes de ces variations par la fixation de phénotypes adaptés par assimilation génétique (Chevin & Hoffmann 2017). Ainsi, l'exposition répétée et fluctuante des populations d'anophèles à une grande variété de composés agrochimiques pourrait avoir un rôle dans l'adaptation rapide des moustiques à la plupart des insecticides utilisés en santé publique. Cela suggère aussi que l'environnement chimique dans lequel se développe les insectes peut influencer la sélection de certains mécanismes de résistance à long terme en privilégiant ceux qui permettent de survivre à une large gamme de xénobiotiques comme par exemple la résistance cuticulaire ou métabolique (Poupardin et al. 2012).

3.5. Conclusion

Le développement de nouveaux produits de lutte antivectorielle pouvant être utilisés pour contrôler la résistance aux pyréthrénoïdes est une préoccupation majeure dans le cadre du

contrôle du paludisme en Afrique (Turner et al. 2016). Dans ce contexte, la nouvelle formulation IRS Fludora® Fusion, développée par Bayer, s'est avérée efficace contre les vecteurs du paludisme africain y compris les populations montrant une résistance aux pyréthrinoïdes (Fongnikin et al. 2020 ; Fuseini et al. 2019 ; Oxborough et al. 2019). Cette étude a montré que la sensibilité des moustiques adultes à la formulation Fludora® Fusion pouvait être affectée par l'environnement chimique dans lequel se développe les larves, probablement en lien avec une réponse plastique affectant la tolérance à la clothianidine. Ces résultats suggèrent que les interactions « gènes x environnement » peuvent avoir un impact significatif sur le contrôle des vecteurs du paludisme en Afrique et que l'utilisation des pesticides en agriculture pour la lutte antivectorielle devrait être abordée dans un cadre intégratif en termes de gestion des résistances.

Publication II (draft version): Exposure of *An. gambiae* larvae to a sub-lethal dose of an agrochemical mixture induces tolerance to Fludora® Fusion and to its neonicotinoid component in adults.

Exposure of *An. gambiae* larvae to a sub-lethal dose of an agrochemical mixture induces tolerance to Fludora® Fusion and to its neonicotinoid component in adults.

Marius Gonse Zoh¹, Jordan Tutagana¹, Behi K. Fodjo², Mouhamadou Chouaïbou², Christabelle G. Sadia², Justin McBeath³, Frederic Schmitt⁴, Sebastian Horstmann⁵, Jean-Philippe David¹ and Stéphane Reynaud^{1*}

Affiliations

¹ Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) UMR 5553 CNRS Grenoble-Alpes University, France

² Centre Suisse de la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire, Côte d'Ivoire

³ Bayer CropScience Limited, UK

⁴ Bayer SAS, France

⁵ Bayer AG, Germany

* corresponding author

Abstract

Heavy use of agrochemicals including herbicides, fungicides and insecticides in intensive agricultural areas often lead to the contamination of neighbouring mosquito larvae breeding sites. Such exposure to complex agrochemical mixtures often lead to an increased tolerance of mosquitoes larvae to insecticides. The objective of this study was to determine whether agrochemical pollutants found in Anopheline larval breeding sites can affect the tolerance of adult mosquitoes to the new insecticide formulation Fludora® Fusion. *An. gambiae* larvae were exposed to a sub-lethal dose of a mixture of agrochemical pesticides representative of a region with an intense agricultural activity in Ivory Coast. Comparative bioassays with Fludora® Fusion and its two insecticide component (deltamethrine and clothianidin) were carried out between adult mosquitoes exposed or not to the pesticide mixture at the larval stage. A transcriptomic analysis through RNA sequencing was subsequently performed in larvae and adults in order to highlight the molecular mechanisms underlying the phenotypic changes observed.

Bioassays revealed a significant increased tolerance of adult females to clothianidin (2.5-fold) and Fludora® Fusion (2.2-fold). No significant tolerance to deltamethrin was observed suggesting that the efficacy of the Fludora® Fusion mixture after pesticide exposure relies mainly on clothianidin. Transcriptomic analysis in larvae and adults revealed a potential of agrochemical breeding sites contamination in favouring the induction of multigenic resistance mechanisms including cuticle proteins, detoxifications activities and altered insecticide sequestration. These results suggest that though Fludora® Fusion has a good potential for vector control, it may be locally be affected by the agrochemical context. The present study also suggests that, although the complex interactions between the use of agrochemical and vector control insecticides are difficult to decipher in the field, they still must be considered in the frame of insecticide resistance management programmes

Key words: Agrochemical pesticides, *An. gambiae*, Fludora® Fusion, clothianidin, metabolic resistance, cuticle resistance, transcriptomics

Introduction

Malaria causes around 400,000 deaths per year mainly in Africa, of which more than 60% are children under 5 years (WHO 2017). Despite significant advances in malaria vaccines and treatments, the control of *Anopheles* mosquito vectors remains one of the most effective malaria control strategies leading to a significant decrease in prevalence and mortality in endemic African regions (S. Coleman et al. 2017; Tanaka et al. 2012; WHO 2017). The effectiveness of vector control essentially relies on the use of chemical insecticides through insecticide treated nets (ITN) or indoor residual spraying (IRS) (Tangena et al. 2020). Among the insecticides used, pyrethroids remain the most used on ITNs and IRS because of their strong effects against the target insects and their low toxicity to the environment and mammals.

However, after years of usage, pyrethroids efficacy is now affected by resistance mechanisms that have been selected by their massive usage for decades (Mouhamadou S. Chouaïbou et al. 2017; Edi et al. 2017; Fane et al. 2012; Nwane et al. 2013; Reid and McKenzie 2016). Resistance to pyrethroids has been mainly associated with target site mutations affecting the voltage gated sodium channel (VGSC, Knock Down Resistance 'kdr' mutations) and an increased insecticide metabolism mediated by detoxification enzymes (metabolic resistance). Kdr mutations are widely distributed in African *Anopheles* populations and differ between West (L1014F) and East (L1014S) Africa (Martinez-Torres et al. 1998; H. Ranson et al. 2000). Metabolic resistance occurs through increased activities of detoxification enzymes, resulting in better metabolism of insecticide (Li et al. 2007). The main detoxification enzyme families involved include cytochrome P450 monooxygenases (P450, CYP for genes), carboxyl/cholinesterases (CCE), glutathione-S-transferase (GST) and UDP-glycosyl-transferases (UDPGT) (David et al. 2013; Liu, 2015; Riveron et al. 2018). In addition to target-site modifications and metabolic resistance, additional resistance mechanisms such as cuticle modifications, altered insecticide transport and sequestration have also been reported (Tene et al. 2013; Ingham et al. 2018; Yahouédo et al. 2017). Introduction of new insecticides with different modes of action has been suggested as a key component of insecticide resistance management strategies (Darriet & Chandre 2011; WHO, 2012). Among the novel insecticides proposed for managing pyrethroid resistance, neonicotinoids have been presented as a good alternative to pyrethroids because they target nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) which represent a new biochemical target in public health (Agossa, Padonou, Koukpo, et al. 2018; Ngufor et al. 2017). In this context, a new insecticide formulation combining the neonicotinoid

clothianidin and the pyrethroid deltamethrin (8:1 w/w) under brand name Fludora® Fusion was developed by Bayer for IRS as an additional tool for insecticide resistance management. Field trials Fludora® Fusion supported the highly efficiency of this insecticide combination against various Malaria vectors including pyrethroid-resistant populations (Ngufor et al. 2017; Fongnikin et al. 2020; Kamaraju et al. 2021; Animut and Horstmann, 2021). Recent data also suggested the added value of this insecticide combination in preventing the selection of both pyrethroid and neonicotinoid resistance alleles as opposed to its two components used alone (Zoh et al. submitted). However, environmental factors potentially affecting the tolerance of mosquitoes to this novel insecticide combination remained to be investigated.

Agriculture represents a key economic sector in Africa whose success and profitability is associated with the use of a wide range of agrochemicals. Such heavy use of agrochemicals including herbicides and insecticides in intensive agricultural areas often lead to the contamination of neighbouring mosquito larvae breeding sites (Nkya et al. 2013). Such exposure to complex agrochemical mixtures often lead to an increased tolerance to insecticides mediated by “gene x environment” interactions (Liu 2015; Riveron et al. 2018). Such interactions can affect the transient expression of a wide range of proteins though the induction of detoxification enzymes, cuticle proteins and transporters are likely playing a key role in the increased resistance phenotype observed. For example, Riaz et al. (2009) showed that *Ae. aegypti* larvae exposed to a sub lethal dose of the herbicide glyphosate or the PAH benzo[a]pyrene show an increased tolerance to the insecticides imidacloprid and permethrin. Similarly, exposure of *Ae. aegypti* larvae to a sub-lethal dose of copper sulphate, (used in agriculture as a fungicide) lead to an increased tolerance to permethrin (Poupardin et al. 2010; Poupardin et al. 2008). Transcriptomic data confirmed the association between this increase insecticide tolerance and the overexpression of genes encoding detoxification enzymes, cuticle proteins and xenobiotic transporters (David et al. 2010; Poupardin et al. 2010;). More recently, exposure of *An. gambiae* larvae to phytochemicals revealed significant induction of transcripts predominantly associated with cuticular proteins and detoxification enzymes (Mang’era et al. 2021).

In this context, the objective of the present study was to determine whether agrochemical pollutants found in Anopheline larval breeding sites can affect the tolerance of adult mosquitoes to Fludora® Fusion. To test this hypothesis, *An. gambiae* larvae were exposed to a sub-lethal dose of a mixture of agrochemical pesticides representative of a region with an intense

agricultural activity in Ivory Coast. Comparative bioassays were carried out between adult mosquitoes exposed or not to the pesticide mixture at the larval stage. A transcriptomic analysis through RNA sequencing was subsequently carried out in larvae and adults in order to highlight the molecular mechanisms underlying the phenotypic changes observed.

Methods

Mosquitoes

An. gambiae sensu stricto larvae were collected near Tiassalé (south of Ivory Coast). This rice field area is subjected to classic vector control activities (mainly mosquito nets impregnated with pyrethroids) as well as an intensive use of pesticides for crop protection, including herbicides, fungicides together with insecticides from the pyrethroid, organophosphate, carbamate and neonicotinoid families (M.S. Chouaïbou et al. 2016). Previous studies have shown that malaria vectors in this area are resistant to multiple insecticides, including pyrethroids, DDT, carbamates and organophosphates (Camara et al. 2018; Edi et al. 2012). A mosquito line from this area was created and then kept without selection pressure for a few generations at the Centre Suisse de Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (CSRS). The Tiassalé line was then mass crossed once with the fully susceptible strain Kisumu to decrease the frequency of resistance alleles leading to the Tiassalé-S line that was as used for all experiments.

Pre-exposure of mosquito larvae to agrochemicals

Four replicates of 400 Tiassalé-S 3rd stage larvae were exposed for 72 hours to a sub-lethal dose of a sub lethal dose of an agrochemical mixture. Larvae not exposed to the agrochemical mixture and bred in similar conditions were used as a control. The agrochemical mixture used in this study consisted of herbicides, fungicides and insecticides classically used in the locality of Tiassalé (M.S. Chouaïbou et al. 2016). A stock solution of pesticides mixture at the recommended agricultural application doses was prepared as follows: insecticides: 3.125 mL.L⁻¹ Legumax® (deltamethrin); 2.5 mL.L⁻¹ K-Optimal® (lambdacyhalothrin, acetamiprid); 1.5 mL.L⁻¹ Verso 480® (chlopyrifos etyl, Organophosphorus) and 66.7 g.L⁻¹ Furadan® (carbamate); fungicides : 5.3 mL.L⁻¹ Banko plus® (chlorothalonil; Organophosphorus; carbendazim; Carbamates) and herbicides: 5.3 mL.L⁻¹ Glyphader® (Glyphosate); 5.3 mL.L⁻¹ Garil® (amide; pyrimidine). This stock solution was then diluted 100,000 fold in order to induce less than 10% mortality after larval exposure.

Bioassays with insecticides

Comparative bioassays were performed on 3-5 days old non-blood fed females obtained from larvae exposed and controls. Bioassays was performed using CDC bottles impregnated with a constant dose of insecticide as follows deltamethrin 10 µg/mL; clothianidin 0.45 µg/mL; clothianidin/deltamethrin mixture 0.45/0.05625 µg/mL (w/w ratio of 8:1, thereafter designated as Fludora® Fusion). Deltamethrin was diluted in 100% acetone while clothianidin and clothianidin/deltamethrin mixture were diluted in an acetonic solution containing 17% (v/v) of mero solvent (MERO EC733, an emulsifiable concentrate containing 81.7% of rapeseed fatty acid esters in ethoxy-7-tridecanol). Bottles were impregnated with 1 mL of insecticide solution a dried at RT for 12h prior to bioassay. Bioassays were performed on 5 batches of 20 non-blood fed females per insecticide. Exposure times were 15 min, 20 min and 15 min for deltamethrin, clothianidin and Fludora® Fusion mixture respectively. Mortality was recorded after a 72 hours recovery time during which mosquitoes were given a 5% honey solution. Such long recovery time was used in order to consider he slower effect of clothianidin as compared to deltamethrin.

Transcriptomic analysis in larvae and adults

Differential gene expression between exposed and unexposed mosquitoes was studied on 4th stage larvae and 4-day old non-blood fed adult females. Total RNA was extracted from four pools of 20 individuals were sampled for each life stage and condition. RNA extractions were performed using Trizol (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Total RNA was then treated with DNase to remove genomic DNA contaminations. RNAseq libraries were prepared from 150 ng total RNA using the NEBNext® Ultra™ II Directional mRNA Library Preparation Kit for Illumina (New England Biolabs) following manufacturer's instructions. Libraries were quantified using the Qubit DNA BR assay (ThermoFisher Scientific) and quality checked using Bioanalyzer DNA 1000 assay (Agilent). Libraries were sequenced in multiplex as single 75 bp reads on a NextSeq 500 sequencer (Illumina) by Helixio (Clermont-Ferrand, France). After unplexing and quality check using FastQC, reads were then filtered based on their length, pairing and quality using Trimmomatic (v0.32.1) (Bolger et al., 2014). Cleaned reads were mapped to the AgamP4 assembly annotated with the AgamP4.12 geneset using HISAT2 (Kim et al., 2015). The Cufflinks (v0.0.7) tool was applied to aligned reads to enumerate for each library the number of short reads overlapping annotated genes. Cuffmerge (v0.0.6) was used to merge multiple assemblies from each sample. Gene transcription levels were computed from aligned reads and compared statistically using the

Cuffdiff (v0.0.7) (Trapnell et al., 2010) tool implemented in a Galaxy pipeline (<http://galaxyproject.org>). Transcription level variations between exposed and unexposed larvae and between adult females from exposed and unexposed larvae were computed. Genes were considered significantly differentially transcribed between exposed and controls when the adjusted p-value was lower than 0.01 after multiple testing correction. For each condition differentially transcribed genes were subjected to a Gene Ontology term (GO-term) enrichment analysis using the functional annotation tool DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (D. W. Huang, Sherman, and Lempicki 2009). The reference gene list was constituted by the 12853 genes detected by RNA-seq. For each condition, over- and under-expressed genes were considered separately and GO-terms showing a Fisher's Exact test P value < 0.01 were considered enriched as compared to the reference list. Heat maps reflecting transcription profiles of candidate genes (i.e. detoxification enzymes including P450s, carboxy/cholinesterases, transferases; ABC transporters, xenobiotic binding proteins, cuticle proteins and insecticide target) across both conditions were generated using TM4 Multi-experiment Viewer (MeV) software.

Results

Bioassays

Exposure of Tiassalé-S larvae to a sub-lethal dose of the agrochemical mixture differentially affects the tolerance of adult females to Fludora® Fusion and its two insecticide components (Figure 1). Comparative bioassays in adult females showed a 2.5-fold and a 2.2-fold increased tolerance to clothianidin and Fludora® Fusion respectively compared to the unexposed control. Though a slight increased tolerance to deltamethrin was observed in exposed individuals this was not significant in our experimental conditions (N=4).

Gene transcription variations associated with exposure to the agrochemical mixture

Transcriptomic analysis by RNA-seq allowed detecting 12852 genes in larvae and adult females. Among them, 3113 genes were significantly differentially transcribed in exposed larvae as compared to controls (Suppl table 1). Comparatively only 477 genes were significantly differentially transcribed in adult females obtained from exposed larvae as compared to controls. Finally, 228 genes were significantly differentially transcribed in both larvae and adults and among them, 110 showed an over- or under-transcription in both life stages.

Kegg pathway and gene Ontology (GO) terms enrichment analysis performed on genes significantly over-transcribed in larvae showed a significant enrichment of the GO term ‘Structural constituent of cuticle’ (2.2-fold). Other categories not associated with potential insecticide metabolic resistance were also enriched and mainly highlighted genes involved in glucose metabolism, protein degradation and transcription factors (Table 1). Enrichment analysis performed on genes significantly under-transcribed in larvae showed an enrichment of pathways and GO terms potentially associated with insecticide resistance mechanism including P450 activities [‘Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450’ (6.4-fold), ‘Drug metabolism - cytochrome P450’ (5.9-fold), ‘Oxidoreductase activity’ (2.7-fold), ‘Oxidoreductase activity acting on paired donors’ (2.3-fold), ‘Monooxygenase activity’ (2.2-fold) and ‘Heme binding’ (1.8-fold)]. GST activities [‘Glutathione metabolism (3-fold), Glutathione transferase activity (4.1-fold)], UGT activities [‘UDP-glycosyltransferase activity’ (3.9-fold)] and cuticle resistance [‘Chitin binding’ (3.9-fold)] (Table 2). Other categories not associated with known insecticide metabolic resistance were also enriched and mainly highlighted genes involved in glucose, lipid, and amino acid metabolism (Table 2).

Enrichment analysis performed on genes significantly over-transcribed in adults did not revealed any enrichment GO terms potentially associated with insecticide resistance (Table 3). The same analysis performed on genes under-transcribed indicated an enrichment of the GO terms [‘Structural constituent of cuticle’ (4.8-fold)] and P450 activities [‘Oxidoreductase activity’ (3.3-fold)] (Table 4).

Focusing on gene families associated with known insecticide resistance mechanisms revealed different gene transcription profiles between exposed larvae and adult females (Figure 2). In larvae, 239 genes belonging to detoxification enzymes, cuticle proteins, transporters and insecticide targets were differentially transcribed. Conversely, only 60 genes belonging to the same families appeared differentially transcribed in adults among which 42 were common to larvae but not necessarily regulated in the same direction (Figure 2).

In exposed larvae a marked regulation of genes coding for cuticle proteins was observed with 91 of them out of 108 being over-transcribed (Figure 2). In addition, 11 P450s belonging to CYP325, CYP6, CYP4 *CYP301* and *CYP307* families together with their electron donor partners NADPH cytochrome P450 reductase (CPR) and cytochrome b5 appeared (CytB5) were over-transcribed. Two carboxylesterases (*COEAE50* and *COEJHE2E*), three UGT/UDPGT (*AGAP007374*, *AGAP011564* and *UGT5A2*), and 2 sulfotransferases

(*AGAP012696* and *AGAP009551*) and 6 ABC transporters (*ABCF2*, *ABCG3*, *ABCH2*, *ABCH1*, *ABCG15* and *ABCH3*) were also over transcribed. In addition to detoxification enzymes and transporters, larval exposure was associated with the over-transcription of genes coding for proteins potentially involved in insecticide binding including the sensory appendage proteins *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* and the chemosensory proteins *CSP1* and *CSP5*. Finally, four genes coding for insecticide targets were over-transcribed in exposed larvae including three subunits of the nicotinic acetylcholine receptor (alpha 5, alpha 6, and beta 1) and the Ace-1 gene encoding the acetylcholinesterase (Figure 2).

In adult females, seven genes coding for cuticular proteins were over-transcribed in exposed individuals including *CPR144*, *CPR113*, *TWDL1*, *CPR111*, *CPR1*, *CPF2* and *CPF1*. Only two carboxylesterases (*COE130* and *COE120*) and two ABC transporters (*ABCC11* and *ABCF3*) were over-transcribed. Finally, genes coding for proteins potentially involved in insecticide binding were also over-transcribed in adults. This included the hexamerin *AGAP001659*, the Niemann-Pick C2 protein *AGAP002851* and *SAP3* (Figure 2).

Discussion

Mosquito larval development frequently occurs in areas exposed to a wide range of natural xenobiotics and anthropogenic pollutants. Previous studies have shown that such xenobiotics including residual pesticides can affect their tolerance to the chemical insecticides used for their control (Poupardin et al. 2010; Suwanchaichinda & Brattsten 2001, Riaz et al., 2009). The xenobiotics leading to a strong effect on larvae tolerance to insecticides were frequently known as detoxification enzyme inducers, supporting their central role in the phenotypic variation observed (Poupardin et al. 2010). However, despite being widely studied in larvae exposed to xenobiotics, the carry-over of such effect to the adult stage has been far less studied, though being highly relevant for the control of malaria vectors which are mainly targeted by insecticides at the adult stage. Here we clearly showed that a larval exposure to a low dose of an agrochemical mixture can induce an increase tolerance to insecticides in adult females. This phenotypic variation was highly significant for Fludora® Fusion combination and its neonicotinoid component clothianidin but not for deltamethrin, suggesting that the increase tolerance to Fludora® Fusion is mainly the consequence of mechanisms affecting clothianidin tolerance.

RNA-seq data generated from larvae exposed to pesticide mixture revealed a marked over-transcription of genes coding for cuticular proteins. Cuticle thickening has been previously associated with resistance through a decreased insecticide penetration in mosquitoes (Balabanidou, Grigoraki, and Vontas 2018; Yahouédo et al. 2016b)(David et al., 2010; Yahouédo et al. 2017; Balabanidou et al 2018). Several cuticle genes found over transcribed in exposed larvae were also found over-transcribed in *Anopheles* populations resistant to insecticides including *CPAP3-A1b*, *CPLPX1*, *CPR127*, *CPR129*, *CPR30*, *CPLCG4*, *CPLG5* and *CPR131* (Awolola et al. 2009; Y. Huang et al. 2018; T. Nkya et al. 2014; Yahouédo et al. 2017). More recently, a constitutive over-transcription of *CPAP3-A1b* was associated with resistance to the neonicotinoid clothianidin and Fludora® Fusion in *An. gambiae* adult females (Zoh et al. submitted). In *Ae. aegypti*, resistance to the neonicotinoid imidacloprid at the larval stage was also associated with an over-transcription of multiple genes encoding cuticular proteins (Riaz et al. 2012). Deciphering whether these cuticular proteins identified here are involved or not in the increased tolerance of adult females to Fludora® Fusion and clothianidin require further functional validation. However, the present study suggests that the induction of particular cuticular genes in the larval stage may be carried over to the adult stage.

Regarding detoxification activities, RNA-seq data generated from exposed larvae revealed the over-transcription of 11 P450 genes together with their two electron donor partners (CPR and cytb5). Among over-transcribed CYP genes, some of them were previously associated with insecticide resistance including *CYP6M3*, *CYP325A3*, *CYP4C27* and *CYP6AF1* (Antonio-Nkondjio et al. 2016; Atoyebi et al. 2020; David et al. 2005; Djouaka et al. 2008; Tchigossou et al. 2020). Interestingly, *CYP6M3* and *CYP4C27* constitutive over-expression were also associated with resistance to the neonicotinoid clothianidin and Fludora® Fusion in *An. gambiae* (Zoh et al. submitted). Several CCE genes and phase two enzymes (GSTs and UDPGTs) were over-transcribed in exposed larvae exposed including two sulfotransferases (SULTs), three UGTs and two CCEs. Among them, *COAE50* constitutive over-transcription was associated with resistance to the neonicotinoid clothianidin and Fludora® Fusion in *An. gambiae* (Zoh et al. submitted). However, the increased tolerance of adults to Fludora® Fusion and clothianidin was only associated with the over-transcription of the two esterases *COE120* and *COE130*. Although *COE130* was previously associated with resistance to DDT (David et al. 2005), clothianidin metabolism by this enzyme is very unlikely. Indeed, known clothianidin metabolism mainly involves oxidation by cytochrome P450s or aldehyde oxidase followed by glucuronidation of oxidized metabolites by UDPGTs (X. Shi et al. 2009). Nevertheless, the lack

of P450 induction in adults observed at the mRNA level do not mean that these enzymes were not over-expressed in adults at the proteins following larval exposure. Indeed, cytochrome P450s protein half-life in vivo has been estimated to range from 40 to 140 h (Grimm et al. 2009). Therefore, it is probable that some of the P450s induced by agrochemicals at the larval stage still show a higher protein level in adults in association with the observed phenotype. Comparing gene transcription levels with protein levels obtained from a proteomic approach may allow decipher the potential carry over of the induction of from larvae to adults.

In addition to detoxification enzymes, several genes potentially involved in insecticide transport or sequestration were over-transcribed in larvae or adults following larval exposure to agrochemicals. The role of ATP-binding cassette (ABC) transporters in conferring insecticide resistance has received much attention recently and several of them have been found differentially expressed in association with insecticide resistance in *An. gambiae* though their importance the in resistance phenotype was not functionally validated (Pignatelli et al. 2017). Here we identified six ABC transporters over-transcribed in exposed larvae and 2 others in adult females mainly belonging to the ABCC and ABCG families that were previously associated with insecticide resistance (Dermauw & Van Leeuwen 2014). Two of them (*ABCG3*, *ABCH3*) were also identified as constitutively over-transcribed in association with clothianidin resistance in *An. gambiae* (Zoh et al. submitted). Proteins potentially involved in insecticide sequestration over-transcribed in exposed larvae included 4 genes encoding sensory appendage proteins (SAP) and two genes encoding chemosensory proteins (CSP). In adult females, one hexamerin, one SAP gene and one cholesterol-like transporter (Niemann-Pick Type C-2 protein) were over-transcribed following larval exposure. Among them, only *SAP3* was over-transcribed in both larvae and adults though its transcription ratio between exposed and controls was lower in adults. Expression of a sensory appendage protein (*SAP2*) has been shown to confer pyrethroid resistance in *An. gambiae* and its transcription was inducible by pyrethroids (Ingham et al. 2020). Whether these proteins are also inducible and capable of binding other insecticides such neonicotinoids surely deserve further work. Members of the CSP family have also been shown to be inducible by by neonicotinoids in the whitefly *Bemisia tabaci* (Liu et al. 2016). Insect hexamerins have been associated with hormone transport, energy and amino acid storage, cuticle biosynthesis and immune response (Burmester & Scheller 1999; Jinwal et al. 2012). It has also been shown that they can bind to various chemicals including insecticides (Haunerland & Bowers 1986). Therefore their frequent over-transcription in insecticide resistant mosquito populations supported their potential role insecticide resistance (David et al.

2014);). Our data showed that although three hexamerins were over-transcribed in adults following larval exposure, two of them were clearly under-transcribed in larvae, suggesting different responses to xenobiotics and/or strong transcriptional variations between larvae and adults. A recent study suggested that Niemann-Pick Type C-2 proteins of arthropods might act as carriers for semiochemicals and other hydrophobic compounds (Zhu et al. 2018). Whether these proteins are involved or not contribute to insecticide sequestration deserves further work.

Finally, RNA-seq data also pointed out the over-transcription of multiple nicotinic receptor subunits and of the acetylcholinesterase gene *Ace-1* in exposed larvae but not in adults. As described in (Taillebois et al. 2014), it is probable that this transient effect in larvae reflects physiological compensation mechanisms to altered synaptic transmission insecticides contained in the agrochemical mixture which was no longer required at the adult stage.

Taken together, our results confirmed that that an exposure of mosquito larvae to agrochemicals residues can affect the efficacy of insecticides used for vector control against adults. Such effect was observed for Fludora® Fusion in link with its neonicotinoid component clothianidin suggesting that the efficacy of vector control product containing neonicotinoids can be significantly affected by the chemical ecology of larval breeding sites. These results also support a potential of such agrochemical breeding sites contamination in favouring the selection of multigenic resistance mechanisms such as detoxification, cuticle alterations and altered insecticide sequestration as previously reported by (Nkya et al. 2014). This may also partly explain the strong and multi-resistant phenotypes frequently observed in malaria vectors in intense agricultural areas through Africa (Chouaïbou et al. 2016; Edi et al. 2012, Edi et al. 2014, (Fouet et al. 2020; Mouhamadou et al. 2019; Oxborough et al. 2019). Indeed, interactions between phenotypic plasticity through ‘gene x environment’ interactions and natural selection are complex phenomena constantly occurring in natural environments exposed fluctuating diverse selection pressures. Theoretically, phenotypic plasticity can shield particular genotypes from selective pressures but can also favour others depending on the ecological context (Ghalambor et al. 2007). Empirical evidences of the flexible stem theory initially proposed by West-Eberhard in 2003 (West-Eberhard, 2003) also suggest that populations from more variable environments show higher levels of plasticity that might preadapt them to extreme conditions (Chevin and Hoffmann 2017). In *Ae. aegypti*, exposing larvae to sub-lethal doses of various xenobiotics prior to selection with permethrin did not significantly affect constitutive resistance levels but led to substantial gene transcription variations affecting detoxification

enzymes, suggesting that 'genes x environment' interactions can shape the long-term selection of insecticide resistance mechanisms (Poupardin et al., 2012). Overall, there are growing evidences that the repeated exposure of mosquito larvae to agrochemicals used in agriculture generates complex interactions between phenotypic plasticity and selection (mediated by these chemicals but also by insecticides used for vector control), potentially leading to particular adaptive phenotypes.

Conclusion

The development of novel vector control products that can be used for controlling pyrethroid resistance has been encouraged by WHO (Turner et al. 2016; WHO 2012). Among them, the novel IRS formulation Fludora® Fusion, developed by Bayer, has been proven to be efficient against African malaria vectors (Fongnikin et al. 2020b; Fuseini et al. 2019; Oxborough et al. 2019b). this insecticide combination has also show a good potential fr preventing the selection of resistance alleles to both pyrethroids and neonicotinoids (Zoh et al. submitted). The present study showed that exposure of *An. gambiae* larvae to a low dose of agrochemicals potentially found in larval breeding sites lead to an increased tolerance to Fludora® Fusion in adults probably through an increased tolerance to clothianidin, its neonicotinoid component. These results suggest that though Fludora® Fusion has a good potential for vector control, it may be locally be affected by the ecotoxicological context. Overall, the present study also suggests that, although the complex interactions between the use of agrochemical and vector control insecticides are difficult to decipher in the field, they still must be considered in the frame of insecticide resistance management programmes.

References

- Agossa, Fiacre R. et al. 2018. “Efficacy of a Novel Mode of Action of an Indoor Residual Spraying Product, SumiShield® 50WG against Susceptible and Resistant Populations of *Anopheles. gambiae* (s.l.) in Benin, West Africa.” *Parasites and Vectors* 11(1): 1–13.
- Antonio-Nkondjio, Christophe et al. 2016. “Investigation of Mechanisms of Bendiocarb Resistance in *Anopheles. gambiae* Populations from the City of Yaoundé, Cameroon.” *Malaria Journal* 15(1): 1–11.
- Atoyebi, Seun M. et al. 2020. “Investigating the Molecular Basis of Multiple Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector *Anopheles Funestus* (Sensu Stricto) from Akaka-Remo, Ogun State, Nigeria.” *Parasites and Vectors* 13(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04296-8>.
- Awolola, T S et al. 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(11): 1139–45.
- Balabanidou, Vasileia, Linda Grigoraki, and John Vontas. 2018. “Insect Cuticle: A Critical Determinant of Insecticide Resistance.” *Current Opinion in Insect Science* 27: 68–74.
- Burmester, T., and K. Scheller. 1999. “Ligands and Receptors: Common Theme in Insect Storage Protein Transport.” *Naturwissenschaften* 86(10): 468–74.
- Camara, Soromane et al. 2018. “Mapping Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* (s.l.) from Côte d’Ivoire.” *Parasites & Vectors* 11(1): 19. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2546-1>.
- Chevin, Luis Miguel, and Ary A. Hoffmann. 2017. “Evolution of Phenotypic Plasticity in Extreme Environments.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372(1723).
- Chouaïbou, Mouhamadou S. et al. 2016. “Influence of the Agrochemicals Used for Rice and Vegetable Cultivation on Insecticide Resistance in Malaria Vectors in Southern Côte d’Ivoire.” *Malaria Journal* 15(1): 1–12.
- Chouaïbou, Mouhamadou S., Fodjo Behi Kouadio, Emmanuel Tia, and Luc Djogbenou. 2017. “First Report of the East African Kdr Mutation in an *Anopheles. gambiae* Mosquito in Côte d’Ivoire.” *Wellcome Open Research*.
- Coleman, Sylvester et al. 2017. “A Reduction in Malaria Transmission Intensity in Northern Ghana after 7 Years of Indoor Residual Spraying.” *Malaria journal* 16(1): 324.
- Darriet, Frédéric, and Fabrice Chandre. 2011. “Combining Piperonyl Butoxide and Dinotefuran

- Restores the Efficacy of Deltamethrin Mosquito Nets Against Resistant *Anopheles. gambiae* (Diptera: Culicidae).” *Journal of Medical Entomology*.
- David, J. P. et al. 2005. “The *Anopheles. gambiae* Detoxification Chip: A Highly Specific Microarray to Study Metabolic-Based Insecticide Resistance in Malaria Vectors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(11): 4080–84. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409348102>.
- David, J.P., H. M. Ismail, A. Chandor-Proust, and M. J. I. Paine. 2013. “Role of Cytochrome P450s in Insecticide Resistance: Impact on the Control of Mosquito-Borne Diseases and Use of Insecticides on Earth.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1612): 20120429–20120429. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2012.0429>.
- David, Jean Philippe et al. 2010. “Transcriptome Response to Pollutants and Insecticides in the Dengue Vector *Ae. aegypti* Using Next-Generation Sequencing Technology.” *BMC Genomics* 11(1).
- David, Jean Philippe et al. 2010. 2014. “Comparative Analysis of Response to Selection with Three Insecticides in the Dengue Mosquito *Ae. aegypti* Using MRNA Sequencing.” *BMC Genomics* 15(1): 1–15.
- Dermauw, Wannes, and Thomas Van Leeuwen. 2014. “The ABC Gene Family in Arthropods: Comparative Genomics and Role in Insecticide Transport and Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45(1): 89–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>.
- Djouaka, Rousseau F et al. 2008. “Expression of the Cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 Are Significantly Elevated in Multiple Pyrethroid Resistant Populations of *Anopheles. gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.” *BMC Genomics* 9: 1–10.
- Edi, Constant et al. 2012. “Multiple-Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* Mosquitoes, Southern Côte d’Ivoire.” *Emerging Infectious Diseases* 18(9): 1508–11.
- Edi, Constant et al. 2017. “First Detection of N1575Y Mutation in Pyrethroid Resistant *Anopheles. gambiae* in Southern Côte d’Ivoire.” *Wellcome Open Research* 2(0): 71. <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-71/v1>.
- Fane, Moussa, Ousmane Cissé, Cheick Sékou F Traore, and Philippe Sabatier. 2012. “*Anopheles. gambiae* Resistance to Pyrethroid-Treated Nets in Cotton versus Rice Areas in Mali.” *Acta Tropica* 122(1): 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.013>.
- Fongnikin, Augustin et al. 2020. “Efficacy of Fludora® Fusion (a Mixture of Deltamethrin and Clothianidin) for Indoor Residual Spraying against Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors:

- Laboratory and Experimental Hut Evaluation.” *Parasites and Vectors* 13(1).
- Fossog Tene, Billy et al. 2013. “Resistance to DDT in an Urban Setting: Common Mechanisms Implicated in Both M and S Forms of *Anopheles. gambiae* in the City of Yaoundé Cameroon.” *PLoS ONE* 8(4).
- Fuseini, Godwin et al. 2019. “Evaluation of the Residual Effectiveness of Fludora™ Fusion WP-SB, a Combination of Clothianidin and Deltamethrin, for the Control of Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors on Bioko Island, Equatorial Guinea.” *Acta Tropica* 196: 42–47.
- Ghalambor, C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll, and D. N. Reznick. 2007. “Adaptive versus Non-Adaptive Phenotypic Plasticity and the Potential for Contemporary Adaptation in New Environments.” *Functional Ecology* 21(3): 394–407.
- Grimm, Scott W. et al. 2009. “The Conduct of in Vitro Studies to Address Time-Dependent Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes: A Perspective of the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America.” *Drug Metabolism and Disposition* 37(7): 1355–70.
- Haunerland, Norbert H., and William S. Bowers. 1986. “Binding of Insecticides to Lipophorin and Arylphorin, Two Hemolymph Proteins of *Heliothis Zea*.” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 3(1): 87–96.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009. “Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists.” *Nucleic Acids Research* 37(1): 1–13.
- Huang, Yun et al. 2018. “*Culex Pipiens* Pallens Cuticular Protein CPLCG5 Participates in Pyrethroid Resistance by Forming a Rigid Matrix.” *Parasites and Vectors* 11(1): 1–10.
- Ingham, V. A., S. Wagstaff, and H. Ranson. 2018. “Transcriptomic Meta-Signatures Identified in *Anopheles. gambiae* Populations Reveal Previously Undetected Insecticide Resistance Mechanisms.” *Nature Communications* 9(1): 5282.
<http://www.nature.com/articles/s41467-018-07615-x>.
- Ingham, Victoria A. et al. 2020. “A Sensory Appendage Protein Protects Malaria Vectors from Pyrethroids.” *Nature* 577(7790): 376–80. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1864-1>.
- Jinwal, U. K. et al. 2012. “NIH Public Access.” *Bone* 23(1): 1–7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- Li, Xianchun, Mary A Schuler, and May R Berenbaum. 2007. “Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics.” : 231–53.
- Liu, Guoxia et al. 2016. “Biotype Characterization, Developmental Profiling, Insecticide Response and Binding Property of Bemisia Tabaci Chemosensory Proteins: Role of CSP in Insect Defense.” *PLoS ONE* 11(5): 1–29.

- Liu, Nannan. 2015. "Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions." *Annual Review of Entomology*.
- Mang'era, Clarence M. et al. 2021. "Transcriptomic Response of *Anopheles. gambiae* Sensu Stricto Mosquito Larvae to Curry Tree (*Murraya Koenigii*) Phytochemicals." *Parasites and Vectors* 14(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04505-4>.
- Martinez-Torres, D. et al. 1998. "Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae* s . S ." 7(October 1997): 179–84.
- Ngufor, Corine, Augustin Fongnikin, Mark Rowland, and Raphael N'Guessan. 2017. "Indoor Residual Spraying with a Mixture of Clothianidin (a Neonicotinoid Insecticide) and Deltamethrin Provides Improved Control and Long Residual Activity against Pyrethroid Resistant *Anopheles. gambiae* Sl in Southern Benin." *PLoS ONE* 12(12): 1–14.
- Nkya, Theresia et al. 2014. "Impact of Agriculture on the Selection of Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles. gambiae* : A Multigenerational Study in Controlled Conditions." *Parasites & vectors* 7(1): 480. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4201709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nkya, Theresia Estomih, Idir Akhouayri, William Kisinza, and Jean Philippe David. 2013. "Impact of Environment on Mosquito Response to Pyrethroid Insecticides: Facts, Evidences and Prospects." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(4).
- Nwane, Philippe et al. 2013. "Multiple Insecticide Resistance Mechanisms in *Anopheles. gambiae* s.l. Populations from Cameroon, Central Africa." *Parasites & Vectors* 6(1).
- Oxborough, Richard M et al. 2019. "Susceptibility Testing of Anopheles Malaria Vectors with the Neonicotinoid Insecticide Clothianidin; Results from 16 African Countries, in Preparation for Indoor Residual Spraying with New Insecticide Formulations." *Malaria Journal* 18(1).
- Pignatelli, P. et al. 2017. "The *Anopheles. gambiae* ATP-Binding Cassette Transporter Family: Phylogenetic Analysis and Tissue Localization Provide Clues on Function and Role in Insecticide Resistance." *Insect Molecular Biology* 27(1): 110–22.
- Poupardin, R. et al. 2010. "Transcription Profiling of Eleven Cytochrome P450s Potentially Involved in Xenobiotic Metabolism in the Mosquito *Ae. aegypti*." *Insect Molecular Biology* 19(2): 185–93.
- Poupardin, Rodolphe et al. 2008. "Cross-Induction of Detoxification Genes by Environmental Xenobiotics and Insecticides in the Mosquito *Ae. aegypti*: Impact on Larval Tolerance to

- Chemical Insecticides.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(5): 540–51.
- Poupardin, Rodolphe et al. 2008.. 2012a. “Do Pollutants Affect Insecticide-Driven Gene Selection in Mosquitoes? Experimental Evidence from Transcriptomics.” *Aquatic Toxicology* 114–115: 49–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.001>.
- Ranson, H. et al. 2000. “Identification of a Point Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Kenyan *Anopheles. gambiae* Associated with Resistance to DDT and Pyrethroids.” *Insect Molecular Biology* 9(5): 491–97.
- Reid, Molly C., and F. Ellis McKenzie. 2016. “The Contribution of Agricultural Insecticide Use to Increasing Insecticide Resistance in African Malaria Vectors.” *Malaria Journal* 15(1).
- Riaz, Muhammad Asam et al. 2009. “Impact of Glyphosate and Benzo[a]Pyrene on the Tolerance of Mosquito Larvae to Chemical Insecticides. Role of Detoxification Genes in Response to Xenobiotics.” *Aquatic Toxicology* 93(1): 61–69.
- Riaz, Muhammad Asam et al. 2009. 2012. “Molecular Mechanisms Associated with Increased Tolerance to the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in the Dengue Vector *Ae. aegypti*.” *Aquatic Toxicology* 126: 326–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.010>.
- Riveron, Jacob M. et al. 2018. “Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale.” *Intech i(tourism)*: 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.
- Shi, Xueyan, Ryan A. Dick, Kevin A. Ford, and John E. Casida. 2009. “Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11): 4861–66.
- Suwanchaichinda, Chansak, and L. B. Brattsten. 2001. “Effects of Exposure to Pesticides on Carbaryl Toxicity and Cytochrome P450 Activities in *Aedes Albopictus* Larvae (Diptera: Culicidae).” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70(2): 63–73.
- Taillebois, Emiliane et al. 2014. “Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon Pisum*.” *PLoS ONE* 9(5).
- Tanaka, Yuji et al. 2012. “Gateway Vectors for Plant Genetic Engineering: Overview of Plant Vectors, Application for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and Multigene Construction.” In *Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities*, InTech, 64.
- Tangena, Julie Anne A. et al. 2020. “Indoor Residual Spraying for Malaria Control in Sub-Saharan Africa 1997 to 2017: An Adjusted Retrospective Analysis.” *Malaria Journal*

- 19(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03216-6>.
- Tchigossou, Genevieve M. et al. 2020. “Investigation of DDT Resistance Mechanisms in *Anopheles Funestus* Populations from Northern and Southern Benin Reveals a Key Role of the GSTe2 Gene.” *Malaria Journal* 19(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03503-2>.
- Turner, James A., Colin N.E. Ruscoe, and Trevor R. Perrior. 2016. “Discovery to Development: Insecticides for Malaria Vector Control.” *Chimia* 70(10): 684–93.
- West-Eberhard, Mary Jane. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press.
- WHO 2012. “Programme Mondial de Lutte Antipaludique Résumé d’orientation.”
- WHO 2017. *World Malaria Report*.
- Yahouédo, Gildas A. et al. 2017a. “Contributions of Cuticle Permeability and Enzyme Detoxification to Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae*.” *Scientific Reports* 7(1): 1–10.
- Yahouédo, Gildas A et al. 2016. “Dynamics of Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors in Southern Benin Following a Large Scale Implementation of Vector Control Interventions.” *Parasites and Vectors* 9(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1661-8>.
- Yahouédo, Gildas A et al. 2017. “Contributions of Cuticle Permeability and Enzyme Detoxification to Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae*.” *Scientific Reports* 7(1): 1–10.
- Zhu, Jiao et al. 2018. “Niemann-Pick C2 Proteins: A New Function for an Old Family.” *Frontiers in Physiology* 9(JAN): 1–11.

Figures Captions

Figure 1. Comparative tolerance to deltamethrin, clothianidin and Fludora® Fusion mixture of adult females exposed or not to a sub lethal dose of agrochemicals at the larval stage. Survival rates to insecticides were assessed using bottle assays and are expressed as % mortality $\pm$ 95% Wald's confidence intervals. Comparisons between adults obtained from exposed larvae and controls were performed using a Fisher's test (***) $p < 0.001$).

Figure 2. Transcription profiles of candidate resistance genes in larvae and adult females following larvae exposure to a sub lethal dose of agrochemicals. All genes differentially transcribed in exposed larvae versus controls (Larvae) or in adult females obtained from exposed larvae or controls (Adults) are shown. Color scale shows the mean Log₂ Fold Change between exposed and controls for each life stage. Stars indicate a significant differential transcription (P value ≤ 0.01).

Table 1. Kegg pathways and GO-term enrichment study based on genes downregulated between control and exposed larvae

Table 2. Kegg pathways and GO-term enrichment study based on genes over-transcribed between control and exposed larvae

Table 3. Kegg pathways and GO-term enrichment study based on genes downregulated between control and adults from exposed larvae

Table 4. Kegg pathways and GO-term enrichment study based on genes over-transcribed between control and adults from exposed larvae

Figure 1.

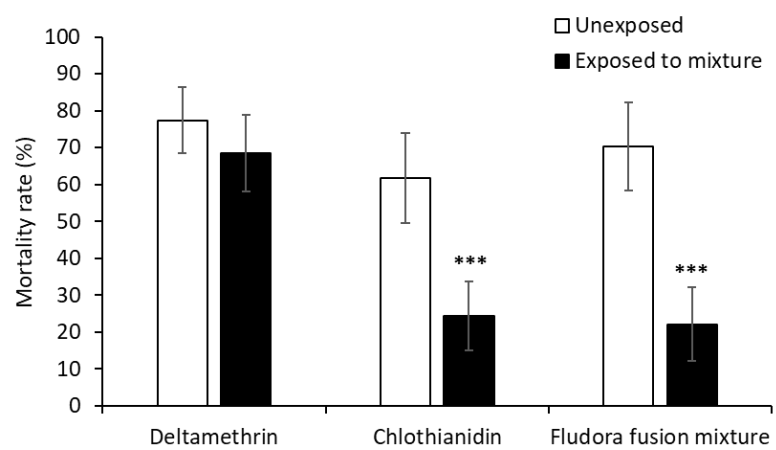
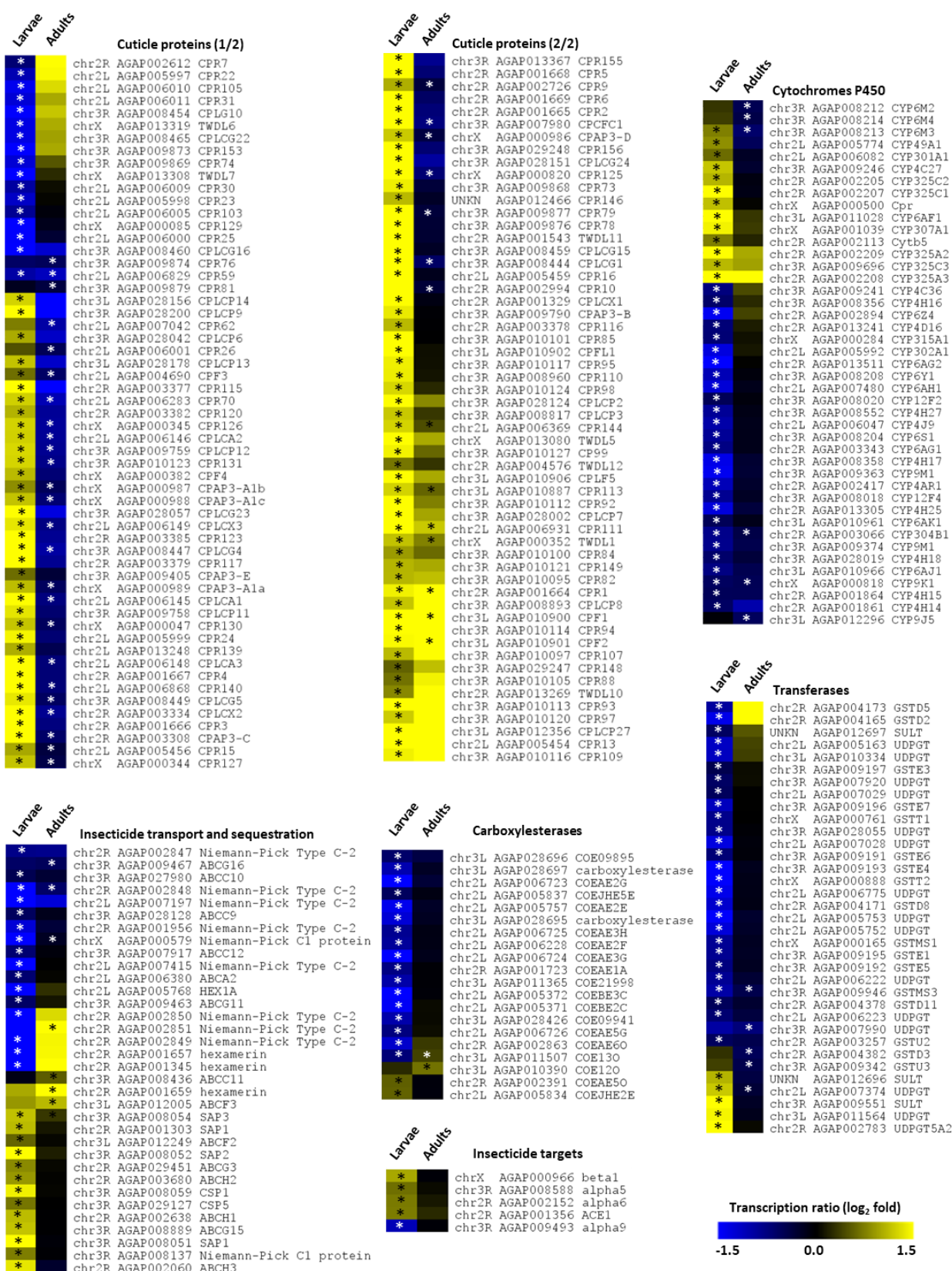


Figure2.



Chapitre 4. Discussion générale

Un nombre limité d'insecticides sont approuvés par l'OMS pour une utilisation en PID ou dans les MII, appartenant principalement aux familles des pyréthrinoïdes, organochlorés, carbamates et organophosphorés. Cependant, l'utilisation répétée de ces insecticides dans les programmes de lutte antivectorielle mais également en agriculture contre les ravageurs de culture, a conduit au développement et à la propagation d'une résistance à la plupart des insecticides au sein des populations de vecteurs du paludisme en Afrique (Corbel & N'Guessan 2013 ; Reid & McKenzie 2016 ; Riveron et al. 2018). L'une des alternatives suggérée dans le cadre du GPRIM (Global Plan Resistance Insecticide Management) pour surmonter la résistance aux insecticides en santé publique s'appuie sur l'utilisation de nouvelles molécules insecticides dirigées contre des cibles biochimiques différentes de celles des molécules existantes en santé publique (WHO 2012). Cette stratégie a donné lieu au développement de la formulation Fludora® Fusion par la société Bayer, une combinaison de deux insecticides ayant différents modes d'action pour une utilisation en PID. La stratégie associée à la formulation Fludora® Fusion est basée sur la combinaison de la clothianidine (néonicotinoïde) et de la deltaméthrine (pyréthrinoïde). En effet, la clothianidine cible les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine entraînant une dépolarisation postsynaptique non contrôlée (Testud 2014). La deltaméthrine est un pyréthrinoïde de type II ciblant quant à lui les canaux sodium voltage dépendant présynaptiques (Animut & Horstmann 2021). Les données récentes obtenues par Bayer et ses partenaires de recherche au cours d'essais opérationnels dans différents pays africains, ont confirmé l'efficacité de Fludora® Fusion sur différentes espèces d'anophèles y compris des lignées/populations présentant un phénotype de résistance aux pyréthrinoïdes (Animut & Horstmann 2021 ; Fongnikin et al. 2020 ; Fuseini et al. 2019 ; Ngufor et al. 2017). Malgré son efficacité sur les vecteurs du paludisme Africains, la question de l'efficacité à long terme de cette nouvelle formulation et de son utilité pour la gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique requerrait des études complémentaires.

Dans ce cadre, l'objectif principal de mes travaux de thèse était donc de comparer, à travers une expérimentation de sélection contrôlée sur plusieurs générations, la dynamique d'apparition de la résistance à la combinaison Fludora® Fusion et à ses deux composants chez *An. gambiae* ainsi que d'étudier les mécanismes de résistance sous-jacents. L'exposition de larves d'anophèles à des résidus de traitements agrochimiques est un phénomène courant dans les zones à fortes activités agricoles en Afrique et de nombreux travaux ont déjà mis en évidence

un impact des xénobiotiques environnementaux sur la tolérance des moustiques aux insecticides utilisés en lutte antivectorielle. Ainsi, dans un second temps nous avons cherché à étudier l'impact d'un mélange, à faible dose, de pesticides classiquement utilisés en agriculture en Afrique sur la tolérance des moustiques *Anopheles* au mélange Fludora® Fusion et à ses deux composants. Pour atteindre l'ensemble de ces objectifs, mes travaux ont été subdivisés en deux parties présentées dans ce manuscrit sous forme de deux chapitres (2 et 3) :

Le chapitre 2 a été consacré à l'étude comparative de la réponse adaptative du vecteur du paludisme *An. gambiae* au mélange Fludora® Fusion et à ses deux composants séparés. Dans cette étude, nous avons sélectionné au stade adulte une lignée d'*An. gambiae* présentant un fond génétique atténué en allèles de résistance pour différentes classes d'insecticides (lignée Tiassalé-S) avec Fludora® Fusion ou bien ses deux constituants. Les mécanismes associés à la résistance de chaque lignée sélectionnée ont par la suite été étudiés par une combinaison de bio-essais et d'approches moléculaires.

Le chapitre 3 visait à évaluer en conditions contrôlées l'impact de la présence de pesticides agrochimiques dans les gîtes larvaires d'*An. gambiae* sur la tolérance au mélange Fludora® Fusion et à ses deux composants. Dans cette étude, nous avons exposé des larves de stade 3 de la lignée Tiassalé-S à une dose sub-létale d'un mélange de composés agrochimiques pendant 72h. A l'émergence nous avons évalué la tolérance des femelles adultes à la deltaméthrine, à la clothianidine et à la combinaison Fludora® Fusion. En parallèle nous avons étudié par transcriptomique (RNA-seq), l'effet de l'exposition sur les variations de niveau de transcription des gènes chez des larves exposées et les adultes issus de ces larves exposées.

4.1. Réponse adaptative d'*An. gambiae* à la combinaison d'insecticides Fludora® Fusion ainsi qu'à ses différents constituants

4.1.1. Synthèse des résultats obtenus

Le suivi de la résistance dans les différentes lignées a montré qu'après 33 générations de sélection, aucune résistance significative n'a pu être mise en évidence chez la lignée sélectionnée au mélange Fludora® Fusion Fludo-R. En comparaison, la lignée Clothia-R a développé une résistance modérée à la clothianidine et la lignée Delta-R une forte résistance à la deltaméthrine. A la génération 17, une légère résistance croisée de la lignée Fludo-R à la

clothianidine et des lignées Delta-R et Clothia-R au mélange Fludora® Fusion a aussi été observée.

La résistance de la lignée Delta-R a montré une forte association avec l'augmentation de la fréquence de mutation kdr west (L1014F) tandis que la fréquence de cette mutation a progressivement diminué au fil des générations chez les lignées sélectionnées avec la clothianidine et la combinaison Fludora® Fusion. De nombreux gènes de détoxification ont été détectés comme différentiellement transcrits dans les lignées sélectionnées comparativement à la lignée témoin Tiassalé S. Cependant, les lignées Delta-R et Fludo-R n'ont pas montré de sur-transcription de gènes candidats précédemment associés à la résistance. Seule la lignée sélectionnée avec la clothianidine a montré une sur-transcription de nombreux gènes potentiellement associés à la résistance métabolique. Les analyses génomiques ont montré que la lignée sélectionnée avec la clothianidine présente une forte signature de sélection au niveau du locus des CYP6M contenant plusieurs gènes CYP6 précédemment associés à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* et dont certains montrent une forte homologie protéique avec des P450s impliqués dans la résistance aux néonicotinoïdes chez d'autres insectes. Des études plus approfondies supportent le rôle de *CYP6M1* dans la résistance à la clothianidine via une expression accrue ainsi que la sélection de variants protéiques montrant une meilleure capacité à métaboliser cet insecticide.

4.1.2. Evolution de la résistance à la combinaison Fludora® Fusion chez les vecteurs du paludisme en Afrique

La formulation Fludora® Fusion représente une nouvelle stratégie pour la LAV car elle montre une bonne efficacité (toxicité et rémanence sur différents supports pour traitement par IRS) sur différentes espèces d'anophèles. Des études de terrain et de laboratoire conduites en Afrique par Bayer et ses partenaires de recherche ont aussi montré que Fludora® Fusion présente une bonne efficacité contre des populations d'*An. gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes (Agossa et al. 2018 ; Fongnikin et al. 2020 ; Ngufor et al. 2017). Des résultats similaires ont également été obtenus sur différentes espèces d'anophèles dans divers pays d'Afrique tels que la Côte d'Ivoire, le Ghana, la Tanzanie, la Zambie, l'Ethiopie, l'Afrique du sud ou en Inde (Animut & Horstmann 2021 ; Kamaraju et al. 2021). Ces données suggèrent que cette nouvelle combinaison d'insecticides pourrait constituer une bonne alternative dans des zones où les vecteurs sont fortement résistants aux pyréthrinoïdes. Néanmoins, la question de

l'efficacité à long terme de Fludora® Fusion et notamment de la capacité des moustiques *Anopheles* à développer une résistance à cette combinaison n'avait pas pu être étudiée sur le terrain à cause de son introduction très récente en LAV (préqualification par l'OMS en Décembre 2018).

Les données expérimentales obtenues en laboratoire au cours de cette thèse ont révélé que, dans les conditions expérimentales utilisées (fond génétique de la lignée parentale, intensité de la pression de sélection, taille des populations, ... voir chapitre 2), Fludora® Fusion montrait toujours une bonne efficacité après plus de 30 générations d'utilisation. Ces données de laboratoire supportent aussi la capacité de cette combinaison d'insecticides à retarder la sélection des allèles de résistance aux PYRs, notamment la mutation *kdr* ouest et les allèles de résistance métaboliques. Cette combinaison semble également efficace pour retarder le développement de la résistance aux néonicotinoïdes, notamment les allèles de résistance métaboliques car la mutation de la cible de ces insecticides n'était pas présente dans la lignée parentale.

Ainsi, bien qu'une résistance croisée ait été observée entre certaines lignées/insecticides, nos résultats suggèrent qu'il y a bien une valeur ajoutée au fait de mélanger un pyréthroïde pour lequel la résistance est déjà bien répandue avec le néonicotinoïde clothianidine. Cette valeur ajoutée pourrait être la conséquence du mode d'action complémentaire des deux molécules qui assure un double effet toxique (Ngufor et al. 2017) et prévient la sélection d'allèles de résistance à chacune des deux molécules du mélange. Ces résultats sont concordants avec d'autres études empiriques d'efficacité qui suggèrent que l'utilisation d'une combinaison de deux ou de plusieurs insecticides ayants des modes d'actions différents permet de retarder la sélection des allèles de résistance (Darriet & Chandre 2011 ; Furnival-Adams et al. 2020 ; Hougard et al. 2003 ; Oxborough et al. 2015). Cependant aucune étude empirique sur *An. gambiae* n'avait jusqu'alors étudié la dynamique de la résistance à une combinaison d'insecticides sur plusieurs générations. En complément, des études théoriques portant sur la dynamique de la sélection des allèles de résistance dans différents scénarios ont suggéré que l'utilisation d'un mélange par rapport à l'utilisation d'un seul insecticide permettrait de retarder de façon significative l'évolution de la résistance (South & Hastings 2018).

Cependant, ces études théoriques sont essentiellement basées sur la dynamique des mutations de cible (dont le spectre de résistance est spécifique à chaque composant du mélange) et ne prennent pas en compte l'existence de mécanismes de résistance croisée entre des

insecticides de mode d'action différents qui sont beaucoup plus difficiles à anticiper compte tenu des connaissances actuelles (Edi et al. 2012). Ainsi, la combinaison d'insecticides ayant des modes d'action différents n'exclue pas la sélection d'allèles de résistance croisée, notamment des allèles métaboliques (e.g. certaines enzymes de détoxification ayant la capacité de métaboliser les deux molécules) ou cuticulaires (e.g. une modification de la cuticule conférant une résistance à divers insecticides) (Edi et al. 2014 ; Yahouédo et al. 2017). Dans ce cadre, bien que les études effectuées en amont au laboratoire ne reflètent pas la complexité des populations naturelles (intensité et nature des pressions de sélection, paramètres démographiques, flux de gènes, ...), elles peuvent néanmoins permettre d'identifier des molécules ou bien des combinaisons de molécules dont l'efficacité à court terme serait menacée par l'émergence de résistances. Ainsi, nos travaux ont permis de mettre en évidence une potentielle adaptation rapide d'*An. gambiae* au néonicotinoïde clothianidine lorsque que celui-ci est utilisé seul (voir ci-après), remettant en question le potentiel de gestion de la résistance avec des formulations utilisables en LAV uniquement basées sur cette molécule active (e.g. Sumishield® WG commercialisé par Sumitomo).

Aujourd'hui, Fludora® Fusion représente la première combinaison d'insecticides utilisée en pulvérisation intra domiciliaire. Bien que cette combinaison semble être efficace pour prévenir la sélection d'allèles de résistance, nos résultats issus des bio-essais croisés entre lignées/insecticides ont montré que l'utilisation seul de la deltaméthrine ou bien de la clothianidine peut engendrer une légère augmentation de la résistance à Fludora® Fusion. Ainsi, les données obtenues suggèrent que la présence de la mutation kdr ouest L1014F pourrait être à l'origine de la résistance modérée à Fludora® Fusion observée pour la lignée Delta-R. Par contre, la résistance croisée observée entre la lignée Clothia-R et Fludora® Fusion semblerait plutôt avoir une origine métabolique. En effet, malgré une prévalence des individus homozygotes pour la mutation kdr ouest plus faible dans la lignée Clothia-R, cette lignée montre un large panel d'enzymes de détoxification sur-transcrites dont certaines ont déjà été associées à la résistance. Bien que le rôle de la plupart de ces gènes n'ait pas encore été validé fonctionnellement, certains d'entre eux pourraient avoir un rôle important dans la résistance des moustiques aux néonicotinoïdes et à Fludora® Fusion. Parmi ces gènes, on peut notamment citer les P450s *CYP6M1*, *CYP6M3*, *CYP6P1*, *CYP12F1* et *CYP4C27* sur-transcrits chez la lignée Clothia-R et associés à la résistance métabolique aux insecticides chez *An. gambiae* (voir chapitre 2, article 1). La sur-transcription du P450 *CYP4G16* pourrait aussi jouer un rôle clé dans la résistance de la lignée Clothia-R à Fludora® Fusion. En effet, ce gène a été montré

comme étant impliqué dans la résistance cuticulaire chez *An. gambiae* (Balabanidou et al. 2016 ; Toé et al. 2015 ; Yahouédo et al. 2017) et peut donc potentiellement conférer une résistance à un large panel de molécules.

De manière intéressante, toutes les lignées sélectionnées ont montré une augmentation de leur niveau de résistance au DDT (organochloré ciblant les canaux sodiums voltage dépendants). Ce phénotype de résistance croisée est probablement la conséquence de la forte fréquence de la mutation *kdr* ouest chez la lignée Delta-R car il a été montré que cette mutation confère une forte résistance croisée entre les pyréthrinoïdes et le DDT (Chandre et al. 1999 ; Ranson et al. 2000). Chez les autres lignées sélectionnées, ce phénotype de résistance pourrait plutôt être la conséquence d'autres mécanismes. En effet, la sur-transcription des enzymes de détoxification sélectionnées chez les lignées Fludo-R et Clothia-R pourrait affecter leur résistance au DDT. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études qui montrent que certains P450s d'insectes peuvent conférer une résistance croisée entre les néonicotinoïdes et le DDT (Daborn et al. 2001 ; Le Goff et al. 2003). Le rôle des P450 dans la résistance au DDT des lignées Fludo-R et Clothia-R semble aussi supporté par le fait que certains P450 sur-transcrits dans ces lignées tels que *CYP4C27* et *CYP12F1* ont déjà été associés à la résistance à cet insecticide chez les anophèles (Atoyebi et al. 2020 ; Chiu et al. 2008).

Bien qu'une faible résistance à la deltaméthrine et à la clothianidine ait été observée chez la lignée sélectionnée avec Fludora® Fusion cela ne se traduit pas par la sélection de la résistance à cette combinaison. Ainsi, l'un des résultats intéressants de nos travaux est l'absence de résistance croisée de la lignée Clothia-R à la deltaméthrine et de la lignée Delta-R à la clothianidine. Cette absence de résistance croisée entre les deux composants de Fludora® Fusion supporte son potentiel en termes de gestion de la résistance. Néanmoins cela n'exclut pas le risque d'apparition d'une résistance croisée entre la deltaméthrine et le néonicotinoïde clothianidine comme cela a récemment été décrit par notre équipe chez *Ae. aegypti* avec l'imidaclopride (voir Article 3 en annexe). De manière générale, il est important de garder en mémoire que nos données expérimentales ne sont pas pleinement prédictives de la réalité du terrain et sont à considérer avec précautions. En effet, notre expérimentation de sélection contrôlée a été effectuée à partir d'une population de moustiques provenant d'une seule localité en Afrique. Bien que cette population présente une résistance à de multiples insecticides (Edi et al. 2012), elle n'est toutefois pas représentative de la diversité de fonds génétiques des populations d'*An. gambiae* rencontrées en Afrique dont certaines pourraient contenir d'autres

allèles/mécanismes de résistance. De plus, notre approche par sélection contrôlée en laboratoire n'a pas permis de contrôler totalement les effets de dérive génétique associés à des goulots d'étranglements au cours de certaines générations. Ce phénomène a pu engendrer la perte de certains allèles de résistance ou bien leur fixation générant ainsi des effets sur les phénotypes et les signatures de sélection observés entre les différentes lignées. Enfin, le mode d'exposition adopté lors de notre sélection contrôlée (exposition à l'aide de bouteilles imprégnées) ne permet pas de prendre en compte un éventuel comportement d'évitement des moustiques au contact de l'insecticide bien que ce cela puisse avoir un effet sur l'efficacité des biocides utilisés en LAV. Ce type d'interaction comportementale est connu pour les pyréthrinoïdes qui engendrent effet excito-répulsif chez les moustiques (Kawada et al. 2014). Une réduction de la mortalité induite par le mélange Fludora® Fusion en lien avec une réduction du temps de contact en comparaison de la clothianidine seule a été récemment mise en évidence lors d'essais de terrains (Fongnikin et al. 2020 ; Ngufor et al. 2017). Des résultats similaires ont également été observés lors d'essais de terrains combinant le chlorfenapyr (pyrrole) et l'alpha-cyperméthrine (Ngufor et al. 2016).

4.1.3. Résistance aux néonicotinoïdes chez les moustiques

Bien que les néonicotinoïdes commencent seulement à être utilisés en santé publique contre les moustiques, ces insecticides sont largement utilisés en agriculture en Afrique. Aujourd'hui, il existe de plus en plus d'études montrant un lien entre l'utilisation intensive de pesticides en agriculture et la dynamique de la résistance aux molécules utilisées en santé publique contre les moustiques (Nkya et al. 2014 ; Reid & McKenzie 2016). Récemment, une étude a mis en évidence une résistance accrue des vecteurs du paludisme à la clothianidine dans 5 pays dont le Mali, l'Ouganda, le Sénégal, le Ghana et la Zambie (Oxborough et al. 2019). D'autres études ont également démontré le lien probable entre l'utilisation de néonicotinoïdes en agriculture et la sélection de la résistance aux néonicotinoïdes chez les vecteurs du paludisme (Chouaïbou et al. 2019 ; Fouet et al. 2020). Nos résultats expérimentaux obtenus sur une lignée d'*An. gambiae* issue d'une population potentiellement exposée aux néonicotinoïdes utilisés en agriculture dans la région de Tiassalé ont montré une augmentation relativement rapide de la résistance à la clothianidine, suggérant que des allèles de résistance aux néonicotinoïdes circulent déjà dans cette région. Néanmoins, l'identification des pressions de sélection conduisant à l'émergence de ces allèles (sélection par les néonicotinoïdes utilisés en agriculture ou bien par d'autres insecticides) requiert d'autres études.

Dans notre étude, le phénotype de résistance observé chez la lignée Clothia-R à la clothianidine est supporté par nos données de transcriptomique qui ont révélé une sur-transcription de multiples gènes codant pour les enzymes de détoxification. Les gènes sur-transcrits chez la lignée Clothia-R incluent un grand nombre de P450s, dont certains montrent de fortes similarités protéiques avec d'autres P450s conférant une résistance aux néonicotinoïdes chez d'autres insectes. De plus une forte signature de sélection a été observée sur le locus des CYP6M contenant plusieurs gènes dont le rôle dans la résistance métabolique aux insecticides est connu (Corbel & N'Guessan 2013 ; Edi et al. 2014 ; Ranson & Lissenden 2016 ; Riveron et al. 2018). Ces données supportent donc le rôle central des P450s dans la résistance métabolique aux néonicotinoïdes chez les insectes (Karunker et al. 2009 ; Puinean et al. 2010). En effet, le lien entre la surexpression et ou des modifications structurales de certains P450s et la résistance aux néonicotinoïdes a déjà été montré chez différents insectes ravageurs (Kaplanoglu et al. 2017 ; Karunker et al. 2009 ; Puinean et al. 2010). Chez les moustiques, bien que peu d'études n'aient été conduites sur la résistance aux néonicotinoïdes, les travaux expérimentaux réalisés chez *Ae. aegypti* dans notre équipe ont également montré que les P450 jouent un rôle important dans le métabolisme des néonicotinoïdes (David et al. 2014 ; Riaz et al. 2012). Une étude récente à laquelle j'ai contribué combinant des données de génomique et de transcriptomique sur une lignée d'*Ae. aegypti* résistante à l'imidaclopride suggère notamment que la sur-transcription de P450s tels que *CYP6BB2*, *CYP9M9* et *CYP6M11* serait associée à la résistance (voir Article 3 en annexe). En accord avec ces études, les données obtenues au cours de cette thèse suggèrent que la régulation transcriptionnelle et la sélection de variants structuraux du P450 *CYP6M1* contribuent à la résistance à la clothianidine chez *An. gambiae*. Ce gène (ainsi que les autres P450s sur-exprimés chez la lignée Clothia-R et orthologues à ceux impliqués dans la résistance aux néonicotinoïdes chez d'autres insectes) constitue donc des marqueurs prometteurs pour étudier la dynamique de la résistance aux néonicotinoïdes chez les anophèles dans le cadre de leur implémentation pour la LAV en Afrique.

Enfin, des mutations de cible affectant les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChR) et conférant une résistance aux néonicotinoïdes ont déjà été décrites chez les insectes ravageurs (Bass et al. 2011). Bien que de telles mutations n'aient pas été détectées chez la lignée Tiassalé-S utilisée au cours de mes travaux de thèse, cela ne signifie pas qu'elles ne peuvent pas émerger chez les moustiques. Ainsi, la détection et le suivi des mutations affectant les

nAchR dans les populations naturelles d'anophèles devrait aussi constituer un axe essentiel du dispositif de surveillance de la résistance aux néonicotinoïdes.

4.2. Impact des composés agrochimiques sur l'efficacité de Fludora®

Fusion chez *An. gambiae*

Les xénobiotiques présents dans l'habitat des moustiques peuvent affecter leur système de détoxification et entraîner une tolérance accrue aux insecticides chimiques utilisés en LAV (Poupardin et al. 2008 ; Riaz et al. 2012 ; Suwanchaichinda & Brattsten 2001). Ainsi, certains gîtes de reproduction d'*An. gambiae* sont fréquemment retrouvés à proximité de zones d'agriculture intensive contaminés par des pesticides (Chouaïbou et al. 2016 ; Diabaté et al. 2002 ; Nkya et al. 2014). Néanmoins, la majorité de ces études n'ont évalué que l'effet de ces xénobiotiques sur la tolérance aux insecticides au stade larvaire sans toutefois s'intéresser aux effets d'une telle exposition sur le phénotype des adultes.

Dans ce cadre, nos travaux ont montré qu'une exposition des larves d'*An. gambiae* à une dose sub-létale d'un cocktail de pesticides agricoles entraîne une tolérance accrue au mélange Fludora® Fusion et à la clothianidine chez les femelles adultes. Ainsi, il semblerait que certains mécanismes associés à une augmentation de la tolérance aux insecticides induits chez les larves au cours de l'exposition soient maintenus jusqu'au stade imago (Nkya et al. 2014 ; Sarkar et al. 2009). Cependant nos données suggèrent que cet effet reste limité pour la deltaméthrine en comparaison de la clothianidine et de la combinaison Fludora® Fusion, suggérant que la variation de tolérance observée à Fludora® Fusion repose principalement sur des mécanismes affectants la tolérance à clothianidine. Il a été montré que les enzymes de détoxification telles que les P450s ou bien les protéines cuticulaires sont souvent inductibles par les xénobiotiques (Boyer et al. 2006 ; Poupardin et al. 2010 ; Riaz et al. 2012). Ainsi, par une approche d'analyse transcriptomique, nous avons montré que l'exposition des larves de moustiques à une dose sub-létale de ce mélange de composés agrochimiques induit la sur-transcription de nombreux gènes codant pour des P450s, des protéines cuticulaires et des protéines potentiellement impliquées dans le transport et la séquestration des insecticides. Ces résultats sont en accord avec le rôle central des P450s dans la protection des insectes contre les xénobiotiques présents dans leurs environnements (Després et al. 2007). Parmi les P450s induits par l'exposition chez les larves, *CYP6M3*, *CYP325A3*, *CYP4C27* et *CYP6AF1* ont précédemment été associés à la résistance

aux insecticides chez les moustiques (voir chapitre 3). De manière intéressante, *CYP6M3* et *CYP4C27* ont été également trouvés sur-transcrits de manière constitutive dans les lignées sélectionnées avec la clothianidine et le mélange Fludora® Fusion (voir Publication I) suggérant un rôle potentiel dans le métabolisme des néonicotinoïdes (Zoh et al. soumis). La tolérance accrue des adultes à la clothianidine et au mélange Fludora® Fusion a également été associée à la sur-transcription de plusieurs protéines cuticulaires dont certaines ont précédemment été associées à la résistance aux insecticides chez les adultes (Awolola et al. 2009 ; Balabanidou et al. 2016 ; Nkya et al. 2014 ; Wood et al. 2010 ; Yahouédo et al. 2017). Ainsi la protéine cuticulaire *CPAP3-A1b* sur-transcrite chez les larves exposées, a également été identifiée comme sur-transcrite en association avec la résistance à la clothianidine chez la lignée Clothia-R (voir Publication I). Ce résultat supporte le fait que l'induction de certains gènes codants pour des protéines cuticulaires par les composés agrochimiques pourrait contribuer à la tolérance des adultes aux insecticides utilisés en LAV.

Nos résultats confirment que les polluants présents dans les gîtes larvaires des moustiques peuvent induire certaines enzymes de détoxification impliquées dans la tolérance aux insecticides (Boyer et al. 2006 ; Enayati et al. 2005 ; Hemingway et al. 2004 ; Nkya et al. 2014 ; Riaz et al. 2012). Cependant, notre étude a mis en évidence une forte différence des profils de transcription entre les larves exposées aux pesticides agrochimiques et les adultes issus de ces larves. Il a été montré qu'un phénotype de résistance larvaire peut aussi s'exprimer chez les adultes mais que son intensité peut varier (Gayathri & Murthy 2006 ; Omer et al. 1980 ; Sarkar et al. 2009). En effet, de nombreux gènes de détoxification montrent de fortes variations d'expression selon les stades de vie (larve, nymphe, adulte) chez les moustiques (Strode et al. 2006, Poupardin et al. 2010). De même de par leur nature, le niveau d'expression de la plupart des protéines cuticulaires varie très fortement entre les stades et aussi très rapidement pendant les mues et la métamorphose (Clements 1992). Toutefois, l'absence d'une sur-transcription chez les adultes (mesurée par RNA-seq) ne signifie pas que la protéine associée n'est pas surreprésentée à ce stade et que cela n'affecte pas le phénotype de résistance. En effet, des études ont montré que la durée de vie de certaines protéines telles que les P450s était compatible avec leur expression au stade larvaire et leur présence au stade adulte (Grimm et al. 2009).

De manière globale, notre étude supporte le fait que les xénobiotiques et notamment les composés agrochimiques peuvent impacter la tolérance des moustiques aux insecticides utilisés en LAV et éventuellement la dynamique de la résistance (Akogbéto et al. 2006 ; Antonio-

Nkondjio et al. 2011 ; Diabaté et al. 2002 ; Djouaka et al. 2007, 2008 ; Nkya et al. 2013,2014 ; Ranson et al. 2009). Cependant, les données de transcriptomiques générées ne permettent pas de différencier les gènes directement associés à l'augmentation de tolérance aux insecticides au stade adulte de ceux induits pas les xénobiotiques mais sans effet sur ce phénotype. Enfin, notre étude ne permet pas d'aborder l'impact à long terme de la contamination des gîtes larvaires par des composés agrochimiques sur la dynamique de sélection des allèles de résistance aux insecticides utilisés en LAV. En effet, les relations entre plasticité phénotypique (interactions gènes x environnements) et sélection peuvent prendre des formes complexes selon la nature des variations environnementales, des pressions de sélection et la dynamique des allèles adaptatifs ou non (Ghalambor et al. 2007). Ainsi l'induction de certains gènes de résistance par les xénobiotiques pourrait diminuer la pression de sélection qu'ils subissent par les insecticides entraînant un ralentissement de leur sélection (Poupardin et al. 2012). A l'inverse, la présence de xénobiotiques dans l'environnement larvaires pourrait aussi favoriser certains phénotypes particuliers et engendrer des phénomènes d'adaptation locale et influencer la nature des allèles de résistance sélectionnés par les insecticides utilisés en LAV (Ghalambor et al. 2007, 2015 ; Price et al. 2003). Au niveau appliqué, l'ensemble de ces travaux ont montré que l'environnement écologique des vecteurs a un impact sur leur tolérance aux insecticides et sur la dynamique de sélection des allèles de résistance. Ainsi une gestion intégrée des problèmes de résistance nécessiterait de mieux prendre en compte les pratiques agricoles dans les stratégies de lutte antivectorielle.

4.3. La place de Fludora® fusion dans le futur de la lutte antivectorielle

La lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique est à l'heure actuelle principalement basée sur l'utilisation d'insecticides chimiques via les PID ou les MII. Les principales classes autorisées dans cette lutte concernent 4 familles dont les pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine) ; les organochlorés (DDT) ; les carbamates (bendiocarbe, propoxur) et les organophosphorés (malathion, fenitrothion, pirimiphos-méthyl). Malheureusement, l'utilisation répétée de ces insecticides a conduit à une augmentation et une propagation de la résistance au sein des populations de vecteurs du paludisme en Afrique. Les mécanismes de résistance croisés entre les pyréthrinoïdes et le DDT (mutations *kdr* notamment) ainsi que la forte toxicité environnementale du DDT limitent son utilisation pour la gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes par des stratégies de rotation, de mosaïque ou de combinaison (Ranson & Lissenden 2016 ; WHO 2012). Les carbamates ont aussi été très utilisés en

agriculture et en santé publique ayant pour conséquence une émergence rapide de la résistance (Ranson & Lissenden 2016). De plus la présence d'allèles (notamment certains P450s) conférant une résistance croisée entre les carbamates et les pyréthriinoïdes a déjà été détectée en Afrique (Adolfi et al. 2019; Ibrahim et al. 2016). Enfin, le DDT, les carbamates et les organophosphorés ne sont pas recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires et sont coûteux pour les applications de routine en PID (Chanda et al. 2015 ; Oxborough 2016 ; WHO 2015). Ainsi, les pyréthriinoïdes restent les insecticides les plus utilisés malgré une forte prévalence de la résistance dans les populations naturelles.

Dans le but de préserver l'efficacité des insecticides face à la propagation rapide de la résistance chez les vecteurs ciblés, d'autres stratégies ont été développées. Ces stratégies utilisent des outils innovants et s'appuient aussi parfois sur le comportement des vecteurs qui reste aujourd'hui un paramètre encore peu exploité pour la LAV. On peut ainsi citer l'amélioration de l'habitat par des barrières physiques telles que des moustiquaires sur les fenêtres et les portes visant à réduire l'entrée des vecteurs dans les habitations (Animut et al. 2013 ; Atieli et al. 2009 ; Bradley et al. 2013 ; Ondiba et al. 2018 ; Yé et al. 2006). La combinaison de ces barrières avec des insecticides est également possible afin de maximiser leur impact sur la transmission du paludisme (Killeen et al. 2017). Une autre stratégie utilise l'avant toit des maisons (point d'entrée privilégié des *An. gambiae* en Afrique), pour piéger les moustiques (Njie et al. 2009). Cette technologie dénommée tube d'avant-toit (en anglais « eave tube »), consiste à fermer l'avant-toit des maisons tout en plaçant à certains endroits des inserts traités par des insecticides. Ces inserts, en plus d'avoir un effet létal dû à la présence d'insecticides, ont également un revêtement électrostatique très efficace contre les moustiques résistants (Andriessen et al. 2015 ; Sternberg et al. 2021). Une autre stratégie consiste à utiliser des pièges à appâts sucrés (en anglais « Attractive Targetted Sugar Baits ») pour tuer les moustiques mâles et femelles en combinant du sucre à des substances toxiques sélectives montrant une bonne spécificité vis-à-vis des espèces non cibles (Beier et al. 2012 ; Stewart et al. 2013).

Des approches dites de contrôle génétiques efficaces et moins toxiques pour l'environnement ont également été développées (Simard 2019). Ces approches concernent par exemple l'utilisation de bactéries du genre *Wolbachia* induisant une incompatibilité cytoplasmique chez le moustique après l'accouplement (Werren et al. 2008 ; Zug & Hammerstein 2012), la technique de l'insecte stérile visant à réduire la taille de population par

l'accouplement des femelles avec des mâles stériles, ou bien le forçage génétique permettant l'introgression non-mendélienne rapide d'un élément génétique dans une population ciblée (Bourtzis et al. 2016 ; Bouyer & Lefrançois 2014 ; Oliva et al. 2012). Cette dernière approche est récente et peut être utilisée pour supprimer une population (gène létal) ou bien modifier un trait phénotypique d'importance comme par exemple la compétence vectorielle d'un vecteur (Hammond et al. 2016). Toutefois les approches de contrôle génétiques soulèvent aussi des défis scientifiques, opérationnels et éthiques nécessitant des recherches supplémentaires et des évaluations opérationnelles avant leur implémentation dans les programmes de lutte contre le paludisme. Dans l'attente de stratégies durables et efficaces l'utilisation d'insecticides chimiques reste encore prépondérante en terme de LAV. Dans un contexte de limitation des molécules autorisées en santé publique, la gestion de la résistance aux insecticides et notamment aux pyréthrinoïdes revêt une importance majeure afin de préserver leur efficacité. Parmi les stratégies de gestion de la résistance disponibles, l'utilisation de nouvelles formulations combinant différents modes d'action tels que Fludora® Fusion semblent montrer une double valeur ajoutée de par leur efficacité pour la LAV et leur capacité à limiter la sélection de la résistance. Dans ce contexte, nos résultats ont confirmé l'efficacité de la combinaison Fludora® Fusion sur *An. gambiae* en présence d'allèles de résistance à la deltaméthrine, suggérant sa valeur ajoutée pour la LAV. De plus, cette combinaison semble prévenir efficacement la sélection des allèles de résistance aux pyréthrinoïdes (mutations kdr et résistance métabolique) mais aussi au néonicotinoïdes suggérant une valeur ajoutée pour la gestion de la résistance à long terme. Fludora® Fusion constitue donc un ajout important au portefeuille actuel d'insecticides utilisables en PID. Cependant, nos expérimentations ont également confirmé que l'efficacité du mélange Fludora® Fusion repose principalement sur la toxicité de la clothianidine qui semble être significativement affectée par la contamination des gîtes larvaires par des molécules utilisées en agriculture intensive. Ainsi, une vigilance particulière devrait être adoptée quant à son utilisation dans des zones géographiques où les populations de vecteurs sont exposées aux traitements pratiqués dans le cadre des activités agricoles. La question de la pré-sélection éventuelle d'allèles de résistance aux néonicotinoïdes chez les populations de vecteurs par les insecticides utilisés en agriculture apparaît ainsi d'une importance majeure en termes d'efficacité à long terme de cette nouvelle combinaison et de gestion de la résistance. La recherche de tels allèles de résistance dans les populations naturelles exposées permettrait de mieux évaluer et d'anticiper l'impact des pratiques agricoles intensives sur l'efficacité à long terme de la LAV en Afrique. Enfin, l'augmentation de tolérance à la clothianidine et à la combinaison Fludora® Fusion observée semble reposer principalement sur des variations

d'expression des enzymes de détoxification et de protéines cuticulaires. Ce phénomène suggère l'importance de la prise en compte des mécanismes de résistance métaboliques et cuticulaires dans la stratégie de déploiement du mélange Fludora® Fusion et son intégration dans les programmes de LAV. En effet, même si cette co-formulation semble prévenir la sélection des mutations de cibles tels que les mutations *kdr* ou *ace1*, la résistance à la clothianidine semble être fortement associée à l'activité de détoxification des P450s et potentiellement impactée par des allèles de résistance cuticulaires ayant un fort potentiel en terme de résistance croisée entre différentes familles d'insecticides. Ainsi une surveillance de ces mécanismes de résistance et des allèles associés (e.g. ceux identifiés dans le chapitre 2) pourrait permettre de mieux anticiper l'émergence de la résistance à Fludora® Fusion et de préserver son efficacité sur le long terme.

Conclusion et Perspectives

Les travaux de cette thèse visaient à étudier au laboratoire la dynamique de la résistance à la combinaison Fludora® Fusion et à ses deux composants chez *An. gambiae* et à identifier les mécanismes moléculaires associés. Notre expérimentation sur plus de 33 générations montre que cette combinaison présente un bon potentiel à long terme en termes de contrôles des vecteurs du paludisme et de gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes. Néanmoins, bien que l'expérimentation de sélection contrôlée que nous avons réalisée ait une certaine valeur prédictive, elle n'est sans doute pas totalement représentative des conditions naturelles. Ainsi, il apparaît maintenant important d'étudier en temps réel et à une plus grande échelle géographique la dynamique de la résistance aux néonicotinoïdes et à cette formulation tout en prenant en compte le contexte local (urbanisation, agriculture, utilisation de pesticides pour la LAV, présence d'allèles de résistance aux différentes familles d'insecticides, ...). Une telle étude pourrait s'appuyer sur des bio-essais avec la formulation Fludora® Fusion ainsi que ses deux constituants mais aussi sur un suivi des marqueurs de résistance aux PYR (*Kdr*, métabolique, cuticule) ainsi qu'aux néonicotinoïdes. Dans ce contexte, une meilleure caractérisation des mécanismes de résistance à la clothianidine (et aux néonicotinoïdes en général) identifiés par notre étude permettrait d'identifier des marqueurs pertinents pour le suivi de la dynamique de la résistance sur le terrain. En effet, nos analyses de transcriptomique par RNA-seq mériteraient d'être complétées par d'autres approches de génomique sur la lignée Clothia-R mais aussi éventuellement en population naturelle (Figure 22).

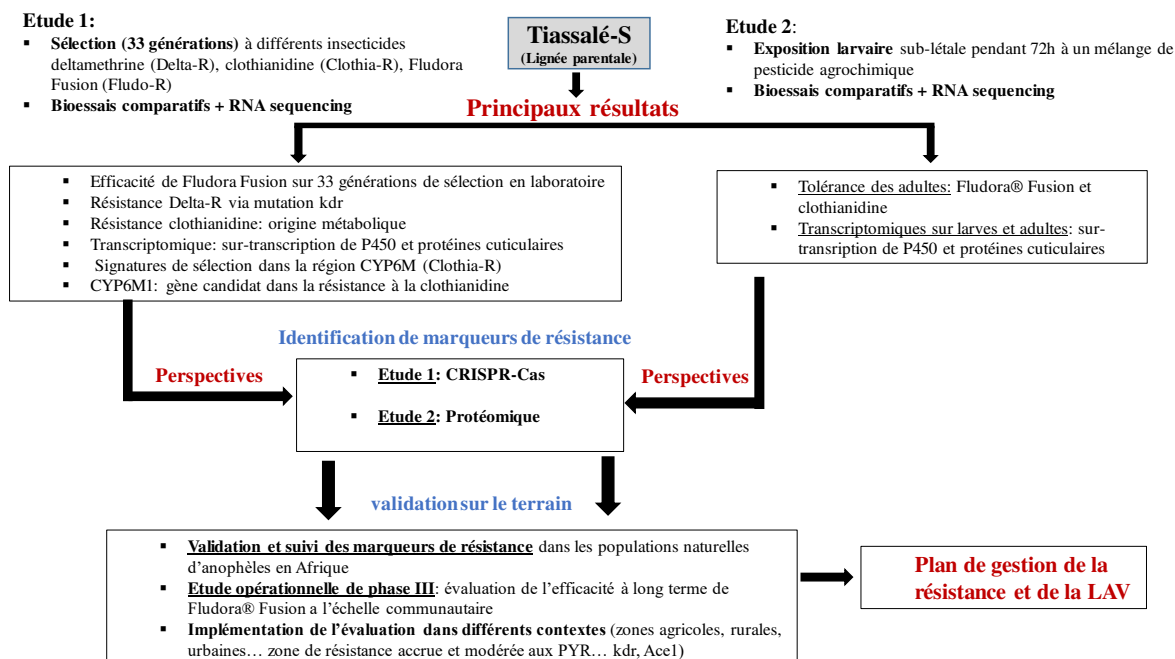


Figure 22 : Potentielles perspectives de recherche

Ces approches pourraient notamment permettre d'identifier des variations de nombre de copies des gènes (CNV) affectant des enzymes de détoxification ou des protéines cuticulaires en lien avec la résistance. En effet, les récents travaux réalisés chez les moustiques ont mis en évidence plusieurs CNV de P450 associés à la résistance aux insecticides (Cattell et al. 2019, 2020 ; Faucon et al. 2015 ; Lucas et al. 2019 ; Weetman et al. 2015). Ainsi, à l'aide d'une approche de DNA-seq (ou de qPCR ciblée), nous pourrions identifier, parmi les gènes candidats sur-transcrits par notre approche de RNA-seq, ceux qui montrent une augmentation du nombre de copies en comparaison à la lignée témoin Tiassalé-S.

De même la capacité des différents variants du P450 *CYP6M1* (et des autres P450s identifiés chez la lignée Clothia-R) à métaboliser les néonicotinoïdes mériterait d'être validée expérimentalement via leur expression en système hétérologue et l'étude *in vitro* de leur capacité à métaboliser les insecticides, ou bien par des approches de génétique inverse de type interférence à ARN (RNAi) ou d'édition génétique via la technique de CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas). La technique de RNAi pourrait notamment permettre de réprimer l'expression de ces gènes afin de déterminer leur impact sur

phénotype de résistance à la clothianidine. Cette technique est couramment utilisée chez les moustiques et a récemment permis de confirmer l'implication du gène *CPLCG5* dans la résistance à la deltaméthrine chez le moustique *Culex pipiens* (Fang et al. 2015). De même, la technique CRISPR-Cas, peut permettre d'introduire le gène étudié dans un fond génétique totalement sensible (ou réciproquement d'altérer un gène donné chez une lignée résistante) et ensuite d'évaluer par bio-essais son importance relative dans le phénotype de résistance. Cette technique a été expérimentée avec succès chez *An. gambiae* où l'introduction de l'allèle kdr ouest L1014F dans un fond génétique sensible a permis de caractériser l'importance de cette mutation dans la résistance à plusieurs pyréthrinoïdes et au DDT (Grigoraki et al. 2021).

Outre les analyses supplémentaires visant à mieux caractériser les marqueurs de résistance mentionnées ci-dessus, d'autres études pourraient également apporter des indications concernant les implications de l'introduction des néonicotinoïdes en santé publique. Par exemple, il serait intéressant d'étudier la dynamique des allèles de résistance à la clothianidine chez la lignée Clothia-R (et dans les populations naturelles) après un arrêt de la sélection et de réaliser une évaluation des coûts sur la valeur adaptative (fitness). En effet, il a été montré qu'en absence d'insecticide, les moustiques portant les allèles de résistance présentaient en général des désavantages par rapport à leurs homologues sensibles en termes de fitness, notamment une mortalité accrue au stade larvaire, mais aussi une réduction de la fécondité et de la longévité des adultes (Brito et al. 2013 ; Diniz et al. 2015 ; Djogbénou et al. 2010 ; Grigoraki et al. 2021). La caractérisation du coût génétique des allèles de résistance est importante dans le cadre de la lutte antivectorielle car elle peut permettre de mieux prévoir leur dynamique en absence de pression de sélection lors de l'implémentation de stratégies de gestion. De plus, certains coûts associés à la résistance peuvent avoir un impact sur certains traits importants des vecteurs comme par exemple leur comportement envers leurs hôtes vertébrés ou bien leur capacité vectorielle (Alout et al. 2017 ; Rivero et al. 2010).

Enfin, le potentiel de Fludora® Fusion en termes de résistance et de lutte intégrée contre les vecteurs du paludisme sur le terrain mériterait d'être approfondi par des études opérationnelles. Ainsi il serait notamment intéressant d'évaluer son efficacité sur le long terme en rotation avec d'autres familles et/ou formulations d'insecticides disponibles sur le marché. Il serait également intéressant de tester sa combinaison avec certains inhibiteurs enzymatiques tels que le piperonyl butoxyde (PBO) connu pour inhiber l'activité des P450s et dont nous avons montré un effet sur la survie des *An. gambiae* à la clothianidine en association avec l'expression

du gène *CYP6M1*. Enfin, une évaluation de la place de Fludora® Fusion par PID dans la lutte intégrée en conjonction avec d'autres stratégies de lutte tels que les moustiquaires imprégnées, les traitements larvicides des gîtes pérennes, l'aménagement des habitats (destruction des gîtes urbain de reproduction de moustiques), l'aménagement des habitats et la lutte génétique serait également pertinente.

Les résultats de la deuxième partie de cette thèse ont montré la capacité des polluants agrochimiques présents dans les gîtes larvaires des moustiques anophèles à induire une tolérance accrue au mélange Fludora® Fusion et à la clothianidine chez les adultes. L'analyse par transcriptomique a permis de suggérer que cette modification du phénotype était probablement la conséquence de variations d'expression affectant les P450 et les protéines cuticulaires. Il serait donc maintenant intéressant de pousser plus en avant ces travaux afin d'élucider le rôle des différents gènes de détoxification et protéines cuticulaires identifiés dans l'augmentation de tolérance observée. Pour cela, une approche par protéomique chez les larves et les adultes pourrait d'une part permettre de mieux caractériser les protéines différentiellement exprimées chez les larves et dont l'effet se poursuit chez les adultes et d'autre part de montrer si ces protéines sont similaires ou différentes de celles sélectionnées chez la lignée sélectionnée avec la clothianidine. Dans ce cadre une autre étude actuellement réalisée par le Centre Suisse de recherche en Côte d'Ivoire en collaboration avec notre équipe (Thèse de C. Sadia dirigée par M. Chouaibou) vise à caractériser la dynamique de la résistance à différents insecticides dont Fludora® Fusion après plus de 30 générations de sélection avec une dose létale du même mélange de composés agrochimiques que celui utilisé dans notre étude. Cette étude a notamment montré que la sélection au stade larvaire d'une lignée d'*An. gambiae* de Tiassalé par ce mélange de pesticides affectait la résistance des adultes aux insecticides via la sélection de certaines mutations de cible et l'expression des enzymes de détoxification et de certaines protéines cuticulaires (Sadia et al. in prep). Cette étude semble donc confirmer que l'exposition répétée des moustiques anophèles aux pesticides utilisés en agriculture engendre une pression de sélection significative sur la dynamique de résistance aux insecticides utilisés en lutte antivectorielle.

Bibliographiques

- Along'o, Bernard et al. 2020. "Impact of Indoor Residual Spraying with Pirimiphos-Methyl (Actellic 300CS) on Entomological Indicators of Transmission and Malaria Case Burden in Migori County, Western Kenya." *Scientific Reports* 10(1): 1–14.
- Adolfi, Adriana et al. 2019. "Functional Genetic Validation of Key Genes Conferring Insecticide Resistance in the Major African Malaria Vector, *Anopheles. gambiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(51): 25764–72.
- Agossa, Fiacre R., Gil G. Padonou, Come Z. Koukpo, et al. 2018. "Efficacy of a Novel Mode of Action of an Indoor Residual Spraying Product, SumiShield® 50WG against Susceptible and Resistant Populations of *Anopheles. gambiae* (s.l.) in Benin, West Africa." *Parasites and Vectors* 11(1): 1–13.
- Agossa, Fiacre R., Gil G. Padonou, Arsene Jacques Y.H. Fassinou, et al. 2018. "Small-Scale Field Evaluation of the Efficacy and Residual Effect of Fludora ® Fusion (Mixture of Clothianidin and Deltamethrin) against Susceptible and Resistant *Anopheles. gambiae* Populations from Benin, West Africa." *Malaria Journal* 17(1).
- Ahmad, S A, and T L Hopkins. 1993. "β-Glucosylation of Plant Phenolics by Phenol β-Glucosyltransferase in Larval Tissues of the Tobacco Hornworm, *Manduca Sexta* (L.)." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23(5): 581–89.
- Aïzoun, Nazaire et al. 2013. "Mixed-Function Oxidases and Esterases Associated with Permethrin, Deltamethrin and Bendiocarb Resistance in *Anopheles. gambiae* s.l. in the South-North Transect Benin, West Africa." *Parasites & Vectors*.
- Akogbéto, Martin C., Rousseau F. Djouaka, and Dorothée A. Kindé-Gazard. 2006. "Screening of Pesticide Residues in Soil and Water Samples from Agricultural Settings." *Malaria Journal* 5: 1–9.
- Akpesse A. Neonicotinoids and their impact on ecosystem service for agriculture and biodiversity in Africa, 2018. <https://www.interacademies.org/49037/Neonicotinoids-at-Cote-d'Ivoire-by-Akpa-Akpesse-University-Flix-Houphouët-Boigny>.

- Alout, Haoues, Benjamin Roche, Roch Kounbobr Dabiré, and Anna Cohuet. 2017. “Consequences of Insecticide Resistance on Malaria Transmission.” *PLOS Pathogens* 13(9): e1006499. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006499>.
- Amoudji, Adjovi D et al. 2019. “Insecticide Resistance Profiles of *Anopheles. gambiae* s.l. in Togo and Genetic Mechanisms Involved, during 3-Year Survey: Is There Any Need for Resistance Management?” *Malaria Journal* 18(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2813-z>.
- Andriessen, Rob et al. 2015. “Electrostatic Coating Enhances Bioavailability of Insecticides and Breaks Pyrethroid Resistance in Mosquitoes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(39): 12081–86.
- Animut, Abebe, Meshesha Balkew, and Bernt Lindtjørn. 2013. “Impact of Housing Condition on Indoor-Biting and Indoor-Resting *Anopheles Arabiensis* Density in a Highland Area, Central Ethiopia.” *Malaria Journal* 12(1): 1–8.
- Animut, Abebe, and Sebastian Horstmann. 2021. “Residual E Cacy of Fludora ®Fusion Against *Anopheles Arabiensis* in Simple Huts in Ethiopia.” *Research Square*: 1–9.
- Antonio-Nkondjio, Christophe et al. 2011. “*Anopheles. gambiae* Distribution and Insecticide Resistance in the Cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): Influence of Urban Agriculture and Pollution.” *Malaria Journal* 10: 1–13.
- Antonio-Nkondjio, Christophe et al. 2016. “Investigation of Mechanisms of Bendiocarb Resistance in *Anopheles. gambiae* Populations from the City of Yaoundé, Cameroon.” *Malaria Journal* 15(1): 1–11.
- Antony, Binu et al. 2019. “Global Transcriptome Profiling and Functional Analysis Reveal That Tissue-Specific Constitutive Overexpression of Cytochrome P450s Confers Tolerance to Imidacloprid in Palm Weevils in Date Palm Fields.” : 1–23.
- Asidi, Alex N et al. 2005. “Experimental Hut Evaluation of Bednets Treated with an Organophosphate (Chlorpyrifos-Methyl) or a Pyrethroid (Lambdacyhalothrin) Alone and in Combination against Insecticide-Resistant *Anopheles. gambiae* and *Culex Quinquefasciatus* Mosquitoes.” *Malaria Journal* 4(1): 25.

<http://www.malariajournal.com/content/4/1/25>.

- Assouho, Konan F et al. 2019. “Vector / Pathogen / Host Interaction , Transmission Vectorial Transmission of Malaria in Major Districts of Côte d ’ Ivoire.” (X): 1–7.
- Atieli, Harrysone, Diana Menya, Andrew Githeko, and Thomas Scott. 2009. “House Design Modifications Reduce Indoor Resting Malaria Vector Densities in Rice Irrigation Scheme Area in Western Kenya.” *Malaria Journal* 8(1): 1–9.
- Atoyebi, Seun M. et al. 2020. “Investigating the Molecular Basis of Multiple Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector *Anopheles Funestus* (Sensu Stricto) from Akaka-Remo, Ogun State, Nigeria.” *Parasites and Vectors* 13(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04296-8>.
- Awolola, T. S. et al. 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(11): 1139–45.
- Balabanidou, Vasileia et al. 2016. “Cytochrome P450 Associated with Insecticide Resistance Catalyzes Cuticular Hydrocarbon Production in *Anopheles. gambiae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(33): 9268–73. <https://www.pnas.org/content/113/33/9268>.
- Balabanidou, Vasileia, Linda Grigoraki, and John Vontas. 2018. “Insect Cuticle: A Critical Determinant of Insecticide Resistance.” *Current Opinion in Insect Science* 27: 68–74.
- Balabaskaran Nina, Praveen et al. 2017. “Dynamics of Plasmodium Vivax Sporogony in Wild *Anopheles Stephensi* in a Malaria-Endemic Region of Western India.” *Malaria Journal* 16(1): 1–12.
- Bass, Chris et al. 2007. “Detection of Knockdown Resistance (Kdr) Mutations in *Anopheles. gambiae*: A Comparison of Two New High-Throughput Assays with Existing Methods.” *Malaria Journal* 6: 1–14.
- Bass, Chris et al. 2011. “Mutation of a Nicotinic Acetylcholine Receptor b Subunit Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus Persicae*.” *BMC Neuroscience* 12: 51.

- Bass, Chris et al. 2013. "Gene Amplification and Microsatellite Polymorphism Underlie a Recent Insect Host Shift." 110(48).
- Bass, Chris, Ian Denholm, Martin S. Williamson, and Ralf Nauen. 2015. "The Global Status of Insect Resistance to Neonicotinoid Insecticides." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: 78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>.
- Bawin, T. et al. 2015. "La Lutte Contre Les Moustiques (Diptera: Culicidae): Diversité Des Approches et Application Du Contrôle Biologique." *The Canadian Entomologist* 147(4): 476–500.
- Beeman, Richard W., and Barbara A. Schmidt. 1982. "Biochemical and Genetic Aspects of Malathion-Specific Resistance in the Indianmeal Moth (Lepidoptera: Pyralidae)1." *Journal of Economic Entomology* 75(6): 945–49. <http://academic.oup.com/jee/article/75/6/945/2213658/Biochemical-and-Genetic-Aspects-of> (October 17, 2020).
- Behjati, Sam, and Patrick S. Tarpey. 2013. "What Is next Generation Sequencing?" *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition* 98(6): 236–38.
- Beier, John C. et al. 2012. "Attractive Toxic Sugar Bait (ATSB) Methods Decimate Populations of Anopheles Malaria Vectors in Arid Environments Regardless of the Local Availability of Favoured Sugar-Source Blossoms." *Malaria Journal* 11: 1–7.
- Benedict, Mark Q., and Alan S. Robinson. 2003. "The First Releases of Transgenic Mosquitoes: An Argument for the Sterile Insect Technique." *Trends in Parasitology* 19(8): 349–55.
- Bhatt, S et al. 2016. "Europe PMC Funders Group The Effect of Malaria Control on Plasmodium Falciparum in Africa between 2000 and 2015." 526(7572): 207–11.
- Bhatt, Samir et al. 2015. "Coverage and System Efficiencies of Insecticide-Treated Nets in Africa from 2000 to 2017." *eLife* 4(DECEMBER2015): 1–37.
- Bock, Karl Walter. 2003. "Vertebrate UDP-Glucuronosyltransferases: Functional and Evolutionary Aspects." *Biochemical Pharmacology* 66(5): 691–96.
- Bonizzoni, Mariangela et al. 2012. "Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-

- Resistant and -Susceptible *Anopheles. gambiae* Mosquitoes from Kenya by RNA-Seq.” *PLoS ONE* 7(9): 1–11.
- Bonizzoni, Mariangela et al. 2015. “RNA-Seq Analyses of Changes in the *Anopheles. gambiae* Transcriptome Associated with Resistance to Pyrethroids in Kenya: Identification of Candidate-Resistance Genes and Candidate-Resistance SNPs.” *Parasites and Vectors* 8(1): 1–13. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1083-z>.
- Bourtzis, Kostas, Rosemary Susan Lees, Jorge Hendrichs, and Marc J.B. Vreysen. 2016. “More than One Rabbit out of the Hat: Radiation, Transgenic and Symbiont-Based Approaches for Sustainable Management of Mosquito and Tsetse Fly Populations.” *Acta Tropica* 157: 115–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.009>.
- Bouvier, Jean Charles et al. 1998. “Enzymatic Diagnosis of Resistance to Deltamethrin in Diapausing Larvae of the Codling Moth, *Cydia Pomonella* (L.).” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 39(2): 55–64.
- Bouyer, Jérémy, and Thierry Lefrançois. 2014. “Boosting the Sterile Insect Technique to Control Mosquitoes.” *Trends in Parasitology* 30(6): 271–73.
- Boyer, Sébastien et al. 2006. “Do Herbicide Treatments Reduce the Sensitivity of Mosquito Larvae to Insecticides?” *Chemosphere* 65(4): 721–24.
- Bradley, John et al. 2013. “Reduced Prevalence of Malaria Infection in Children Living in Houses with Window Screening or Closed Eaves on Bioko Island, Equatorial Guinea.” *PLoS ONE* 8(11): 1–7.
- Brito, Luiz Paulo et al. 2013. “Assessing the Effects of *Ae. aegypti* Kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost.” *PLoS ONE* 8(4).
- Brogdon, W, and A Chan. 2010. “Guidelines for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay/Methods in *Anopheles* Research.” *CDC Atlanta USA: CDC Technical Report*.
- Brooke, B.D. et al. 2001. “Bioassay and Biochemical Analyses of Insecticide Resistance in Southern African *Anopheles Funestus* (Diptera: Culicidae).” *Bulletin of Entomological Research* 91(04): 265–72.

- Buss, D. S., and A. Callaghan. 2008. "Interaction of Pesticides with P-Glycoprotein and Other ABC Proteins: A Survey of the Possible Importance to Insecticide, Herbicide and Fungicide Resistance." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90(3): 141–53.
- Busvine, J R. 1951. "1951 Nature Publishing Group." *Nat.* 168: 1039–40.
- Camara, Soromane, Alou Ludovic Phamien Ahoua, et al. 2018. "Efficacy of Interceptor®G2, a New Long-Lasting Insecticidal Net against Wild Pyrethroid-Resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire: A Semi-Field Trial." *Parasite* 25.
- Camara, Soromane, Alphonsine A Koffi, et al. 2018. "Mapping Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* (s.l.) from Côte d'Ivoire." *Parasites & Vectors* 11(1): 19. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2546-1>.
- Carnevale, Pierre, and Vincent Robert. 2009. Les anophèles *Les Anophèles*.
- Carrasco, David et al. 2019. "Behavioural Adaptations of Mosquito Vectors to Insecticide Control." *Current Opinion in Insect Science* 34: 48–54.
- Cattel, Julien et al. 2019. "Combining Genetic Crosses and Pool Targeted DNA-seq for Untangling Genomic Variations Associated with Resistance to Multiple Insecticides in the Mosquito *Ae. aegypti* ." *Evolutionary Applications*.
- Cattel, Julien et al. 2020. "A Genomic Amplification Affecting a Carboxylesterase Gene Cluster Confers Organophosphate Resistance in the Mosquito *Ae. aegypti*: From Genomic Characterization to High-Throughput Field Detection." *Evolutionary Applications*: 0–2.
- Chanda, Emmanuel et al. 2013. 'Efficacy of ACTELLIC 300 CS, Pirimiphos Methyl, for Indoor Residual Spraying in Areas of High Vector Resistance to Pyrethroids and Carbamates in Zambia'. *Journal of Medical Entomology* 50(6): 1275–81.
- Chanda, Emmanuel et al. 2015. "Strengthening Tactical Planning and Operational Frameworks for Vector Control: The Roadmap for Malaria Elimination in Namibia." *Malaria Journal* 14(1): 1–11.
- Chandra, G, I Bhattacharjee, S N Chatterjee, and A Ghosh. 2008. 'Mosquito Control by Larvivorous Fish'. (January): 13–27.

- Chandre, F et al. 1999. "Status of Pyrethroid Resistance in *Anopheles. gambiae* Sensu Lato." 77(3): 230–34.
- Chandre, Fabrice et al. 2000. "Modifications of Pyrethroid Effects Associated with Kdr Mutation in *Anopheles. gambiae*."
- Chang, Kyu Sik et al. 2016. "Distribution of Malaria Vectors and Incidence of Vivax Malaria at Korean Army Installations near the Demilitarized Zone, Republic of Korea." *Malaria Journal* 15(1): 1–11.
- Chevin, Luis Miguel, and Ary A. Hoffmann. 2017. "Evolution of Phenotypic Plasticity in Extreme Environments." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372(1723).
- Chiu, Ting-Lan, Zhimou Wen, Sanjeewa G. Rupasinghe, and Mary A. Schuler. 2008. "Comparative Molecular Modeling of *An. gambiae* CYP6Z1, a Mosquito P450 Capable of Metabolizing DDT." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Chouaïbou, Mouhamadou et al. 2014. "Synergist Bioassays: A Simple Method for Initial Metabolic Resistance Investigation of Field *Anopheles. gambiae* s.l. Populations." *Acta Tropica* 130(1): 108–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.020>.
- Chouaïbou, Mouhamadou S et al. 2016. "Influence of the Agrochemicals Used for Rice and Vegetable Cultivation on Insecticide Resistance in Malaria Vectors in Southern Côte d'Ivoire." *Malaria Journal* 15(1): 1–12.
- Chouaïbou, Mouhamadou Seïdou et al. 2019. "Evidence of Insecticide Resistance Selection in Wild *Anopheles coluzzii* Mosquitoes Due to Agricultural Pesticide Use." 2: 1–8.
- Chukwuekezie, Okechukwu et al. 2020. "Resistance Status of *Anopheles. gambiae* (s.l.) to Four Commonly Used Insecticides for Malaria Vector Control in South-East Nigeria." *Parasites and Vectors* 13(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04027-z>.
- Cibulskis, Richard E et al. 2016. "Malaria: Global Progress 2000 - 2015 and Future Challenges." *Infectious Diseases of Poverty* 5(1): 1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0151-8>.

- Clements, Alan Neville. 1992. 1 *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction*. Chapman & Hall London.
- Coetzee, Maureen et al. 2013. “*Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, New Members of the *Anopheles. gambiae* Complex.” *Zootaxa* 3619(3): 246–74.
- Cohuet, Anna et al. 2004. “High Malaria Transmission Intensity Due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a Village of Savannah–Forest Transition Area in Cameroon .” *Journal of Medical Entomology* 41(5): 901–5.
- Coleman, M., S. Casimiro, J. Hemingway, and B. Sharp. 2008. “Operational Impact of DDT Reintroduction for Malaria Control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique.” *Journal of Medical Entomology* 45(5): 885–90.
- Coluzzi, M. et al. 2002. “A Polytene Chromosome Analysis of the *Anopheles. gambiae* Species Complex.” *Science* 298(5597): 1415–18.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1077769>.
- Contreras-Perera, Yamili et al. 2020. “Impact of Deltamethrin Selection on Kdr Mutations and Insecticide Detoxifying Enzymes in *Ae. aegypti* from Mexico.” *Parasites and Vectors* 13(1): 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04093-3>.
- Corbel, V. et al. 2007. “Multiple Insecticide Resistance Mechanisms in *Anopheles. gambiae* and *Culex Quinquefasciatus* from Benin, West Africa.” *Acta Tropica* 101(3): 207–16.
- Corbel, Vincent et al. 2012. “Combination of Malaria Vector Control Interventions in Pyrethroid Resistance Area in Benin: A Cluster Randomised Controlled Trial.” *The Lancet Infectious Diseases* 12(8): 617–26. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70081-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70081-6).
- Corbel, Vincent, and Raphael N Guessan. 2013. “Distribution , Mechanisms , Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors : A Pragmatic Review.” *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*: 813.
<http://dx.doi.org/10.5772/56117%0Ahttp://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors>.
- Cornman, R. Scott et al. 2008. “Annotation and Analysis of a Large Cuticular Protein Family with the R&R Consensus in *Anopheles. gambiae*.” *BMC Genomics* 9: 1–16.

- Da, DF; et al. 2013. “Anopheles Rufipes Remains a Potential Malaria Vector after the First Detection of Infected Specimens in 1960 in Burkina Faso.” *Journal of Infectious Diseases and Therapy* 01(03): 3–4.
- Daborn, P. et al. 2001. “DDT Resistance in *Drosophila* Correlates with Cyp6g1 Over-Expression and Confers Cross-Resistance to the Neonicotinoid Imidacloprid.” *Molecular Genetics and Genomics* 266(4): 556–63.
- Dambach, Peter et al. 2019. “Reduction of Malaria Vector Mosquitoes in a Large-Scale Intervention Trial in Rural Burkina Faso Using Bti Based Larval Source Management.” *Malaria Journal* 18(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2951-3>.
- Darriet, F., Robert V., N. Tho Vien, and P. Carnevale. 1985. “Pièges- Fenêtres WHO_MAL_84.1008_fre.Pdf.”
- Darriet, Frédéric, and Fabrice Chandre. 2011. “Combining Piperonyl Butoxide and Dinotefuran Restores the Efficacy of Deltamethrin Mosquito Nets Against Resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae).” *Journal of Medical Entomology*.
- Darriet, Frédéric, and Fabrice Chandre. 2013. “Efficacy of Six Neonicotinoid Insecticides Alone and in Combination with Deltamethrin and Piperonyl Butoxide against Pyrethroid-Resistant *Ae. aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae).” *Pest Management Science* 69(8).
- David, J. P. et al. 2005. “The *Anopheles gambiae* Detoxification Chip: A Highly Specific Microarray to Study Metabolic-Based Insecticide Resistance in Malaria Vectors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(11): 4080–84. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409348102>.
- David, J. P. et al. 2006. “Involvement of Cytochrome P450 Monooxygenases in the Response of Mosquito Larvae to Dietary Plant Xenobiotics.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- David, J P, H M Ismail, A Chandor-Proust, and M J I Paine. 2013. “Role of Cytochrome P450s in Insecticide Resistance: Impact on the Control of Mosquito-Borne Diseases and Use of Insecticides on Earth.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*

Sciences 368(1612):20120429. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2012.0429>.

David, Jean-Philippe et al. 2014. “Comparative Analysis of Response to Selection with Three Insecticides in the Dengue Mosquito *Ae. aegypti* Using mRNA Sequencing.” *BMC Genomics*.

David, Jean Philippe et al. 2010. “Transcriptome Response to Pollutants and Insecticides in the Dengue Vector *Ae. aegypti* Using Next-Generation Sequencing Technology.” *BMC Genomics* 11(1).

Dermauw, Wannes, and Thomas Van Leeuwen. 2014. “The ABC Gene Family in Arthropods: Comparative Genomics and Role in Insecticide Transport and Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45(1): 89–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>.

Després, Laurence, Jean Philippe David, and Christiane Gallet. 2007. “The Evolutionary Ecology of Insect Resistance to Plant Chemicals.” *Trends in Ecology and Evolution* 22(6): 298–307.

Devonshire, A L, G D Moores, and R H French-Constant. 1986. “Detection of Insecticide Resistance by Immunological Estimation of Carboxylesterase Activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and Cross Reaction of the Antiserum with *Phorodon humuli* (Schränk) (Hemiptera: Aphididae).” *Bulletin of Entomological Research* 76(1): 97–107.

Diabaté, Abdoulaye et al. 2002. “The Role of Agricultural Use of Insecticides in Resistance to Pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.” *Am J Trop Med Hyg* 67(6): 617–22.

Diniz, Diego Felipe Araujo et al. 2015. “Fitness Cost in Field and Laboratory *Ae. aegypti* Populations Associated with Resistance to the Insecticide Temephos.” *Parasites and Vectors* 8(1): 1–15. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1276-5>.

Djogbénou, Luc et al. 2008. “Identification and Geographic Distribution of the ACE-1R Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(2): 298–302.

- Djogbénou, Luc et al. 2009. “Ace-1 Duplication in *Anopheles. gambiae*: A Challenge for Malaria Control.” *Malaria Journal* 8(1): 1–6.
- Djogbénou, Luc, Valérie Noel, and Philip Agnew. 2010. “Costs of Insensitive Acetylcholinesterase Insecticide Resistance for the Malaria Vector *Anopheles. gambiae* Homozygous for the G119S Mutation.” *Malaria Journal* 9(1): 1–8.
- Djouaka, Rousseau F. et al. 2007. “Does the Spillage of Petroleum Products in *Anopheles* Breeding Sites Have an Impact on the Pyrethroid Resistance?” *Malaria Journal* 6: 1–10.
- Djouaka, Rousseau F et al. 2008. “Expression of the Cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 Are Significantly Elevated in Multiple Pyrethroid Resistant Populations of *Anopheles. gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.” *BMC Genomics* 9: 1–10.
- Dong, Ke, and Jeffrey G Scott. 1994. “Linkage of Kdr-Type Resistance and the Para-Homologous Sodium Channel Gene in German Cockroaches (*Blattella Germanica*).” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24(7): 647–54.
- Donnelly, Martin J et al. 2009. “Does Kdr Genotype Predict Insecticide-Resistance Phenotype in Mosquitoes?” *Trends in Parasitology* 25(5): 213–19.
- Du, W et al. 2005. “Independent Mutations in the *Rdl* Locus Confer Dieldrin Resistance to *An. gambiae* and *An. Arabiensis*.” *Insect Mol Biol* 14(2): 179–83.
- Dunbar, Mike W et al. 2019. “Efficacy of Novel Indoor Residual Spraying Methods Targeting Pyrethroid-Resistant *Ae. aegypti* within Experimental Houses.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(2): 1–12.
- Duvallet, Gérard, Didier Fontenille, and Vincent Robert. 2017. IRD Éditions, Éditions Quae *Entomologie Médicale et Vétérinaire*.
- Edi, Constant et al. 2012. “Multiple-Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* Mosquitoes, Southern Côte d’Ivoire.” *Emerging Infectious Diseases* 18(9): 1508–11.
- Edi, Constant et al. 2017. “First Detection of N1575Y Mutation in Pyrethroid Resistant *Anopheles. gambiae* in Southern Côte d’Ivoire.” *Wellcome Open Research* 2(0): 71. <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-71/v1>.

- Edi, Constant V. et al. 2014. "CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles. gambiae*." *PLoS Genetics* 10(3).
- Elanga-Ndille, Emmanuel et al. 2019. "The G119s Acetylcholinesterase (Ace-1) Target Site Mutation Confers Carbamate Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae* from Cameroon: A Challenge for the Coming Irs Implementation." *Genes* 10(10): 1–14.
- Enayati, A. A., H. Ranson, and J. Hemingway. 2005. "Insect Glutathione Transferases and Insecticide Resistance." *Insect Molecular Biology* 14(1): 3–8.
- Epis, Sara et al. 2014. "ABC Transporters Are Involved in Defense against Permethrin Insecticide in the Malaria Vector *Anopheles Stephensi*." *Parasites and Vectors* 7(1): 1–7.
- Essandoh, John, Alexander E Yawson, and David Weetman. 2013. "Acetylcholinesterase (Ace-1) Target Site Mutation 119S Is Strongly Diagnostic of Carbamate and Organophosphate Resistance in *Anopheles. gambiae* s.s. and *Anopheles coluzzii* across Southern Ghana." *Malaria Journal* 12(1): 1–10.
- Fang, Fujin et al. 2015. "The Cuticle Proteins: A Putative Role for Deltamethrin Resistance in *Culex Pipiens Pallens*." *Parasitology Research* 114(12): 4421–29.
- Faucon, Frederic et al. 2015. "Identifying Genomic Changes Associated with Insecticide Resistance in the Dengue Mosquito *Ae. aegypti* by Deep Targeted Sequencing." *Genome Research*.
- Ffrench-Constant, Richard H., Phillip J. Daborn, and Gaelle Le Goff. 2004. "The Genetics and Genomics of Insecticide Resistance." *Trends in Genetics* 20(3): 163–70.
- Ffrench-Constant, Richard H, Barry Pittendrigh, Ashley Vaughan, and Nicola Anthony. 1998. "Why Are There so Few Resistance-Associated Mutations in Insecticide Target Genes?" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353(1376): 1685–93.
- Figueira-Mansur, J. et al. 2013. "Silencing of P-Glycoprotein Increases Mortality in Temephos-Treated *Ae. aegypti* Larvae." *Insect Molecular Biology* 22(6): 648–58.

- Fillinger, Ulrike, Bryson Ndenga, Andrew Githeko, and Steven W. Lindsay. 2009. "Integrated Malaria Vector Control with Microbial Larvicides and Insecticide-Treated Nets in Western Kenya: A Controlled Trial." *Bulletin of the World Health Organization* 87(9): 655–65.
- Fodjo, Behi K. et al. 2018. "Insecticides Resistance Status of *An. gambiae* in Areas of Varying Agrochemical Use in Côte D'Ivoire." *BioMed research international* 2018: 2874160.
- Fofana, D. et al. 2010. "Diversité Spécifique et Nuisance Culicidienne Dans Les Villages de N'gatty et d'Allaba En Milieu Côtier Lagunaire de Côte-d'Ivoire." *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 103(5): 333–39.
- Fongnikin, Augustin et al. 2020. "Efficacy of Fludora®Fusion (a Mixture of Deltamethrin and Clothianidin) for Indoor Residual Spraying against Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors: Laboratory and Experimental Hut Evaluation." *Parasites and Vectors* 13(1).
- Fossog Tene, Billy et al. 2013. "Resistance to DDT in an Urban Setting: Common Mechanisms Implicated in Both M and S Forms of *Anopheles. gambiae* in the City of Yaoundé Cameroon." *PLoS ONE* 8(4).
- Fouet, Caroline et al. 2020. "Resistance of *An. gambiae* to the New Insecticide Clothianidin Associated with Unrestricted Use of Agricultural Neonicotinoids in Yaounde, Cameroon." *bioRxiv*: 2020.08.06.239509. <https://doi.org/10.1101/2020.08.06.239509>.
- Frischknecht, Friedrich et al. 2004. "Imaging Movement of Malaria Parasites during Transmission by *Anopheles* Mosquitoes." *Cellular Microbiology* 6(7): 687–94.
- Fryxell, Rebecca T. et al. 2012. "The Knockdown Resistance Mutation and Knockdown Time in *Anopheles. gambiae* Collected from Mali Evaluated through a Bottle Bioassay and a Novel Insecticide-Treated Net Bioassay." *Journal of the American Mosquito Control Association* 28(2): 119–22.
- Furnival-Adams, Joanna E.C. et al. 2020. "Indoor Use of Attractive Toxic Sugar Bait in Combination with Long-Lasting Insecticidal Net against Pyrethroid-Resistant *Anopheles. gambiae*: An Experimental Hut Trial in Mbé, Central Côte d'Ivoire." *Malaria Journal* 19(1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3095-1>.

- Fuseini, Godwin et al. 2019. "Evaluation of the Residual Effectiveness of Fludora™ Fusion WP-SB, a Combination of Clothianidin and Deltamethrin, for the Control of Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors on Bioko Island, Equatorial Guinea." *Acta Tropica* 196: 42–47.
- Galizi, Roberto et al. 2016. "A CRISPR-Cas9 Sex-Ratio Distortion System for Genetic Control." *Scientific Reports* 6(April): 2–6.
- Gayathri, V., and P. Balakrishna Murthy. 2006. "Reduced Susceptibility to Deltamethrin and Kdr Mutation in *Anopheles Stephensi* Liston, a Malaria Vector in India." *Journal of the American Mosquito Control Association* 22(4): 678–88.
- Ghalambor, C. K., J. K. McKay, S. P. Carroll, and D. N. Reznick. 2007. "Adaptive versus Non-Adaptive Phenotypic Plasticity and the Potential for Contemporary Adaptation in New Environments." *Functional Ecology* 21(3): 394–407.
- Ghalambor, C K, J K McKay, S P Carroll, and D N Reznick. 2007. "Adaptive versus Non-Adaptive Phenotypic Plasticity and the Potential for Contemporary Adaptation in New Environments." *Functional Ecology* 21(3): 394–407.
- Ghalambor, Cameron K. et al. 2015. "Non-Adaptive Plasticity Potentiates Rapid Adaptive Evolution of Gene Expression in Nature." *Nature* 525(7569): 372–75.
- Le Goff, G et al. 2003. "Microarray Analysis of Cytochrome P450 Mediated Insecticide Resistance in *Drosophila*." 33: 701–8.
- Le Goff, Gaëlle et al. 2006. "Xenobiotic Response in *Drosophila Melanogaster*: Sex Dependence of P450 and GST Gene Induction." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36(8): 674–82.
- Gomes, Fabio M. et al. 2017. "Effect of Naturally Occurring *Wolbachia* in *Anopheles. gambiae* s.l. Mosquitoes from Mali on *Plasmodium Falciparum* Malaria Transmission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(47): 12566–71.
- Gomes, Fabio M., and Carolina Barillas-Mury. 2018. "Infection of Anopheline Mosquitoes with *Wolbachia*: Implications for Malaria Control." *PLoS Pathogens* 14(11): 1–6.

- Grau-Bové, Xavier et al. 2020. “Resistance to Pirimiphos-Methyl in West African Anopheles Is Spreading via Duplication and Introgression of the Ace1 Locus.” *bioRxiv*: 1–47.
- Grigoraki, Linda et al. 2015. “Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes Albopictus*.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(5): 1–17.
- Grigoraki, Linda et al. 2021. “CRISPR/Cas9 Modified *An. gambiae* Carrying Kdr Mutation L1014F Functionally Validate Its Contribution in Insecticide Resistance and Interaction with Metabolic Enzymes. Functional.” *bioRxiv*.
- Grimm, Scott W. et al. 2009. “The Conduct of in Vitro Studies to Address Time-Dependent Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes: A Perspective of the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America.” *Drug Metabolism and Disposition* 37(7): 1355–70.
- Grossman, G L et al. 2001. “Germline Transformation of the Malaria Vector, *Anopheles. gambiae*, with the PiggyBac Transposable Element.” *Insect Molecular Biology* 10(6): 597–604.
- Guelbeogo, Wamdaogo M et al. 2012. “Three Years of Insecticide Resistance Monitoring in *Anopheles. gambiae* in Burkina Faso: Resistance on the Rise?” *Malaria Journal* 11(1): 232.
- Guillet, P et al. 2001. “Long-Lasting Treated Mosquito Nets: A Breakthrough in Malaria Prevention.” *Bulletin of the World Health Organization* 79(10): 998.
- Hamada, Akira et al. 2020. “Differential Metabolism of Neonicotinoids by Brown Planthopper , *Nilaparvata Lugens* , CYP6ER1 Variants.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 165(February): 104538. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.004>.
- Hammond, Andrew et al. 2016. “A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito Vector *Anopheles. gambiae*.” *Nature Biotechnology* 34(1): 78–83.
- Harbach, R E. 2004. “The Classification of Genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): A Working Hypothesis of Phylogenetic Relationships.” *Bulletin of Entomological Research* 94(06). http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007485304000562.

- Hargreaves, K et al. 2000. "Anopheles Funestus Resistant to Pyrethroid Insecticides in South Africa." *Medical and Veterinary Entomology* 14(2): 181–89.
- Haubruge, Éric, and Marcel Amichot. 1998. "Les Mécanismes Responsables de La Résistance Aux Insecticides Chez Les Insectes et Les Acariens." *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 2(3): 161–74.
- Hauenerland, Norbert H., and William S. Bowers. 1986. "Binding of Insecticides to Lipophorin and Arylphorin, Two Hemolymph Proteins of *Heliothis Zea*." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 3(1): 87–96.
- Hemingway, Janet et al. 2016. "HHS Public Access." 387(10029): 1785–88.
- Hemingway, Janet, Nicola J Hawkes, Lynn McCarroll, and Hilary Ranson. 2004. "The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34(7): 653–65.
- Hemingway, Janet, and Hilary Ranson. 2000. "Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease." : 371–91.
- Hougaard, J.-M. et al. 2003. "Efficacy of Mosquito Nets Treated with Insecticide Mixtures or Mosaics against Insecticide Resistant *Anopheles. gambiae* and *Culex Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Côte d'Ivoire ." *Bulletin of Entomological Research* 93(6): 491–98.
- Hougaard, J M et al. 1993. "Criteria for the Selection of Larvicides by the Onchocerciasis Control Programme in West Africa." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87(5): 435–42.
- Hougaard, Jean Marc et al. 2003. "Comparative Performances, under Laboratory Conditions, of Seven Pyrethroid Insecticides Used for Impregnation of Mosquito Nets." *Bulletin of the World Health Organization* 81(5): 324–33.
- Ibrahim, Sulaiman S. et al. 2016. "The P450 CYP6Z1 Confers Carbamate/Pyrethroid Cross-Resistance in a Major African Malaria Vector beside a Novel Carbamate-Insensitive N485I Acetylcholinesterase-1 Mutation." *Molecular ecology* 25(14): 3436–52.

- Ingham, V. A., S. Wagstaff, and H. Ranson. 2018. “Transcriptomic Meta-Signatures Identified in *Anopheles. gambiae* Populations Reveal Previously Undetected Insecticide Resistance Mechanisms.” *Nature Communications* 9(1): 5282. <http://www.nature.com/articles/s41467-018-07615-x>.
- Ingham, Victoria A. et al. 2020. “A Sensory Appendage Protein Protects Malaria Vectors from Pyrethroids.” *Nature* 577(7790): 376–80. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1864-1>.
- Ingham, Victoria A et al. 2014. “Dissecting the Organ Specificity of Insecticide Resistance Candidate Genes in *Anopheles. gambiae*: Known and Novel Candidate Genes.” *BMC Genomics* 15(1): 1–9.
- Jasinskiene, Nijole et al. 1998. “Stable Transformation of the Yellow Fever Mosquito, *Ae. aegypti*, with the Hermes Element from the Housefly.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(7): 3743–47.
- Jin, Ruoheng et al. 2019. “Overexpression of CYP6ER1 Associated with Clothianidin Resistance in *Nilaparvata Lugens* (Stål).” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 154(October 2018): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.12.008>.
- Jones, Christopher M et al. 2012. “Footprints of Positive Selection Associated with a Mutation (N1575Y) in the Voltage-Gated Sodium Channel of *Anopheles. gambiae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(17): 6614–19. <http://www.pnas.org/content/109/17/6614.short>.
- Jones, Kate E et al. 2008. “Global Trends in Emerging Infectious Diseases.” *Nature* 451(7181): 990–93.
- Josling, Gabrielle A, and Manuel Llinás. 2015. “Sexual Development in Plasmodium Parasites: Knowing When It’s Time to Commit.” *Nature Reviews Microbiology* 13(9): 573–87.
- Joußen, Nicole, David G Heckel, Matthias Haas, and Ingolf Schuphan. 2008. “Metabolism of Imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 Expressed in Cell Cultures of *Nicotiana Tabacum* Suggests Detoxification of These Insecticides in Cyp6g1 -Overexpressing Strains of *Drosophila Melanogaster* , Leading to Resistance.” 73(July 2007): 65–73.
- Kamaraju, Raghavendra et al. 2021. “Small-Scale Field Evaluation of the Entomological

- Efficacy and the Residual Activity of Fludora® Fusion WP-SB Indoor Residual Spraying against *Anopheles Culicifacies* s.l. in Gujarat, India.” *Tropical Medicine and International Health* 1.
- Kanyangarara, Mufaro et al. 2016. “Reduction in Malaria Incidence Following Indoor Residual Spraying with Actellic 300 CS in a Setting with Pyrethroid Resistance: Mutasa District, Zimbabwe.” *PLoS ONE* 11(3): 1–12.
- Kaplanoglu, Emine, Patrick Chapman, Ian M. Scott, and Cam Donly. 2017. “Overexpression of a Cytochrome P450 and a UDP-Glycosyltransferase Is Associated with Imidacloprid Resistance in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa Decemlineata*.” *Scientific Reports* 7(1): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01961-4>.
- Karunaratne, S H P P, and J Hemingway. 2001. 79 Bulletin of the World Health Organization *Malathion Resistance and Prevalence of the Malathion Carboxylesterase Mechanism in Populations of Mosquito Vectors of Disease in Sri Lanka*.
- Karunker, Iris et al. 2009. “Structural Model and Functional Characterization of the Bemisia Tabaci CYP6CM1vQ, a Cytochrome P450 Associated with High Levels of Imidacloprid Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(10): 697–706.
- Katambo M. Neonicotinoids and their impact on ecosystem services in Tanzania, 2018. [http://www.interacademies.org/49301/Neonicotinoids in Tanzania by Mkabwa-Katambo](http://www.interacademies.org/49301/Neonicotinoids%20in%20Tanzania%20by%20Mkabwa-Katambo)
- Kawada, Hitoshi et al. 2011. “Multimodal Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors, *Anopheles. gambiae* s.s., *Anopheles Arabiensis*, and *Anopheles Funestus* s.s. in Western Kenya.” *PLoS ONE* 6(8).
- Kawada, Hitoshi et al. 2014. “Insecticidal and Repellent Activities of Pyrethroids to the Three Major Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors in Western Kenya.” *Parasites and Vectors* 7(1): 1–9.
- Killeen, Gerry F. et al. 2017. “Control of Malaria Vector Mosquitoes by Insecticide-Treated Combinations of Window Screens and Eave Baffles.” *Emerging Infectious Diseases* 23(5): 782–89.
- Killeen, Gerry F., and Hilary Ranson. 2018. “Insecticide-Resistant Malaria Vectors Must Be

- Tackled.” *The Lancet* 391(10130): 1551–52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30844-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30844-4).
- Killeen, Gerry F. 2014. “Characterizing, Controlling and Eliminating Residual Malaria Transmission.” *Malaria Journal* 13(1).
- Kleinschmidt, Immo et al. 2009. “Combining Indoor Residual Spraying and Insecticide-Treated Net Interventions Immo.” *Europe PMC Funders Group* 45(5): 619–20.
- Kostaropoulos, Iason et al. 2001. “Glutathione S–Transferase in the Defence against Pyrethroids in Insects.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31(4): 313–19. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174800001235>.
- Krempl, Corinna et al. 2016. “Potential Detoxification of Gossypol by UDP-Glycosyltransferases in the Two Heliothine Moth Species *Helicoverpa Armigera* and *Heliothis Virescens*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 71: 49–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.02.005>.
- Kweka, Eliningaya et al. 2018. “Novel Indoor Residual Spray Insecticide with Extended Mortality Effect: A Case of SumiShield 50WG Against Wild Resistant Populations of *Anopheles Arabiensis* in Northern Tanzania.” *Global Health Science and Practice* 6(4): 758–65.
- Kwiatkowska, Rachel M 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(1): 98–106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.036>.
- Kyrou, Kyros et al. 2018. “A CRISPR-Cas9 Gene Drive Targeting Doublesex Causes Complete Population Suppression in Caged *Anopheles. gambiae* Mosquitoes.” *Nature biotechnology* 36(11): 1062–66.
- Labbé, Pierrick et al. 2007. “Forty Years of Erratic Insecticide Resistance Evolution in the Mosquito *Culex Pipiens*.” *PLoS Genetics* 3(11): 2190–99.
- Labbé, Pierrick et al. 2014. “Gene-Dosage Effects on Fitness in Recent Adaptive Duplications: ACE-1 in the Mosquito *Culex Pipiens*.” *Evolution* 68(7): 2092–2101.

- Lee, Won-Ja et al. 2007. “Anopheles Kleini, Anopheles Pullus, and Anopheles Sinensis: Potential Vectors of Plasmodium Vivax in the Republic of Korea.” *Journal of Medical Entomology* 44(6): 1086–90.
- Lee, Y. et al. 2013. “Spatiotemporal Dynamics of Gene Flow and Hybrid Fitness between the M and S Forms of the Malaria Mosquito, *Anopheles. gambiae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(49): 19854–59. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1316851110>.
- Lees, Rosemary Susan et al. 2015. “Back to the Future: The Sterile Insect Technique against Mosquito Disease Vectors.” *Current Opinion in Insect Science* 10: 156–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.011>.
- Lefèvre, Thierry et al. 2009. “Evolutionary Lability of Odour-Mediated Host Preference by the Malaria Vector *Anopheles. gambiae*.” *Tropical Medicine and International Health* 14(2): 228–36.
- Li, Ming et al. 2013. “A Whole Transcriptomal Linkage Analysis of Gene Co-Regulation in Insecticide Resistant House Flies, *Musca Domestica*.” *BMC Genomics* 14(1).
- Li, Xianchun, Mary A Schuler, and May R Berenbaum. 2007. “Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics.” : 231–53.
- Lilly, David G., Sharissa L. Latham, Cameron E. Webb, and Stephen L. Doggett. 2016. “Cuticle Thickening in a Pyrethroid-Resistant Strain of the Common Bed Bug, *Cimex Lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae).” *PLoS ONE* 11(4): 6–16.
- Liu, Guoxia et al. 2016. “Biotype Characterization, Developmental Profiling, Insecticide Response and Binding Property of *Bemisia Tabaci* Chemosensory Proteins: Role of CSP in Insect Defense.” *PLoS ONE* 11(5): 1–29.
- Liu, Nannan. 2015. “Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research.”
- Low, Wai Yee et al. 2010. “Recognition and Detoxification of the Insecticide DDT by *Drosophila Melanogaster* Glutathione S-Transferase D1.” *Journal of Molecular Biology* 399(3): 358–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.020>.

- Loy, Dorothy E. et al. 2017. "Out of Africa: Origins and Evolution of the Human Malaria Parasites *Plasmodium Falciparum* and *Plasmodium Vivax*." *International Journal for Parasitology* 47(2–3): 87–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>.
- Lucas, Eric R. et al. 2019. "Whole Genome Sequencing Reveals High Complexity of Copy Number Variation at Insecticide Resistance Loci in Malaria Mosquitoes." *bioRxiv*: 1250–61.
- Lumjuan, Nongkran et al. 2005. "Elevated Activity of an Epsilon Class Glutathione Transferase Confers DDT Resistance in the Dengue Vector, *Ae. aegypti* White Star." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35(8): 861–71.
- Luque, Teresa, Kazuhiro Okano, and David R. O'Reilly. 2002. "Characterization of a Novel Silkworm (*Bombyx Mori*) Phenol UDP-Glucosyltransferase." *European Journal of Biochemistry* 269(3): 819–25.
- Maharaj, Brij; 2005. "Geography, Human Rights and Development: Reflections from South Africa." *Geoforum* 36(2 SPEC. ISS.): 133–35.
- Maharaj, Rajendra;, D. J.; Mthembu, B. L. Sharp, and X. 2005. "Impact of DDT Re-Introduction on Malaria Transmission in KwaZulu-Natal." *South African Medical Journal* 95(11 I): 871–74.
- Main, Bradley J et al. 2018. "Genetic Variation Associated with Increased Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito, *Anopheles Coluzzii*." : 1–9.
- Mang'era, Clarence M. et al. 2021. "Transcriptomic Response of *Anopheles. gambiae* Sensu Stricto Mosquito Larvae to Curry Tree (*Murraya Koenigii*) Phytochemicals." *Parasites and Vectors* 14(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04505-4>.
- Marcombe, Sebastien et al. 2012. "Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Ae. aegypti* from Martinique : Distribution , Mechanisms and Relations with Environmental Factors." 7(2).
- Martinez-Torres, D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Berge, et al. 1998. "Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae* s . S ." 7(October 1997): 179–84.

- Martins-Campos, Keillen M et al. 2018. “Infection of *Anopheles Aquasalis* from Symptomatic and Asymptomatic *Plasmodium Vivax* Infections in Manaus, Western Brazilian Amazon.” *Parasites and Vectors* 11(1): 1–11.
- Mashauri, Fabian M. et al. 2017. ‘Indoor Residual Spraying with Microencapsulated Pirimiphos-Methyl (Actellic® 300CS) against Malaria Vectors in the Lake Victoria Basin, Tanzania’. *PLoS ONE* 12(5): 1–21.
- Mastrantonio, Valentina et al. 2017. “Gene Expression Modulation of ABC Transporter Genes in Response to Permethrin in Adults of the Mosquito Malaria Vector *Anopheles Stephensi*.” *Acta Tropica* 171(March): 37–43.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.012>.
- Matowo, Johnson et al. 2014. “Genetic Basis of Pyrethroid Resistance in a Population of *Anopheles Arabiensis*, the Primary Malaria Vector in Lower Moshi, North-Eastern Tanzania.” *Parasites and Vectors* 7(1): 1–9.
- Matsuda, Kazuhiko, Makoto Ihara, and David B. Sattelle. 2020. “Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 60: 241–55.
- Messenger, Louisa A. et al. 2017. “Insecticide Resistance in *Anopheles Arabiensis* from Ethiopia (2012-2016): A Nationwide Study for Insecticide Resistance Monitoring.” *Malaria Journal* 16(1): 1–14.
- Metcalf, Robert L. 1989. “Insect Resistance to Insecticides.” *Pesticide Science* 26(4): 333–58.
- Mitchell, S N et al. 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(16): 6147–52.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203452109>.
- Mitchell, Sara N. et al. 2014. “Metabolic and Target-Site Mechanisms Combine to Confer Strong DDT Resistance in *Anopheles. gambiae*.” *PLoS ONE* 9(3).
- Mohammed, Balarabe R et al. 2017. “Cytochrome P450s in *Anopheles. gambiae* (Diptera: Culicidae) and Insecticide Resistance in Africa: A Mini Review.” *Entomology*,

- Moiroux, Nicolas et al. 2012. "Changes in *Anopheles Funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin." *Journal of Infectious Diseases* 206(10): 1622–29.
- Moldenke, Alison F, Daniel R Vincent, Dan E Farnsworth, and Leon C Terriere. 1984. "Cytochrome P-450 in Insects: 4. Reconstitution of Cytochrome P-450-Dependent Monooxygenase Activity in the House Fly." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 21(3): 358–67.
- Morens, D M, G K Folkers, and A S Fauci. 2004. "Erratum: The Challenge of Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases (Nature (2004) 430 (242-249))." *Nature* 463(7277): 122.
- Mota, Maria M, and Ana Rodriguez. 2002. "Invasion of Mammalian Host Cells by Plasmodium Sporozoites." *BioEssays* 24(2): 149–56.
- Mouchet, Jean. 1994. "Le DDT En Santé Publique." *Cahier santé* (4): 257–62.
- Mourou, Jean Romain et al. 2010. "Malaria Transmission and Insecticide Resistance of *Anopheles. gambiae* in Libreville and Port-Gentil, Gabon." *Malaria Journal* 9(1): 1–8.
- Mulamba, Charles et al. 2014. "Widespread Pyrethroid and DDT Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus* in East Africa Is Driven by Metabolic Resistance Mechanisms." *PLoS ONE* 9(10).
- Müller, Pie et al. 2008. "Field-Caught Permethrin-Resistant *Anopheles. gambiae* Overexpress CYP6P3, a P450 That Metabolises Pyrethroids." *PLoS Genetics* 4(11).
- Nam, Vu Sinh et al. 2012. 'Community-Based Control of *Aedes Aegypti* by Using Mesocyclops in Southern Vietnam'. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(5): 850–59.
- Ngamo Tinkeu L. Current situation on the registration and use of neonicotinoids in Cameroon, 2018. <https://www.interacademies.org/49035/Cameroon-by-Leona-rd-Ngamo-Tinkeu-University-of-Ngandu>.

- N'Guessan, R et al. 2003. "Resistance to Carbosulfan in Field Populations of *Anopheles. gambiae* from Cote d'Ivoire Based on Reduced Sensitivity of Acetylcholinesterase." *Med Vet Entomol* 17: 19–25.
- Namountougou, Moussa et al. 2012. "Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* s.l. Populations from Burkina Faso, West Africa." *PLoS ONE* 7(11).
- Nardini, Luisa et al. 2017. "Malaria Vectors in the Democratic Republic of the Congo: The Mechanisms That Confer Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* and *Anopheles Funestus*." *Malaria Journal* 16(1): 1–15.
- Ngufor, Corine et al. 2016. "Chlorfenapyr (A Pyrrole Insecticide) Applied Alone or as a Mixture with Alpha-Cypermethrin for Indoor Residual Spraying against Pyrethroid Resistant *Anopheles. gambiae* Sl: An Experimental Hut Study in Cote, Benin." *PLoS ONE* 11(9): 1–14.
- Ngufor, Corine, Augustin Fongnikin, Mark Rowland, and Raphael N'Guessan. 2017. "Indoor Residual Spraying with a Mixture of Clothianidin (a Neonicotinoid Insecticide) and Deltamethrin Provides Improved Control and Long Residual Activity against Pyrethroid Resistant *Anopheles. gambiae* Sl in Southern Benin." *PLoS ONE* 12(12): 1–14.
- Niang, Abdoulaye et al. 2015. "Does Extreme Asymmetric Dominance Promote Hybridization between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles. gambiae* s.s. in Seasonal Malaria Mosquito Communities of West Africa?" *Parasites & Vectors*.
- Njie, Mbye, Erin Dilger, and Matthew J. Lindsay, Steven W. Kirby. 2009. "Importance of Eaves to House Entry by Anopheline, but Not Culicine, Mosquitoes." *Journal of Medical Entomology* 46(3): 505–10.
- Nkya, Theresia et al. 2014. "Impact of Agriculture on the Selection of Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles. gambiae*: A Multigenerational Study in Controlled Conditions." *Parasites & vectors* 7(1): 480.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4201709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nkya, Theresia Estomih et al. 2014. "Impact of Agriculture on the Selection of Insecticide

- Resistance in the Malaria Vector *Anopheles. gambiae*: A Multigenerational Study in Controlled Conditions.” *Parasites & Vectors*.
- Nkya, Theresia Estomih, Idir Akhouayri, William Kisinza, and Jean Philippe David. 2013. “Impact of Environment on Mosquito Response to Pyrethroid Insecticides: Facts, Evidences and Prospects.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(4): 407–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>.
- Nwane, Philippe et al. 2011. “Kdr-Based Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae* s.s Populations in Cameroon: Spread of the L1014F and L1014S Mutations.” *BMC Research Notes* 4(1).
- Okumu, Fredros, and Sarah Moore. 2011. “Combining Indoor Residual Spraying and Insecticide-Treated Nets for Malaria Control in Africa: A Review of Possible Outcomes and an Outline of Suggestions for the Future.” *Malaria Journal* 10: 1–13.
- Oliva, Clelia F. et al. 2012. “The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males.” *PLoS ONE* 7(11): 1–8.
- Omer, S.M., G.P. Georghiou, and S.N. Irving. 1980. “MN_V40_N2_P200-209(1).Pdf.” *Mosquito News* 40.
- Ondiba, Isabella M. et al. 2018. “Malaria Vector Abundance Is Associated with House Structures in Baringo County, Kenya.” *PLoS ONE* 13(6): 1–12.
- Oppenoorth, F J, and K van Aspere. 1960. “Biotechno.Agro.Soc.Envion.PDF.”
- Oxborough, Richard M. et al. 2015. “A New Class of Insecticide for Malaria Vector Control: Evaluation of Mosquito Nets Treated Singly with Indoxacarb (Oxadiazine) or with a Pyrethroid Mixture against *Anopheles. gambiae* and *Culex Quinquefasciatus*.” *Malaria Journal* 353: 14.
- Oxborough, Richard M. et al. 2016. “Trends in US President’s Malaria Initiative-Funded Indoor Residual Spray Coverage and Insecticide Choice in Sub-Saharan Africa (2008-2015): Urgent Need for Affordable, Long-Lasting Insecticides.” *Malaria Journal* 15(1): 1–9.

- Oxborough, Richard M et al. 2019. "Susceptibility Testing of Anopheles Malaria Vectors with the Neonicotinoid Insecticide Clothianidin; Results from 16 African Countries, in Preparation for Indoor Residual Spraying with New Insecticide Formulations." *Malaria Journal* 18(1).
- Pages, F.; E; Orlandi-Pradines, V. Corbel, and X; 2007. "Vecteurs Du Paludisme : Biologie, Diversité, Contrôle et Protection Individuelle." *Medecine et Maladies Infectieuses* 37(3): 153–61.
- Pan, Yiou et al. 2018. "Thiamethoxam Resistance in Aphis Gossypii Glover Relies on Multiple UDP-Glucuronosyltransferases." *Frontiers in Physiology* 9(APR): 1–9.
- Pang, Rui et al. 2016. "Functional Analysis of CYP6ER1, a P450 Gene Associated with Imidacloprid Resistance in Nilaparvata Lugens." *Scientific Reports* 6(October): 1–10.
- Parker, Anthony G, Robyn J Russell, Angela C Delves, and John G Oakeshott. 1991. "Biochemistry and Physiology of Esterases in Organophosphate-Susceptible and -Resistant Strains of the Australian Sheep Blowfly, *Lucilia Cuprina*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 41(3): 305–18.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004835759190085Z>.
- Pautou, Guy, Jacky Girel, M. P. Pautou, and René Gruffaz. 1995. "Hydrologie, Paludisme et Démoustication. (L'exemple de La Région Rhône-Alpes) / Hydrology, Malaria and Mosquito Control: The Example of the Rhône-Alpes Region, France." *Revue de géographie alpine* 83(1): 33–52.
- Peiris, H T R, and J Hemingway. 1990. "Mechanisms of Insecticide Resistance in a Temephos Selected *Culex Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Strain from Sri Lanka." *Bulletin of Entomological Research* 80(4): 453–57.
- Phillips, Margaret;, Anne; Mills, and Christopher; Dye. 1993. "Guidelines Fo Cost-Effectiveness Analysis of Vector Control." *Panel of Experts on Environmental Management for Vector Control*: 198.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_93_4/en/.
- Phuc, Hoang et al. 2007. "Late-Acting Dominant Lethal Genetic Systems and Mosquito

- Control.” *BMC Biology* 5: 1–11.
- Pinto, J. et al. 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(1): 27–32.
- Pittendrigh, Barry Robert et al. 2014. *Insect Resistance Management: Second Edition Understanding Resistance and Induced Responses of Insects to Xenobiotics and Insecticides in the Age of “Omics” and Systems Biology*. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396955-2.00003-5>.
- Poupardin, R. et al. 2010. “Transcription Profiling of Eleven Cytochrome P450s Potentially Involved in Xenobiotic Metabolism in the Mosquito *Ae. aegypti*.” *Insect Molecular Biology* 19(2): 185–93.
- Poupardin, Rodolphe et al. 2008. “Cross-Induction of Detoxification Genes by Environmental Xenobiotics and Insecticides in the Mosquito *Ae. aegypti*: Impact on Larval Tolerance to Chemical Insecticides.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(5): 540–51.
- Poupardin, Rodolphe et al. 2012. “Do Pollutants Affect Insecticide-Driven Gene Selection in Mosquitoes? Experimental Evidence from Transcriptomics.” *Aquatic Toxicology* 114–115: 49–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.001>.
- Poupardin, Rodolphe, Wannaporn Srisukontarat, Cristina Yunta, and Hilary Ranson. 2014. “Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Ae. aegypti*.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(3).
- Price, Trevor D., Anna Qvarnström, and Darren E. Irwin. 2003. “The Role of Phenotypic Plasticity in Driving Genetic Evolution.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1523): 1433–40.
- Protopopoff, Natacha et al. 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 Fact.” *The Lancet* 391(10130): 1577–88. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30427-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30427-6).

- Puinean, Alin M., Stephen P. Foster, et al. 2010. "Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus Persicae*." *PLoS Genetics* 6(6): 1–11.
- Puinean, Alin M., Ian Denholm, et al. 2010. "Characterisation of Imidacloprid Resistance Mechanisms in the Brown Planthopper, *Nilaparvata Lugens Stål* (Hemiptera: Delphacidae)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97(2): 129–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.008>.
- Ranson, Hilary et al. et al. 2001. "Identification of a Novel Class of Insect Glutathione S-Transferases Involved in Resistance to DDT in the Malaria Vector *Anopheles. gambiae*." *Biochemical Journal* 359(2): 295–304.
- Ranson, Hilary et al. 2000. "Identification of a Point Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Kenyan *Anopheles. gambiae* Associated with Resistance to DDT and Pyrethroids." *Insect Molecular Biology* 9(5): 491–97.
- Ranson, Hilary et al. 2002. 298 *SCIENCE Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance*.
- Ranson, Hilary et al. 2009. "Insecticide Resistance in *Anopheles. gambiae*: Data from the First Year of a Multi-Country Study Highlight the Extent of the Problem." *Malaria Journal* 8(1): 1–12.
- Ranson, Hilary, and Natalie Lissenden. 2016. "Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation That Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control." *Trends in Parasitology* 32(3): 187–96.
- Raymond, Michel et al. 2001. "Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex Pipiens*: What Have We Learned about Adaptation?" *Genetica* 112–113: 287–96.
- Reddy, Michael R et al. 2011. "Outdoor Host Seeking Behaviour of *Anopheles. gambiae* Mosquitoes Following Initiation of Malaria Vector Control on Bioko Island, Equatorial Guinea." *Malaria Journal* 10: 1–10.
- Reid, Molly C, and F Ellis McKenzie. 2016. "The Contribution of Agricultural Insecticide Use to Increasing Insecticide Resistance in African Malaria Vectors." *Malaria Journal* 15(1).

- Riaz, Muhammad Asam et al. 2009. "Impact of Glyphosate and Benzo[a]Pyrene on the Tolerance of Mosquito Larvae to Chemical Insecticides. Role of Detoxification Genes in Response to Xenobiotics." *Aquatic Toxicology* 93(1): 61–69.
- Riaz, Muhammad Asam et al. 2012. "Molecular Mechanisms Associated with Increased Tolerance to the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in the Dengue Vector *Ae. aegypti*." *Aquatic Toxicology*.
- Rivero, Ana et al. 2010. "Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem?" *PLoS Pathogens* 6(8): 5–6.
- Riveron, J. M. et al. 2013. "Directionally Selected Cytochrome P450 Alleles Are Driving the Spread of Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(1).
- Riveron, J. M. et al. 2014. "A Single Mutation in the GSTe2 Gene Allows Tracking of Metabolically Based Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector." *Genome Biology* 15(2): 1–20.
- Riveron, J. M. et al. 2015. "Rise of Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles Funestus* in Malawi: A Major Concern for Malaria Vector Control." *Malaria Journal* 14(1).
- Riveron, J. M. et al. 2018. "Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale." *Intech i(tourism)*: 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.
- Robert V., and Carnevalle P. 1984. "Les Vecteurs Des Paludismes En Afrique Subsaharienne." *Études Médicales* 2: 79–90. [papers2://publication/uuid/94373A88-EED0-4E88-821C-3AC81CCA60D2](https://pubs2://publication/uuid/94373A88-EED0-4E88-821C-3AC81CCA60D2).
- Roux, Olivier, Abdoulaye Diabaté, and Frédéric Simard. 2014. "Divergence in Threat Sensitivity among Aquatic Larvae of Cryptic Mosquito Species." *Journal of Animal Ecology* 83(3): 702–11.
- Rowland, Mark et al. 2013. "A New Long-Lasting Indoor Residual Formulation of the Organophosphate Insecticide Pirimiphos Methyl for Prolonged Control of Pyrethroid-Resistant Mosquitoes: An Experimental Hut Trial in Benin." *PLoS ONE* 8(7): 1–10.

- RTS, S Clinical Trials Partnership. 2015. “Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial.” *The Lancet* 386(9988): 31–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8).
- Russell, Tanya L. et al. 2011. “Increased Proportions of Outdoor Feeding among Residual Malaria Vector Populations Following Increased Use of Insecticide-Treated Nets in Rural Tanzania.” *Malaria Journal* 10: 1–10.
- Salako, Albert Sourou et al. 2018. “Insecticide Resistance Status, Frequency of L1014F Kdr and G119S Ace-1 Mutations, and Expression of Detoxification Enzymes in *Anopheles gambiae* (s.l.) in Two Regions of Northern Benin in Preparation for Indoor Residual Spraying.” *Parasites and Vectors* 11(1): 1–11.
- Salako, Albert Sourou et al. 2019. ‘Efficacy of Actellic 300 CS-Based Indoor Residual Spraying on Key Entomological Indicators of Malaria Transmission in Alibori and Donga, Two Regions of Northern Benin’. *Parasites and Vectors* 12(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3865-1>.
- Sallum, Maria Anice M. et al. 2019. “Vector Competence, Vectorial Capacity of *Nyssorhynchus Darlingi* and the Basic Reproduction Number of *Plasmodium Vivax* in Agricultural Settlements in the Amazonian Region of Brazil.” *Malaria Journal* 18(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2753-7>.
- Samson-Robert, Olivier, Geneviève Labrie, Madeleine Chagnon, and Valérie Fournier. 2014. ‘Neonicotinoid-Contaminated Puddles of Water Represent a Risk of Intoxication for Honey Bees’. *PLoS ONE* 9(12): 1–17.
- Sarkar, Manas et al. 2009. “Development of Physiological Resistance and Its Stage Specificity in *Culex Quinquefasciatus* after Selection with Deltamethrin in Assam, India.” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(5): 673–77.
- Schmittgen, Thomas D., and Kenneth J. Livak. 2008. “Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method.” *Nature Protocols* 3(6): 1101–8.
- Scholte, Ernst Jan et al. 2005. ‘An Entomopathogenic Fungus for Control of Adult African

- Malaria Mosquitoes'. *Science* 308(5728): 1641–42.
- Scholte, Ernst Jan, Bart G.J. Knols, Robert A. Samson, and Willem Takken. 2004. 'Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control: A Review'. *Journal of Insect Science* 4.
- Scholte, Ernst Jan, Bart G.J. Knols, and Willem Takken. 2006. 'Infection of the Malaria Mosquito *Anopheles Gambiae* with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* Reduces Blood Feeding and Fecundity'. *Journal of Invertebrate Pathology* 91(1): 43–49.
- Scott, Jeffrey G. 1999. "Cytochromes P450 and Insecticide Resistance." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(9): 757–77.
- Seirin Lee, S., R. E. Baker, E. A. Gaffney, and S. M. White. 2013. "Modelling *Ae. aegypti* Mosquito Control via Transgenic and Sterile Insect Techniques: Endemics and Emerging Outbreaks." *Journal of Theoretical Biology* 331: 78–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.04.014>.
- Settings, Forest, Roland Bamou, Nad Sonhafouo-chiana, and Konstantinos Mavridis. 2019. "Status of Insecticide Resistance and Its Mechanisms in *Anopheles. gambiae* and *Anopheles Coluzzii*."
- Shah, P. A., and J. K. Pell. 2003. "Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(5–6): 413–23.
- Sharp, Brian L. et al. 2007. "Malaria Vector Control by Indoor Residual Insecticide Spraying on the Tropical Island of Bioko, Equatorial Guinea." *Malaria Journal* 6: 1–6.
- Shaw, W. Robert et al. 2016. "Wolbachia Infections in Natural *Anopheles* Populations Affect Egg Laying and Negatively Correlate with *Plasmodium* Development." *Nature Communications* 7(May).
- Shi, Linna et al. 2015. "Development of Resistance to Pyrethroid in *Culex Pipiens Pallens* Population under Different Insecticide Selection Pressures."
- Shi, Xueyan, Ryan A. Dick, Kevin A. Ford, and John E. Casida. 2009. "Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

57(11): 4861–66.

Silva, Ana Paula B., Joselita Maria M. Santos, and Ademir J. Martins. 2014. “Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Anophelines and Their Association with Resistance to Pyrethroids - A Review.” *Parasites and Vectors* 7(1): 1–14.

Simard, Frédéric. 2019. “La Lutte Contre Les Vecteurs : Quel Avenir ? Frédéric.” 212(3): 27–33.

Sinka M.E, Mbogo Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Burkot T R CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, and Hay S I Harbach RE. 2012. “Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria.” *World’s largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher* DS 84: 411–20.

Sonoda, Shoji, and Hisaaki Tsumuki. 2005. “Studies on Glutathione S-Transferase Gene Involved in Chlorfluazuron Resistance of the Diamondback Moth, *Plutella Xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae).” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82(1): 94–101.

De sousa, Georges et al. 1995. “De Souza.Pdf.”

South, Andy, and Ian M. Hastings. 2018. “Insecticide Resistance Evolution with Mixtures and Sequences: A Model-Based Explanation.” *Malaria Journal* 17(1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2203-y>.

Sparks, Thomas C et al. 2012. “Differential Metabolism of Sulfoximine and Neonicotinoid Insecticides by *Drosophila Melanogaster* Monooxygenase CYP6G1.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103(3): 159–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.006>.

Sparks, Thomas C, and Ralf Nauen. 2015. “IRAC: Mode of Action Classification and Insecticide Resistance Management.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121.

Sternberg, Eleanore D. et al. 2021. “Impact and Cost-Effectiveness of a Lethal House Lure against Malaria Transmission in Central Côte d’Ivoire: A Two-Arm, Cluster-Randomised Controlled Trial.” *The Lancet* 397(10276): 805–15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00250-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00250-6).

- Stevenson, Bradley J. et al. 2011. "Cytochrome P450 6M2 from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Metabolizes Pyrethroids: Sequential Metabolism of Deltamethrin Revealed." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41(7): 492–502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.003>.
- Stewart, Zachary P. et al. 2013. "Indoor Application of Attractive Toxic Sugar Bait (ATSB) in Combination with Mosquito Nets for Control of Pyrethroid-Resistant Mosquitoes." *PLoS ONE* 8(12): 6–12.
- Strode, C., K. Steen, F. Ortel, and H. Ranson. 2006. "Differential Expression of the Detoxification Genes in the Different Life Stages of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*." *Insect Molecular Biology* 15(4): 523–30.
- Strode, Clare et al. 2008. "Genomic Analysis of Detoxification Genes in the Mosquito *Ae. aegypti*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(1): 113–23.
- Suaya, Jose A. et al. 2009. "Cost of Dengue Cases in Eight Countries in the Americas and Asia: A Prospective Study." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(5): 846–55.
- Suman, Devi Shankar et al. 2013. "Effects of Insect Growth Regulators on the Mosquito-Parasitic Nematode *Romanomermis iyengari*." *Parasitology Research* 112(2): 817–24.
- Suwanchaichinda, Chansak, and L. B. Brattsten. 2001. "Effects of Exposure to Pesticides on Carbaryl Toxicity and Cytochrome P450 Activities in *Aedes albopictus* Larvae (Diptera: Culicidae)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70(2): 63–73.
- Tabue, Raymond N. et al. 2017. "Role of *Anopheles (Cellia) Rufipes* (Gough, 1910) and Other Local Anophelines in Human Malaria Transmission in the Northern Savannah of Cameroon: A Cross-Sectional Survey." *Parasites and Vectors* 10(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1933-3>.
- Taillebois, Emiliane et al. 2014. "Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*." *PLoS ONE* 9(5).
- Takken, Willem, and Bart G.J. Knols. 2007. 14 Emerging Infectious Diseases *Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe*.

- Tanga, M. C., and W. I. Ngundu. 2010. "Ecological Transition from Natural Forest to Tea Plantations: Effect on the Dynamics of Malaria Vectors in the Highlands of Cameroon." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104(10): 659–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.009>.
- Taylor, Martin F.J. et al. 1993. "Linkage of Pyrethroid Insecticide Resistance to a Sodium Channel Locus in the Tobacco Budworm." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23(7): 763–75.
- Testud, F. 2014. "Insecticides Néonicotinoïdes Insecticides Néonicotinoïdes." 7856(January 2014).
- Testud, F, and J Grillet. 2006. "Insecticides Organophosphorés , Carbamates , Pyréthriñoïdes de Synthèse et Divers." : 1–24.
- Tian, Li et al. 2011. "Autosomal Interactions and Mechanisms of Pyrethroid Resistance in House Flies, *Musca Domestica*." *International Journal of Biological Sciences* 7(6): 902–11.
- Tiffen. 1991. "WHO_CWS_91.2_eng.Pdf."
- Toé, Kobié H. et al. 2015. "The Recent Escalation in Strength of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Coluzzi* in West Africa Is Linked to Increased Expression of Multiple Gene Families." *BMC Genomics* 16(1): 146. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/146>.
- Tomizawa, Motohiro, and John E. Casida. 2003. "Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors." *Annual Review of Entomology* 48: 339–64.
- Tomizawa, Motohiro, David L. Lee, and John E. Casida. 2000. "Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect versus Mammalian Nicotinic Receptors." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(12): 6016–24.
- Toyoda, Y. et al. 2008. 38 *Xenobiotica MRP Class of Human ATP Binding Cassette (ABC) Transporters: Historical Background and New Research Directions*.

- Traore, Dipomin F et al. 2018. "Evaluation of Malaria Urban Risk Using an Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Anopheles Bites." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98(5): 1353–59.
- Trape, J.- F. 2001. "Contre : Les Limites Des Moustiquaires Imprégnées Dans La Lutte Contre Le Paludisme En Afrique Tropicale." *Bull Soc Path Exot* 94(2 bis): 174–79.
- Tunaz, Hasan, and Nedim Uygün. 2004. "Insect Growth Regulators for Insect Pest Control." *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28(6): 377–87.
- Turner, James A, Colin N E Ruscoe, and Trevor R Perrior. 2016. "Discovery to Development: Insecticides for Malaria Vector Control." *Chimia* 70(10): 684–93.
- Tusting, Lucy S et al. 2013. "Mosquito Larval Source Management for Controlling Malaria." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013(8).
- Uragayala, S et al. 2018. "Village-Scale (Phase III) Evaluation of the Efficacy and Residual Activity of SumiShield® 50 WG (Clothianidin 50%, w/w) for Indoor Spraying for the Control of Pyrethroid-Resistant Anopheles Culicifacies Giles in Karnataka State, India." *Tropical Medicine & International Health* 23(6): 605–15. <https://doi.org/10.1111/tmi.13056>.
- Vannini, Laura, Tyler W. Reed, and Judith H. Willis. 2014. "Temporal and Spatial Expression of Cuticular Proteins of *Anopheles. gambiae* Implicated in Insecticide Resistance or Differentiation of M/S Incipient Species." *Parasites and Vectors* 7(1): 1–11.
- Vontas, J. et al. 2005. "Gene Expression in Insecticide Resistant and Susceptible *Anopheles. gambiae* Strains Constitutively or after Insecticide Exposure." *Insect Molecular Biology* 14(5): 509–21.
- Vontas, J G, G J Small, and J Hemingway. 2001. "Glutathione S-Transferases as Antioxidant Defence Agents Confer Pyrethroid Resistance in Nilaparvata Lugens." *Biochemical Journal* 357(1): 65–72.
- Vontas, John et al. 2018. "Rapid Selection of a Pyrethroid Metabolic Enzyme CYP9K1 by Operational Malaria Control Activities." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (21): 201719663.

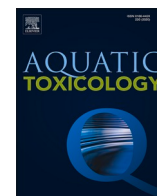
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29674455>.

- Vontas, John G et al. 2002. "Purification, Molecular Cloning and Heterologous Expression of a Glutathione S-Transferase Involved in Insecticide Resistance from the Rice Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*." *Biochemical Journal* 362(2): 329–37.
- Vontas, John, Eva Katsavou, and Konstantinos Mavridis. 2020. "Cytochrome P450-Based Metabolic Insecticide Resistance in *Anopheles* and *Aedes* Mosquito Vectors : Muddying the Waters." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 170(April): 104666. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104666>.
- Vreysen, M.J.B., K. M. Saleh, K. G. Juma, and V.A. Dyck. 1998. "THE USE OF THE STERILE INSECT TECHNIQUE (SIT) FOR THE ERADICATION OF THE TSETSE FLY *GLOSSINA AUSTENI* (DEPTERA:GLOSSINIDAE) ON THE ISLAND OF UNGUJA(ZANZIBAR) M.J.B. Vreysen 1 , K. M. Saleh 2 K. G. Juma 2 and V.A. Dyck 1." (December 1997): 9951593.
- Vulule, J. M. et al. 1999. "Elevated Oxidase and Esterase Levels Associated with Permethrin Tolerance in *Anopheles. gambiae* from Kenyan Villages Using Permethrin-Impregnated Nets." *Medical and Veterinary Entomology* 13(3): 239–44.
- Wagman, Joseph et al. 2018. "An Observational Analysis of the Impact of Indoor Residual Spraying with Non-Pyrethroid Insecticides on the Incidence of Malaria in Ségou Region, Mali: 2012-2015." *Malaria Journal* 17(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2168-2>.
- Weetman, David et al. 2015. "Contemporary Evolution of Resistance at the Major Insecticide Target Site Gene *Ace-1* by Mutation and Copy Number Variation in the Malaria Mosquito *Anopheles. gambiae*." *Molecular Ecology* 24(11): 2656–72.
- Weetman, David, Luc S Djogbenou, and Eric Lucas. 2018. "Copy Number Variation (CNV) and Insecticide Resistance in Mosquitoes: Evolving Knowledge or an Evolving Problem?" *Current Opinion in Insect Science* 27: 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.005>.
- Weill, M. et al. 2004. "The Unique Mutation in *Ace-1* Giving High Insecticide Resistance Is Easily Detectable in Mosquito Vectors." *Insect Molecular Biology* 13(1): 1–7.

- Werren, John H., Laura Baldo, and Michael E. Clark. 2008. "Wolbachia: Master Manipulators of Invertebrate Biology." *Nature Reviews Microbiology* 6(10): 741–51.
- WHO. 2010. "Monitoring and Evaluation Tool Kit for Indoor Residual Spraying." *Monitoring and evaluation tool kit for indoor residual spraying* (August).
- WHO. 2012. "Programme Mondial de Lutte Antipaludique Résumé d'orientation."
- WHO. 2013. "*Malaria Journal*" 456:12. <http://www.malariajournal.com/content/12/1/456%0AM>.
- WHO. 2015. "An Operational Manual for Indoor Residual Spraying (Irs) for Malaria Transmission Control and Elimination Second Edition Indoor Residual Spraying."
- WHO. 2016. "Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes Second Edition." *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Test*.
- WHO. 2019. *World Malaria Report*.
- Whyard, Steven, Aylward E.R. Downe, and Virginia K. Walker. 1994. "Isolation of an Esterase Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex tarsalis* S." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29(4): 329–42.
- Whyard, Steven, Robyn J. Russell, and Virginia K. Walker. 1993. "Insecticide Resistance and Malathion Carboxylesterase in the Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*." *Biochemical Genetics* 32(1–2): 9–24.
- Wilding, Craig S. et al. 2012. "A Cis-Regulatory Sequence Driving Metabolic Insecticide Resistance in Mosquitoes: Functional Characterisation and Signatures of Selection." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42(9): 699–707. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.06.003>.
- Wondji, Charles S et al. 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(7): 484–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.03.012>.
- Wood, O. R. et al. 2010. "Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in the

- Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*.” *Parasites and Vectors* 3(1): 1–7.
- WYSS, JOHN H. 2006. “Screwworm Eradication in the Americas.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 916(1): 186–93.
- Yahouédo, Gildas A. et al. 2016. “Dynamics of Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors in Southern Benin Following a Large Scale Implementation of Vector Control Interventions.” *Parasites and Vectors* 9(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1661-8>.
- Yahouédo, Gildas A. et al. 2017. “Contributions of Cuticle Permeability and Enzyme Detoxification to Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles. gambiae*.” *Scientific Reports* 7(1): 1–10.
- Yé, Yazoumé et al. 2006. “Housing Conditions and Plasmodium Falciparum Infection: Protective Effect of Iron-Sheet Roofed Houses.” *Malaria Journal* 5: 1–7.
- Zhong, Daibin et al. 2013. “Relationship between Knockdown Resistance, Metabolic Detoxification and Organismal Resistance to Pyrethroids in *Anopheles Sinensis*.” *PLoS ONE* 8(2).
- Zhou, Yong et al. 2019. “UDP-Glycosyltransferase Genes and Their Association and Mutations Associated with Pyrethroid Resistance in *Anopheles Sinensis* (Diptera: Culicidae).” *Malaria Journal* 18(1): 1–17.
- Zug, Roman, and Peter Hammerstein. 2012. “Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected.” *PLoS ONE* 7(6): 7–9.

ANNEXE: Molecular bases of P450-mediated resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the mosquito *Ae. aegypti*



Molecular bases of P450-mediated resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the mosquito *Ae. aegypti*

Marius Gonse Zoh^a, Thierry Gaude^a, Sophie M. Prud'homme^b, Muhammad Asam Riaz^c, Jean-Philippe David^{a,*}, Stéphane Reynaud^{a,*}

^a Univ. Grenoble-Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, LECA, 38000 Grenoble, France

^b Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France

^c Department of Entomology, College of Agriculture, University of Sargodha, Sargodha Pakistan

ARTICLE INFO

Keywords:

Mosquito
Resistance
Imidacloprid
Cytochrome P450
Nextgen sequencing

ABSTRACT

Resistance to chemical insecticides including pyrethroids, the main insecticide class used against mosquitoes, has re-kindled interest in the use of neonicotinoids. In this context, the present study aimed to characterize the molecular basis of neonicotinoid resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. Resistance mechanisms were studied by combining transcriptomic and genomic data obtained from a laboratory strain selected at the larval stage after 30 generations of exposure to imidacloprid (Imida-R line). After thirty generations of selection, larvae of the Imida-R line showed an 8-fold increased resistance to imidacloprid and a significant cross-tolerance to the pyrethroids permethrin and deltamethrin. Cross-resistance to pyrethroids was only observed in adults when larvae were previously exposed to imidacloprid suggesting a low but inducible expression of resistance alleles at the adult stage. Resistance of the Imida-R line was associated with a slower larval development time in females. Multiple detoxification enzymes were over-transcribed in larvae in association with resistance including the P450s *CYP6BB2*, *CYP9M9* and *CYP6M11* previously associated with pyrethroid resistance. Some of them together with their redox partner NADPH P450 reductase were also affected by non-synonymous mutations associated with resistance. Combining genomic and transcriptomic data allowed identifying promoter variations associated with the up-regulation of *CYP6BB2* in the resistant line. Overall, these data confirm the key role of P450s in neonicotinoid resistance in *Ae. aegypti* and their potential to confer cross-resistance to pyrethroids, raising concerns about the use of neonicotinoids for resistance management in this mosquito species.

1. Introduction

Arboviruses threaten public health in many tropical and subtropical countries. One of the most important vector of human arboviruses is the mosquito *Aedes aegypti*, which can transmit yellow fever, chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), and Zika (ZIKV) viruses (Crawford et al., 2017). The health and economic impact of arboviral diseases has increased dramatically over the last 50 years (Vorou 2016). Despite decades of efforts, control strategies have failed to protect human from arboviruses due to globalization and ineffective vector control strategies (Franz et al., 2015). Indeed, in absence of treatments or vaccines for most arboviral diseases, arbovirus prevention mainly relies on intensive

vector control, which itself often relies on insecticide treatments (Smith et al., 2016). However, the usage of the same insecticides for decades led to the emergence and spread of resistance to most chemical insecticides including pyrethroids, the latest insecticides used for vector control (Ranson et al., 2010). Resistance to insecticides is widespread in the dengue vector *Aedes aegypti* (Moyes et al., 2017) with high resistance levels frequently observed in natural populations often affecting the efficacy of vector control (Dusfour et al., 2011; Dusfour et al., 2019).

Resistance of mosquitoes to chemical insecticides has been associated to several physiological adaptations among which target-site insensitivity and increased insecticide metabolism are of key importance (Hemingway et al., 2004). Non-synonymous mutations decreasing

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gonse-marius.zoh@univ-grenoble-alpes.fr (M.G. Zoh), thierry.gaude@univ-grenoble-alpes.fr (T. Gaude), sophie.prud-homme@univ-lorraine.fr (S.M. Prud'homme), asam.riaz@uos.edu.pk (M.A. Riaz), jean-philippe.david@univ-grenoble-alpes.fr (J.-P. David), stephane.reynaud@univ-grenoble-alpes.fr (S. Reynaud).

¹ equal contribution

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105860>

Received 20 February 2021; Received in revised form 6 April 2021; Accepted 1 May 2021

Available online 9 May 2021

0166-445X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

insecticide target sensitivity are well-characterized in mosquitoes. For example, mutations affecting the voltage-gated sodium channel (knock down resistance mutations, known as *kdr* mutations) have been well described in *Ae. aegypti* and are often present at high frequencies in pyrethroid-resistant populations (Black and Vontas 2007; Moyes et al., 2017; Smith et al., 2016). Metabolic resistance is linked to an increased activity of detoxification enzymes including cytochrome P450 mono-oxygenases (P450s or CYPs for genes), carboxyl/cholinesterases (CCEs), glutathione S-transferases (GSTs) and UDP-glycosyl-transferases (UDPGTs) (David et al., 2013; Li et al., 2007) which metabolize the insecticide. This increased detoxifying activity is frequently caused by an over-expression of detoxification genes through transcriptional regulation or gene duplications though the selection of structural variants enhancing insecticide metabolism may also be involved (Faucon et al., 2015; Faucon et al., 2017).

A classical way to manage resistance is by alternating insecticides from different families. However, the use of the same chemical families for decades together with the limited portfolio of insecticides authorized in public health frequently impair such management strategies (Dusfour et al., 2019). Enlarging the portfolio of insecticides available for vector control by repurposing insecticides developed for crop protection is a possible way to improve resistance management. In this frame, several studies pointed out the potential of neonicotinoids for mosquito control (Darriet and Chandre 2013; Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008) and vector control products containing neonicotinoids are currently being developed by the industry (Agossa et al., 2018; Fuseini et al., 2019). As other neonicotinoids, imidacloprid is an insecticide targeting nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in insect nervous systems (Tomizawa and Casida 2005). This insecticide has been extensively used in agriculture against various crops pests (Elbert et al., 2008; Mullins 1993). Neonicotinoids such as imidacloprid alone or in combination with other insecticides have been shown to be efficient against mosquitoes resistant to pyrethroids suggesting that they might represent a new tool for managing resistance (Darriet and Chandre 2013; Paul et al., 2006). However, the implementation of neonicotinoids in vector control may eventually lead to the selection of novel or existing resistance alleles in mosquitoes. Several studies demonstrated the capacity of various agricultural pests to become resistant to neonicotinoids. In most cases, resistance was caused by target site insensitivity (Crossthwaite et al., 2014) or an overproduction of P450s (Feng et al., 2010; Karunker et al., 2008; Puinean et al., 2010). In addition, multiple P450s from various insects were shown to be capable of metabolizing imidacloprid, including *Drosophila melanogaster* CYP6G1, *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, *Nilaparvata lugens* CYP6AY1 and CYP6ER1, and *Laodelphax striatellus* CYP6AY3v2 and CYP417A2v2 (Bao et al., 2016; Jouben et al., 2008; Karunker et al., 2009; Miah et al., 2017; Wang et al., 2017). Despite the strong interest for neonicotinoids in vector control, resistance mechanisms of mosquitoes to these insecticides remain poorly investigated (Corbel et al., 2004; Darriet and Chandre 2013; Uragayala et al., 2015). A recent study pointed out the higher neonicotinoid resistance of *Anopheles coluzzi* populations from an intense agriculture area although resistance mechanisms were not investigated (Mouhamadou et al., 2019). In *Ae. aegypti*, the selection of a laboratory strain that had been exposed to imidacloprid at the larval stage for 8 generations lead to a ~5-fold increased resistance phenotype mostly expressed at the larval stage (Riaz et al., 2013). Biochemical and gene expression studies suggested the key role of P450 over-transcription in resistance with multiple CYP genes strongly over-transcribed in the resistant strain (Riaz et al., 2013; David et al., 2014). Among them, substrate docking simulations identified CYP6BB2 as a potential imidacloprid metabolizer (Riaz et al., 2013). However, the low resistance level obtained after only 8 generations of selection and the lack of genomic data did not allow to fully characterize the molecular bases of the resistance phenotype.

In this context, the present study aimed at further characterizing the resistance mechanisms having been selected in this resistant strain by combining transcriptomic and genomic data obtained from individuals

exposed and selected 30 generations with imidacloprid. An additional mosquito line was also created by releasing the selection pressure from generation 11 in order to improve the power of resistance allele detection and investigate fitness costs associated with resistance. A combination of RNA-seq and pool DNA-seq targeting the exons and promoters of 750 genes potentially involved in resistance was used in an attempt to better characterize the genetic bases of this P450-mediated resistance phenotype.

2. Material and methods

2.1. Ethical statement

Adult mosquitoes were fed on mice. Mice were maintained in an animal house agreed by the French Ministry of Animal Welfare (n° B 38 421 10 001) and used in accordance to EU laws and the relevant ethic committee recommendations (ComEth Grenoble - C2EA - 12).

2.2. Insecticide selection

Mosquitoes were reared in standard insectary conditions (26 °C, 14 h/10 h light/dark photoperiod, 80% relative humidity). Larvae and adults were fed with hay pellets and filter papers impregnated with honey, respectively. The susceptible laboratory strain Bora-Bora, (French Polynesia), was used as a parental strain for insecticide selection. The Imida-R resistant line was obtained by selecting Bora-Bora individuals with imidacloprid (Sigma-Aldrich, Germany) for 30 successive generations. Selection was performed following WHO guidelines for larvicide bioassays (WHO, 2016) by exposing 3rd-4th-stage larvae for 24 h to imidacloprid. The dose of imidacloprid (500 to 1500 µg/L) was adjusted at each generation to reach a mortality rate of 70–80%. Surviving larvae were transferred into tap water until emergence. At each generation, a negative control was performed with the solvent used for imidacloprid solubilization (acetone) in order to control for mortality not induced by the insecticide. After reproduction females were blood fed to generate eggs for the next generation. Each generation was initiated with more than 7000 individuals for limiting bottleneck effect. In order to investigate fitness costs associated with resistance, a second line (Imida-S) was created by releasing the selection pressure from G₁₁ to G₃₀.

2.3. Larval bioassays with imidacloprid

Dynamics of larval resistance in each line were studied through comparative bioassays with imidacloprid in the Imida-R and the Imida-S lines as compared to the susceptible strain Bora-Bora at generations 6, 9, 11, 12, 14, 16, 19, 25 and 30. At each generation bioassays were performed on 4th-stage larvae not previously exposed to insecticide. For each line, three replicates of 25 larvae were maintained in 50 mL insecticide solution for 24 h before recording mortality. Six different insecticide concentrations ranging from 150 to 3500 µg/L killing from 5% to 95% individuals were used for each line. LC₅₀ and their 95% confident intervals (CI₉₅) were estimated for each line at each generation with a log-probit model using XL-Stat (Addinsoft, Paris, France). Resistance ratios (RR₅₀) between each line and the susceptible strain Bora-Bora were computed at each generation based on their respective LC₅₀ values.

2.4. Larval and adult bioassays with pyrethroids

Cross-resistance of the Imida-R line to the pyrethroid insecticides permethrin and deltamethrin was investigated in larvae and adult female at the end of the selection process using single-dose bioassays. All mentioned concentrations were nominal concentrations. Comparative bioassays were performed on 4th-stage larvae of the Imida-R line and the susceptible Bora-Bora strain not previously exposed to insecticide. For

each line, five replicates of 25 larvae were maintained in 50 mL insecticide solution for 24 h before recording mortality. A single-dose of permethrin (1 µg/L) and deltamethrin (0.125 µg/L) were used. Comparative bioassays were also conducted on four days-old non-blood fed adult females of the Imida-R line and the susceptible Bora-Bora strain using WHO test tubes with 0.75% permethrin and 0.05% deltamethrin papers. Bioassays were performed with 5 replicates of 25 females according to WHO procedure except that exposure times were reduced to 6 min and 5 min for permethrin and deltamethrin respectively (WHO, 2016). Mortality rates were recorded after a 24 h recovery time. Two comparisons were tested. First, the susceptibility of Bora-Bora females and G₃₀ Imida-R females not exposed to any insecticide were compared. Then, the susceptibility of Bora-Bora females and G₃₀ Imida-R females obtained from 4th stage larvae surviving to an imidacloprid exposure of 1500 µg/L for 24 h (~70% larval mortality) were compared.

2.5. Individual development rates

Development rates up to imago emergence were compared between the Imida-R, imida-S and Bora-Bora lines in order to investigate for fitness costs potentially associated with resistance as defined from (Agossa et al., 2018; Prud'homme et al., 2017; Prud'homme et al., 2018). From 1 h post-hatching to imago emergence, 100 G₃₀ individuals (3 replicates) were reared in glass dishes (1 mosquito per mL). Feeding was performed daily with 0.2 to 0.4 mg/individual of crushed hay pellets at days 0 to 10 as described in Prud'homme et al. (2017; 2018). The time-to-emergence was defined as the number of hours separating hatching and adult emergence. The distributions of time-to-emergence obtained from males and females of each line were compared using a Kaplan-Meier's test.

2.6. RNA and DNA extractions

For RNA-seq, three pools of thirty 4th stage larvae from each line (Imida-R, Imida-S and Bora-Bora) not exposed to insecticides were used for RNA extractions using the RNAqueous-4PCR kit (Life technologies) according to manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was removed using DNase. For targeted DNA-seq, mosquitoes (two pools of 65 individuals) were collected and used for genomic DNA extraction as described in Faucon et al., 2015

2.7. RNA sequencing

Three RNA-seq libraries were prepared per line using the TruSeq Stranded mRNA sample Prep kit (Illumina) following manufacturer's instructions. and sequenced (paired reads) in multiplex on an Illumina GAIIx sequencer by Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France). After unplexing and removing adaptors FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) was used on each sample to assess reads quality. Reads were then filtered based on their length, pairing and quality using Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Trimmed reads (only paired reads) were then mapped to *Ae. aegypti* genome (AaegL5 assembly) using Strand NGS V2.2 (Strand Life Sciences). Reads were then filtered based on the sequence quality (mean read quality ≥ 25 and with < 2 Ns) and mapping quality (alignment score ≥ 96), and non-primary multiply mapped reads were removed. Read coverage was quantified for each sample and normalized according to the total number of filtered reads per library. Only genes showing Reads Per Kilobase exon model per Million sequenced reads (RPKM) > 0.5 in at least 2 replicates of at least 1 condition were considered for further analysis.

Transcription ratios between each line were computed across all biological replicates and associated P values were obtained using an ANOVA test with Benjamini-Hochberg correction for multiple comparison and a post-Hoc Tukey HSD test. Genes satisfying the four following conditions in either direction were considered differentially expressed in

association with resistance (DE genes): $FC[Imida-R / Bora-Bora] \geq 1.5$ and P value ≤ 0.005 (*differential expression in Imida-R versus Bora-Bora*) AND $FC[Imida-S / Bora-Bora] \geq 1.1$ and P value ≤ 0.005 (*moderate differential expression in Imida-S versus Bora-Bora*) AND $FC[Imida-R / Imida-S] \geq 1.0$ and P value ≤ 0.005 (*higher differential expression in Imida-R as compared to Imida-S*) AND $\{FC[Imida-R / Bora-Bora] / FC[Imida-S / Bora-Bora]\} > 0$ (*same direction in Imida-R and imida-S*).

Polymorphism data obtained from RNA-seq were analyzed using Strand NGS V2.2 (Strand Life Sciences). SNPs were called against the reference genome from filtered reads using the parameters described in Faucon et al. (2017). SNPs for which allele frequency variations satisfied the following conditions in either direction were considered associated with resistance (Diff SNPs): $f[Imida-R] - f[Bora-Bora] > 40\%$ (*high frequency variation between Imida-R and Bora-Bora*), AND $f[Imida-S] - f[Bora-Bora] > 20\%$ (*moderate frequency variation between Imida-S and Bora-Bora*) AND $f[Imida-R] / f[Imida-S] > 0$ (*frequency variations versus Bora-Bora in the same direction for Imida-R and Imida-S*). Genic effects were computed to identify non-synonymous differential SNPs (NS Diff SNPs).

2.8. Pool targeted DNA sequencing

Gene capture and sequencing were performed by Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France). The capture library consisted of 51,073 overlapping RNA probes of 120 bp (baits) targeting 3458 exons belonging to 789 genes and their upstream promoter regions (up to 1 kb upstream ATG) as described in Faucon et al. (2015). These genes were chosen according to their potential role in insecticide resistance. Capture was performed according to the 'SureSelect Target Enrichment System for Illumina Paired-end Sequencing Library version 1.5' protocol with 3 µg DNA. Captured DNA fragments were amplified, purified, multiplexed and paired-end sequenced on a Genome Analyzer IIx (Illumina) producing 76 bp reads. Sequencing depth was adjusted to reach an average coverage of targeted regions $> 60\times$ for each sample. Reads were checked for quality using FastQC and reads were then filtered based on their length, pairing and quality using Trimmomatic (Bolger et al., 2014) as described in Faucon et al. (2015). Only paired reads were retained for mapping. Reads were mapped to *Ae. aegypti* genome (AaegL5 assembly) using BWA (Li and Durbin 2009) with default parameters implemented into a Galaxy pipeline (<http://galaxyproject.org>). Mapped reads were loaded into Strand NGS V2.2 (Strand Life Sciences) and further filtered according to their mapping quality (alignment score ≥ 95). Only primary hits were conserved in case of multiple mapped reads.

Copy number variations affecting each targeted gene were estimated based on coverage data estimated from filtered reads as described in Faucon et al. (2015). Detection of Copy Number Variations (CNV) was based on coverage fold change (FC) between samples. Genes satisfying the following conditions were considered affected by a positive CNV associated with resistance: $FC[Imida-R / Bora-Bora] \geq 1.5\text{-fold}$ (*corresponding to a duplication in $\geq 50\%$ individuals*) AND $FC[Imida-S / Bora-Bora] > 1.05\text{-fold}$ (*corresponding to a duplication in $\geq 5\%$ individuals*) AND $FC[Imida-R / Imida-S] \geq 1\text{-fold}$ (*more copies in Imida-R as compared to Imida-S*).

Polymorphisms (SNPs, MNPs and indels) were called against the reference genome by using Strand NGS V2.2 (Strand Life Sciences) and for each variation, allele frequencies were computed for each line based on the number of reads supporting each allele. Only substitutions showing $> 5\%$ allele frequency variation across lines were retained. SNPs for which frequency variations satisfied the same conditions as for RNA-seq polymorphisms analysis (see above) were considered associated with resistance (Diff SNPs). Genic effects were computed as described above

For promoter regions, the correlation between the frequency of SNPs located upstream detoxification genes over-transcribed in association with resistance and their transcription levels were tested across all

conditions using Pearson's tests. Then, the effect of variations positively correlated with transcription levels was examined *in silico* by comparing transcription factor binding sites (TFBS) at each locus between the reference and the variant alleles. TFBS were screened with Promo V3.0 (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) using Transfac V8.3 database restricted to animals and factors of at least six bp as described in Faucon et al. (2017). DNA patterns showing $\leq 5\%$ matrix dissimilarity with known TFBS were retained and compared between reference and variant haplotypes. Differential TFBS were then manually curated and those likely having a major impact on gene regulation were identified based on i) their differential occurrence between reference and variant alleles, ii) their known enhancer effect on detoxification genes, iii) their expected effect in regards of the positive/negative correlation between the frequency of the variant allele and transcription level and iv) their position relative to core promoter elements and the putative transcription starting site. Putative transcription starting sites were manually identified based on the presence of core promoter elements previously identified in arthropods (Cherbas and Cherbas, 1993)(Juven-Gershon and Kadonaga, 2010)

3. Results

3.1. Dynamics of resistance through the selection process

Monitoring larval resistance to imidacloprid along the selection process confirmed the gradual increase of resistance in the selected Imida-R line with a RR_{50} reaching 9.5-fold at generation 19 and then stabilizing around 8-fold as compared to the susceptible parental line Bora-Bora (Fig. 1). The release of imidacloprid selection from generation 11 (Imida-S line) led to the gradual decrease of resistance with a RR_{50} decreasing to 3.2-fold at generation 30.

3.2. Larval and adult cross-resistance to pyrethroids

Comparative bioassays revealed a significant cross-resistance of the Imida-R line to the two pyrethroids permethrin and deltamethrin at the larval stage as compared to the parental Bora-Bora strain (Fig. 2A). No significant constitutive cross resistance was observed in adult females (Fig. 2B) when obtained from unexposed larvae. However, when the adult females of the imida-R line used for bioassays were obtained from larvae surviving imidacloprid exposure, a significant increased resistance to both pyrethroids was observed for the Imida-R line as compared to the parental Bora-Bora strain suggesting that the expression of resistance alleles can be induced by the insecticide (Fig. 2C).

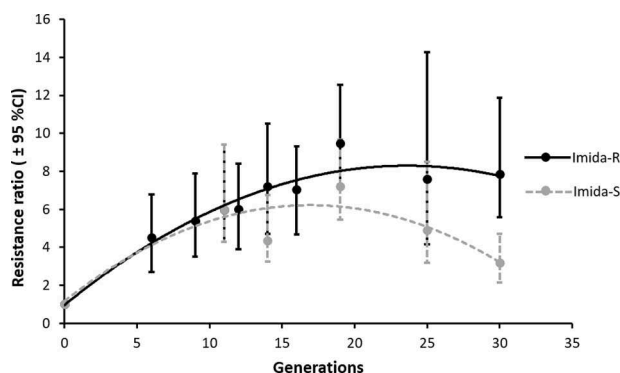


Fig. 1. Evolution of larval imidacloprid resistance through the selection process. Resistance levels are indicated as RR_{50} based on LC_{50} estimated from dose-response bioassays. The imida-R line is shown in black while the Imida-S line for which selection pressure was release from generation 11 is shown in gray. For each line best fitting curves are shown.

3.3. Fitness costs associated with resistance

Comparison of larval development rates between the three lines revealed a delay of emergence for Imida-R females as compared to females of the susceptible parental Bora-Bora strain ($X^2 = 139$, $df = 1$, p -value ≈ 0) while no significant delay was observed for Imida-S females (Fig. 3A). No significant differences were observed in males between the Imida-R or the Imida-S lines and the parental Bora-Bora strain (Fig. 3B).

3.4. Transcription level variations associated with imidacloprid resistance

The 6145 annotated transcripts showing a transcription level > 0.5 RPKM were manually associated to 13 functional categories (Fig. 4A). Twenty annotated genes were differentially transcribed in association with resistance with a higher transcription ratio observed in the Imida-R line than in the Imida-S line (DE genes, see methods). These DE genes encompassed 14 genes over-transcribed and 6 genes under-transcribed. Functional categories enrichment analyses performed on the differentially transcribed genes indicated a strong enrichment of cytochrome P450s (P450s) and glycosyl-transferases (UGT) among over-transcribed genes (Fig. 4A). Four P450 genes belonging to *CYP6* (*CYP6BB2* and *CYP6M11*), *CYP9* (*CYP9M9*) and *CYP4* (*CYP4H28*) families and two UGTs (*AAEL002688* and *AAEL001816*) were found over-transcribed in association with imidacloprid resistance. Among them the three P450 genes *CYP6BB2*, *CYP9M9* and *CYP4H28* showed the highest transcription ratios in the resistant line Imida-R (3.2-fold, 2.96-fold and 2.89-fold respectively) and lower transcription ratios in the Imida-S line obtained by releasing the selection pressure. Other differentially transcribed genes belong to various functional categories that were not enriched nor commonly associated with known insecticide resistance mechanisms. Among them, several enzymes involved in cellular metabolism appeared markedly dysregulated (allantoicase, cdp-DAG-3-P3-phosphatidyltransferase, glycoside hydrolase and metalloprotease). (Fig. 4B).

3.5. Polymorphisms associated with imidacloprid resistance

Targeted DNA-seq identified a total of 34,858 variations called against the reference genome with 24,252 (69%) being polymorphic between lines. Among them, 421 (1.2%) were associated with resistance to imidacloprid (Diff SNPs) with 64 (0.18%) affecting the protein sequence of 31 annotated genes (NS Diff SNPs). RNA-seq allowed the calling of 130,672 variations against the reference genome with 64,172 (49%) being polymorphic between lines. Among them, 906 (0.69%) were associated with resistance to imidacloprid (Diff SNPs) with 120 (0.09%) affecting the protein sequence of 151 annotated genes (NS Diff SNPs). Functional enrichment analysis (from global RNA-seq polymorphism data) identified a 2-fold significant enrichment of Diff SNP affecting P450 genes (Fig. 5A). Such enrichment reached 5-fold when only considering Diff NS SNPs. A significant 2.5-fold enrichment of NS Diff SNP was also observed for other enzymes families not likely involved in detoxification processes.

A focus on detoxification enzymes revealed 27 NS Diff SNPs affecting 18 distinct detoxification genes (Fig. 5B). These genes included twelve P450s mainly of the *CYP4* and *CYP9* families, two CCEs, one UGTs, one ABC transporters, one sulfotransferase and one oxidase/peroxidase. The NADPH P450 reductase *AAEL025363* was also affected by one NS Diff SNP. Among all NS Diff SNPs affecting detoxification enzymes two were located in the putative substrate recognition sites (SRS) of the P450s *CYP6AH1* and *CYP9J15*.

3.6. Genomic variations associated with the over-transcription of detoxification genes associated with imidacloprid resistance

Copy number variation (CNV) analysis inferred from pool targeted DNA-seq did not evidence any CNV associated with the over-

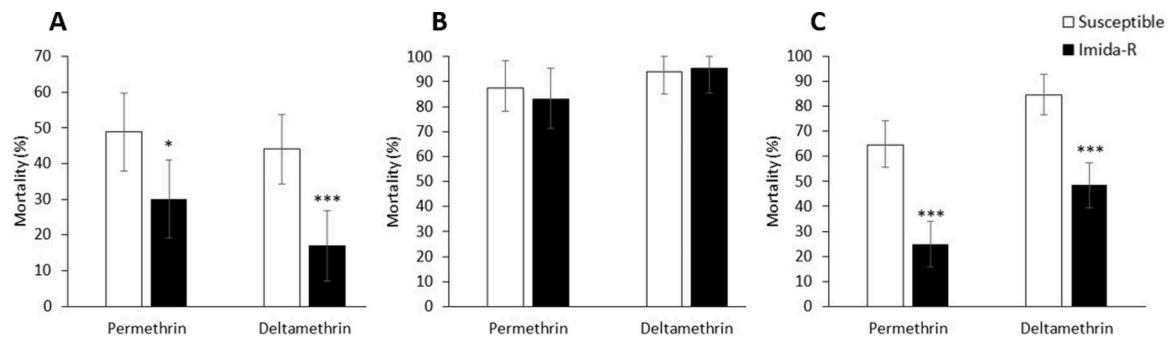


Fig. 2. Cross-resistance of the Imida-R line to pyrethroids. A. Comparative larval bioassays between the Imida-R line and the susceptible parental Bora-Bora strain. B. Comparative adult bioassays between the Imida-R line and the susceptible parental Bora-Bora strain with individuals obtained from larvae not exposed to imidacloprid. C. Comparative adult bioassays between the Imida-R line and the susceptible parental Bora-Bora strain with individuals obtained from larvae surviving to 1.5 mg/L imidacloprid. Histograms represent mean mortality rates $\pm$ Wald's confident interval across 5 replicates (Fisher exact test: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

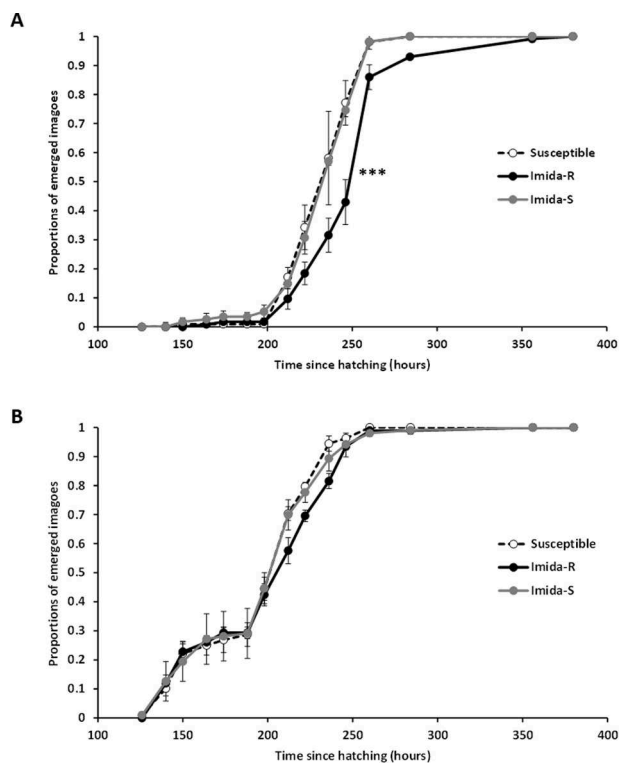


Fig. 3. Comparison of development rates between lines. A. Distribution of individual time-to-emergence in females. B. Distribution of individual time-to-emergence in males. Each dot represent the mean of three biological replicates $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ as compared to the susceptible parental line (Kaplan-Meier test).

transcription of detoxification genes associated with imidacloprid resistance (data not shown). The mapping of targeted DNA-seq reads to promoter regions allowed identifying 56 Diff SNPs upstream detoxification genes but none of them were affecting genes over-transcribed in association with resistance. Testing for positive correlations between the transcription levels of the seven detoxification genes associated with resistance and the allele frequency of their promoter variations across all lines identified two variations significantly correlated with the over-transcription of the P450 *CYP6BB2* ($r > 0.98$ and $p < 0.05$). In silico analysis of *CYP6BB2* promoter sequence suggested that these two variations are potentially enhancing the binding of transcription factors previously identified as transcriptional enhancers of detoxification genes (Fig. 6). The $G > T$ at position -69 (relative to ATG) enhances the binding of the Adf-1 factor while the $A > G$ at position -104 enhances

the binding of the COE-1, Nkx2-1 and C/EBP α / β elements.

4. Discussion

In the context of the widespread resistance of mosquitoes to most chemical insecticides used in public health, the particular mode of action of neonicotinoids have suggested their use as a possible alternative to current insecticides (Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008; Tiaw-sirisup et al., 2007). Imidacloprid and other neonicotinoids alone or in mixture with deltamethrin have demonstrated their efficiency against mosquitoes including those resisting pyrethroids (Corbel et al., 2004; Darriet and Chandre 2013; Urugayala et al., 2015). However, a previous study suggested that P450-mediated resistance to imidacloprid can be selected from standing genetic variation after only few generations of selection at the larval stage in *Ae. aegypti* (Riaz et al., 2013). Because no other neonicotinoid-resistant mosquito strain has been described yet, the present study aimed at complementing the data obtained by Riaz et al. (2013) and David et al. (2014) by studying the same *Ae. aegypti* selected line but with up to twenty more generations of imidacloprid selection in order to strengthen the resistance phenotype. An additional line was also created by releasing the selection pressure in order to investigate fitness costs associated with resistance and improve the detection power of resistance allele through an integrated approach combining RNA-seq and DNA-seq targeting more than 750 candidate genes.

Larval bioassays confirmed the further increased larval resistance of the Imida-R line to imidacloprid as compared to Riaz et al. (2013) although a saturation of RR_{50} around 8-fold was observed after 25 generations of selection. Considering the full susceptibility of the parental strain Bora-Bora, the saturation of RR_{50} may reflect the progressive enrichment of low-effect resistance alleles and their association through recombination in the Imida-R line and/or the expression of fitness costs associated with resistance (McKenzie and Batterham 1994). Relaxing insecticide selection pressure from G_{11} led to the progressive decrease of resistance in the Imida-S line confirming that resistance alleles were not fixed at G_{11} and are associated with significant fitness costs (Chown and Gaston 1999; Harak et al., 1999; Hostetler et al., 1994). Insecticide resistance has frequently been associated with fitness costs often compensated by an increased energetic metabolism. If such compensation does not take place, the energy reallocation for expressing the resistance phenotype may impair fundamental physiological processes such as development and reproduction (Chown and Gaston 1999; Harak et al., 1999; Hostetler et al., 1994). Indeed, in the Imida-R line, the time to emergence increased by nearly 3 days in females as compared to the susceptible parental line. This phenomenon was no longer observed in the Imida-S line supporting the association of this trait with resistance. These findings agree with previous studies reporting an increased larval development time in insecticide resistant

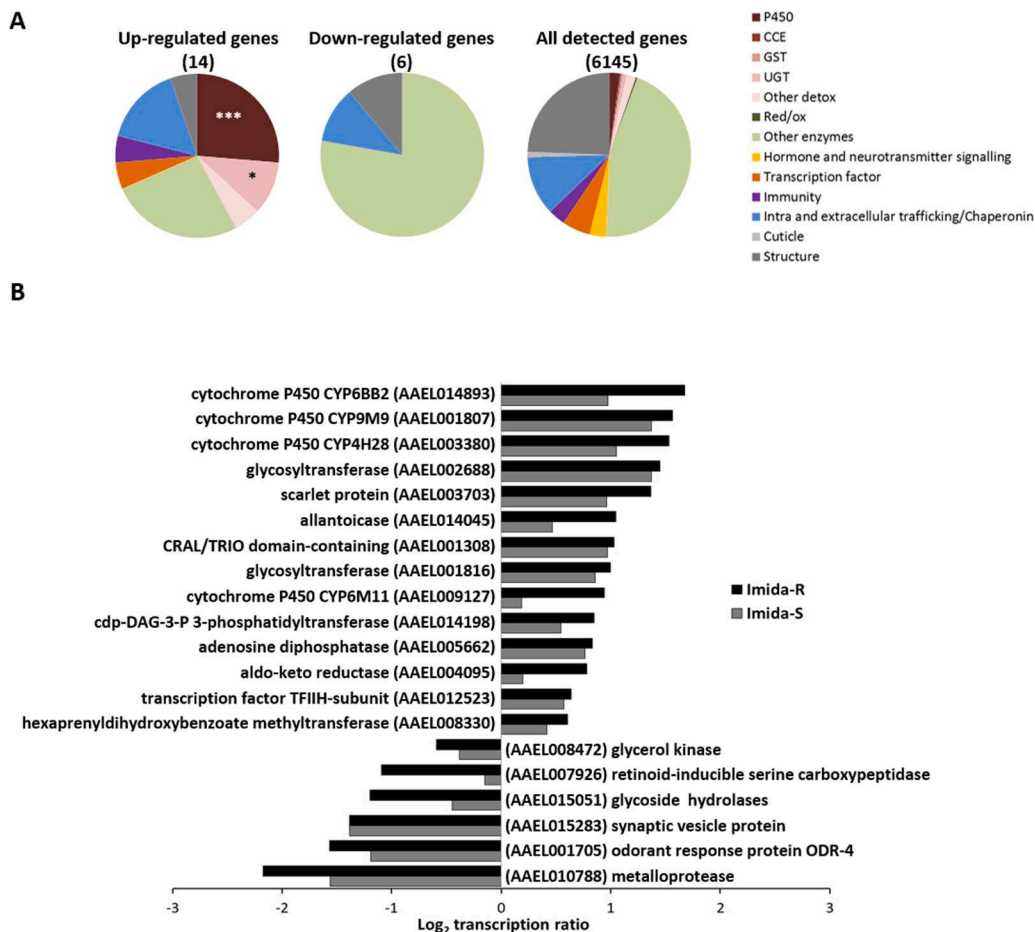


Fig. 4. Transcription level variations associated with imidacloprid resistance. A. Distribution of predicted gene functions associated with differentially transcribed genes. The number of genes significantly over- and under-transcribed are indicated between brackets. Gene functions significantly enriched compared to all detected genes are indicated (Fisher exact test: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). B. Transcription ratios of differentially transcribed genes in the Imida-R (black) and Imida-S (gray) lines as compared to the parental susceptible strain.

Ae. aegypti populations (Diniz et al., 2015; Paris et al., 2011). The sex-dependency of this trait observed might be explained by the higher need for females to accumulate resources for the adult stage (Tabbabi and Daaboub 2018). Variation in larval development time is the primary cause of variation of generation time in natural mosquito populations (Moeur and Istock 1980). The duration between hatching to adult reproduction is a crucial component of fitness in expanding populations (Charlesworth 1980). In resistant insects, resistance cost is frequently associated with an increased activity of enzymes involved in cellular catabolism (Araujo et al., 2008). Although such compensation response was observed from gene expression data in the Imida-R line after 10 generations of selection (Riaz et al., 2013), it was less apparent after 30 generations of selection suggesting its progressive replacement by less costly mechanisms. However, the increased development time observed might also be associated with an alteration of hormone homeostasis as P450s such as *CYP18A1* and *CYP305A5* likely associated with steroidogenesis in *Ae. aegypti* were both affected by non-synonymous variations in the Imida-R resistant line (Margam et al., 2006; Prud'homme et al., 2018).

Our RNA-seq approach identified several genes encoding detoxification enzymes belonging to the P450 and UGT families being over-transcribed in association with imidacloprid resistance. Such an increase in detoxification enzyme transcription levels was previously associated with increased P450 activities in Imida-R larvae and a higher P450-dependent imidacloprid metabolism suggesting that, as in other insects, P450s play a key role in imidacloprid resistance (Riaz et al., 2013). Among the four P450s identified, *CYP6BB2* and *CYP9M9* were previously found over-transcribed in the Imida-R line at G₁₁ (David et al., 2014; Riaz et al., 2013), supporting their potential role in imidacloprid resistance. *CYP9M9* was also shown to be induced in larvae following

exposure to imidacloprid (David et al., 2010) and over-transcribed in some pyrethroid-resistant populations (Smith et al., 2016). The high homology of *CYP6BB2* substrate binding site with *Bemisia tabaci* *CYP6CM1vQ* known to metabolize imidacloprid also supports its role in imidacloprid resistance (Karunker et al., 2009). *CYP6BB2* over-transcription through up-regulation and/or gene duplication has also been frequently associated with pyrethroid resistance (Cattel et al., 2020a; Faucon et al., 2015; Faucon et al., 2017; Moyes et al., 2017; Smith et al., 2016) and this P450 has been shown capable of metabolizing permethrin (Kasai et al., 2014). Although the ability of *CYP6M11* to metabolize insecticides remains to be demonstrated, this gene was shown to be induced by several xenobiotics including the insecticide permethrin (Poupardin et al., 2010) and was also frequently associated with pyrethroid resistance in *Ae. Aegypti* (Dusfour et al., 2015; Goindin et al., 2017; Marcombe et al., 2012; Marcombe et al., 2009; Moyes et al., 2017). Altogether, these data support the capability of these P450s to confer resistance to various insecticides and their role in the cross-resistance of the Imida-R line to pyrethroids at the larval stage. In this regard, the absence of constitutive cross-resistance to pyrethroids observed in adults may be explained by the lower expression of some of these genes such as *CYP9M9* in adult females (Poupardin et al., 2010). Such stage-dependent resistance phenotype was also observed for imidacloprid in the Imida-R line by Riaz et al. (2013). Then, the significant cross-resistance phenotype observed in adult females obtained from larvae surviving imidacloprid suggest that the lower constitutive cross-resistance of adults may be compensated by P450 induction following insecticide exposure as shown for both *CYP6M11* and *CYP9M9* (Poupardin et al., 2010).

Over-transcription can be caused by gene Copy Number Variation (CNV) or transcriptional regulation. In mosquitoes, copy number

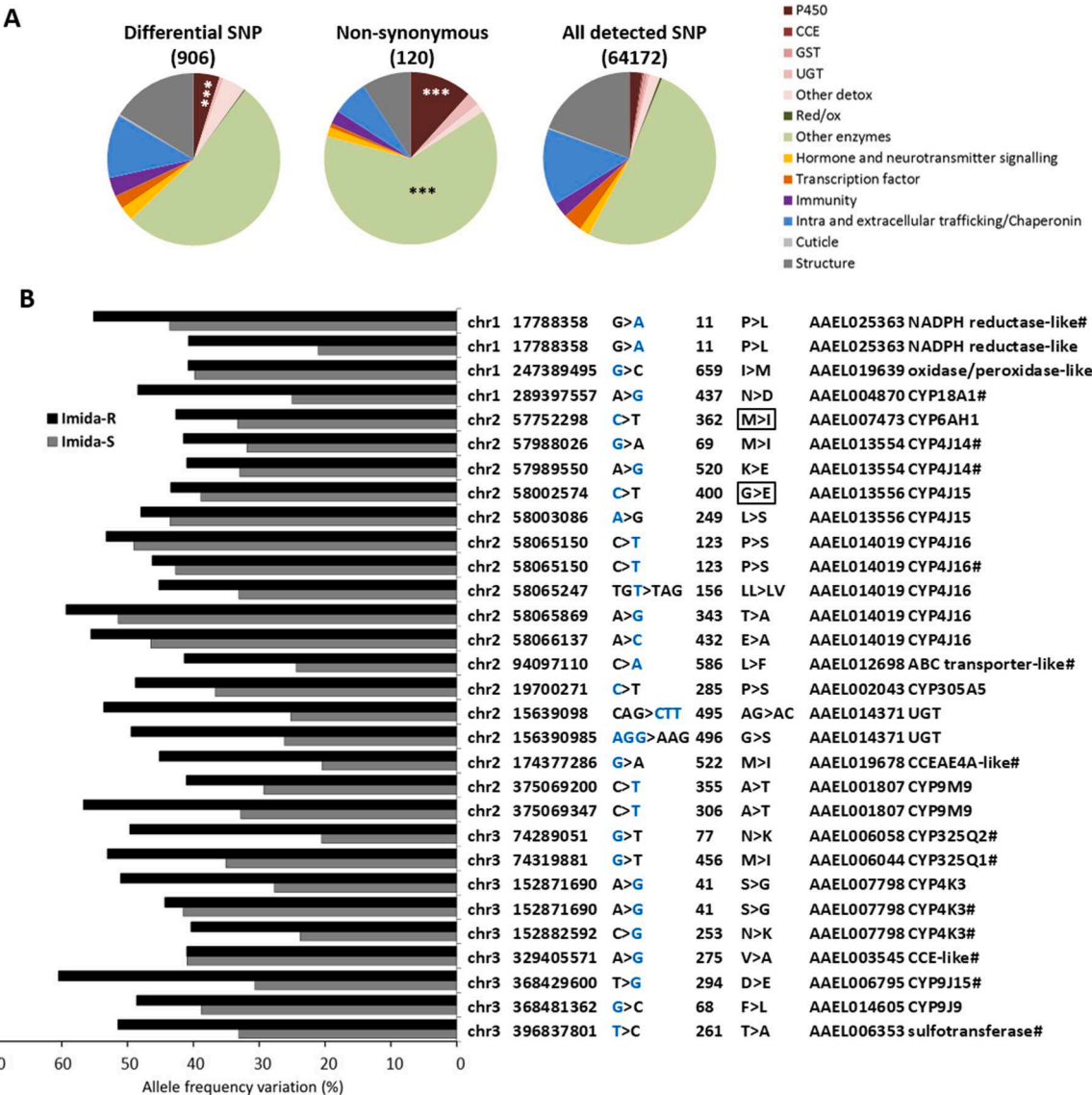


Fig. 5. Polymorphisms associated with imidacloprid resistance. A. Distribution of predicted gene functions affected by Diff SNPs and NS Diff SNPs detected by RNA-seq. The number of variations are indicated between brackets. Functions significantly enriched as compared to all detected variations are indicated (Fisher exact test: $***P < 0.001$). B. NS Diff SNPs affecting detoxification enzymes. Frequency variations in the Imida-R line (black) and in the Imida-S line (gray) as compared to the parental susceptible line are indicated by bar charts. “#”marks indicate NS Diff SNPs identified by DNA-seq while no mark indicate those identified by RNA-seq. For each variation, the allele represented in the histogram is indicated in blue. Boxed amino acid changes indicate variations likely affecting substrate binding site.

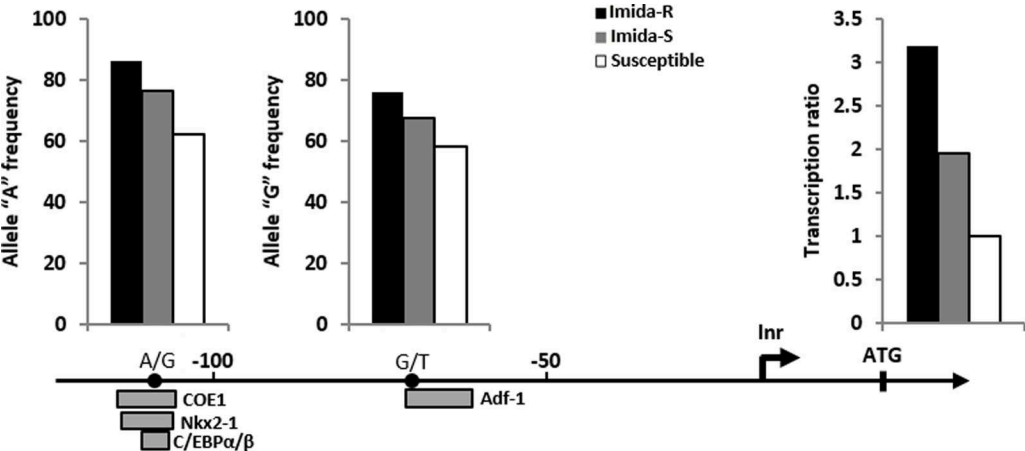


Fig. 6. Promoter variations associated with the over-transcription of CYP6BB2 in the resistant line. Only variations positively correlated with transcription level and potentially enhancing the binding of transcription enhancers previously associated with the regulation of detoxification genes are shown. Transcription levels and allele frequencies are shown for each condition (Imida-R line: black; Imida-S line: gray; Susceptible parental line: white). Transcription factor names and transcription initiation site (Inr) are indicated.

variations (CNV) has been highlighted as a frequent mechanism leading to the over-expression of detoxification enzymes in response to insecticide selection (Cattell et al., 2020b; Faucon et al., 2015; Faucon et al., 2017; Lucas et al., 2019; Weetman et al., 2018). By combining controlled crosses with targeted DNA-seq, Cattell et al. (2020a) identified multiple P450s affected by CNV in association with insecticide resistance in a multi-resistant population from French Guiana. Among them, a duplication of a *CYP6* gene cluster including *CYP6BB2* was associated with pyrethroids resistance. In the present study, no CNV affecting *CYP6BB2* or any other detoxification gene was detected in association with resistance as a probable consequence of an absence of the duplicated resistance alleles in the parental line. Such absence of CNV suggests that the up regulation of detoxification genes can be rapidly selected by insecticides from standing genetic variation and that CNV may act as an additive adaptive mechanism further enhancing gene expression. Indeed, though the over-expression of *CYP6BB2* has been associated with a gene duplication in the South American region, this gene was also found over-expressed solely due to up regulation in a resistant line from Singapore (Kasai et al., 2014; Smith et al., 2018). Although mutations affecting promoters are frequently linked to up regulation of P450 in insecticide-resistant populations, transcription factors involved have rarely been identified (Feyereisen et al., 2015; Ingham et al., 2017). Here, we identified two substitutions showing an allele frequency correlated with the transcription level of *CYP6BB2* and likely enhancing the binding of transcription factors previously associated with P450 up-regulation. Among them, C/EBPs and Nkx2-1 were shown to induce the over-transcription of P450s in mammals (Kolla et al., 2007; Martinez-Jimenez et al., 2005). In addition, C/EBP-like transcription factors have been found upregulated in DDT-resistant anopheles populations (Kolla et al., 2007; Martinez-Jimenez et al., 2005) suggesting their involvement in insecticide resistance in mosquitoes. Recently, Smith et al. (2018) demonstrated the role of trans-regulation in the overexpression of several P450s including *CYP6BB2*. Undoubtedly, characterizing the resistance spectrum and the variety of genetic events leading to the over-expression of mosquito P450s playing a key role in insecticide resistance such as *CYP6BB2* is of high interest for resistance monitoring and management.

Though genes encoding the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) targeted by imidacloprid were included in the genes targeted by DNA-seq, no non-synonymous mutation affecting these genes were found associated with imidacloprid resistance. Indeed, no target-site mutation affecting the nAChR has been described yet in mosquitoes (Bass et al., 2015). Even if such mutation exists in *Ae. aegypti* natural populations, its absence in the susceptible parental line would have precluded its selection in the present study. In turn, multiple detoxification enzymes were affected by non-synonymous mutations associated with resistance including several P450s and their redox partner the NADPH P450 reductase. Although most of these variations are probably not functionally associated with resistance and may have been enriched by genetic drift, this may also reflect the strong selection pressure undertaken by genes involved in P450-mediated metabolism during selection with imidacloprid. Indeed, particular detoxification enzyme variants may be associated with an increased metabolic activity against imidacloprid. Such a variation affecting *GSTE2* and conferring an increased DDT metabolism has been identified in *An. fumeatus* and is under strong selection pressure in Africa (Riveron et al., 2014). Similarly, variants of the esterase $\alpha E7$ from *Lucilia cuprina* have been associated with increased activity toward organophosphates and deltamethrin (Coppin et al., 2012; Devonshire et al., 2007; Heidari et al., 2005; Newcomb et al., 1997). In our study, the P450 *CYP9M9* whose over-transcription was associated with imidacloprid resistance was also affected by two non-synonymous variations associated with resistance. In addition, one cluster of *CYP* genes including *CYP6AH1*, *CYP4J14*, *CYP4J15* and *CYP4J16* located at ~ 58 Mb on chromosome 2 appeared particularly affected by imidacloprid selection with 10 NS Diff SNP associated with resistance. Among them, two variations affecting

CYP6AH1 and *CYP4J15* were located within the SRS of P450s and may affect the metabolism of insecticides (Feyereisen 2005). Interestingly the M362I point mutation affecting *CYP6AH1* previously associated with resistance at G₁₀ (David et al., 2014) was also associated with resistance at G₃₀. Whether these particular mutations have arisen due to drift effects, are highlighting the selection imprint affecting these P450s, or are involved in insecticide metabolism requires additional work. Nevertheless, the strong enrichment of P450s within the genes affected by non-synonymous variations supports the selection of P450 variants involved in acute insecticide degradation in the early steps of the selection process (Faucon et al., 2015; Faucon et al., 2017; Kasai et al., 2014; Smith et al., 2018).

The use of the same insecticides families for decades have led to the emergence and spread of insecticide resistance in mosquitoes, often reducing the efficacy of vector control. One resistance management strategy consists in the introduction of novel active ingredients having a different mode of action and therefore being not likely affected by existing resistance mechanisms. Among insecticides having been proposed for controlling pyrethroid resistance, neonicotinoids were suggested to be of high interest (Darriet and Chandre 2013) since they target nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) which constitute a novel target for vector control (Agossa et al., 2018). Though nAChR mutations conferring neonicotinoid resistance have not been identified in mosquitoes, this does not mean that they are not present at low frequency in particular mosquito populations such as those regularly exposed to neonicotinoids used in agriculture. In addition, our study demonstrates that metabolic resistance alleles, likely including P450s, can be rapidly selected upon selection with neonicotinoids and that some of them likely also confer resistance to pyrethroids. Such a P450-mediated cross-resistance between neonicotinoids and pyrethroids has frequently been reported in agricultural pests (Bass et al., 2015; Le Goff et al. 2003; Ma et al., 2019; Wei et al., 2017) and clearly raises concerns about the use of neonicotinoids alone for managing pyrethroid resistance in mosquitoes. Such an hypothesis is supported by recent studies pointing out the presence of neonicotinoid resistance alleles in *Anopheles* populations located in intensive agriculture areas (Fouet et al., 2020; Mouhamadou et al., 2019). In this perspective, using neonicotinoids in combination with other insecticides to target mosquitoes should be envisaged, especially in areas where metabolic resistance alleles to pyrethroids are circulating.

5. Conclusion

The present study confirms that metabolic resistance alleles can be selected from standing genetic variation after a few generations of selection with imidacloprid in the mosquito *Ae. Aegypti*. As in other insects, P450-mediated insecticide metabolism appears to play a key role in neonicotinoid resistance in mosquitoes and can lead to cross-resistance with pyrethroids. Though further work is required to fully validate the functional role of the P450s identified, their previous involvement in insecticide resistance and their homology with known neonicotinoid-metabolizing P450s identified in other insects support their role in neonicotinoid resistance. Whether these P450s will be selected by neonicotinoids in the field cannot be fully ruled out yet, though they represent a good value for studying neonicotinoid resistance in agricultural areas and monitoring resistance dynamics following the implementation of neonicotinoids for vector control.

Credit author statement

Conceptualization: JPD, SR
 Methodology: MGZ, TG, SMP, MAR, JPD, SR
 Investigation: MGZ, TG, SMP, MAR, JPD, SR
 Data Curation: JPD, SR
 Writing - Original Draft: JPD, SR
 Writing - Review & Editing: JPD, SR

Supervision: JPD, SR

Project administration: JPD, SR

Data availability statement

The RNA-seq sequence data from this study have been deposited at the European Nucleotide Archive (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number PRJEB42696 and at NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/submission.html>) under the accession number GSE174009. DNA-seq data from this study have been deposited at the European Nucleotide Archive under accession number PRJEB42685.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by fundings from the Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA). M.G.Z was supported by a PhD fellowship from Bayer company. We acknowledge support from the federative structure Environmental and Systems Biology (BEeSy) of Grenoble-Alpes University.

References

- Agossa, F.R., Padonou, G.G., Fassinou, A., et al., 2018. Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora(R) Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa. *Malar. J.* 17 (1), 484. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2633-6>.
- Araujo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J. Stored Prod. Res.* 44 (4), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.03.006>.
- Bao, H., Gao, H., Zhang, Y., Fan, D., Fang, J., Liu, Z., 2016. The roles of CYP6AY1 and CYP6ER1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: expression levels and detoxification efficiency. *Pestic. Biochem. Physiol.* 129, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.020>.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>.
- Black, W.C., Vontas, J.G., 2007. Affordable assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in insects. *Insect. Mol. Biol.* 16 (4), 377–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00736.x>.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Cattell, J., Faucon, F., Le Peron, B., 2020a. Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evol. Appl.* 13 (2), 303–317. <https://doi.org/10.1111/eva.12867>.
- Cattell, J., Haberkorn, C., Laporte, F., et al., 2020b. A genomic amplification affecting a carboxylesterase gene cluster confers organophosphate resistance in the mosquito *Aedes aegypti*: from genomic characterization to high-throughput field detection. *Evol. Appl.* <https://doi.org/10.1111/eva.13177> in press.
- Charlesworth, B., 1980. The cost of sex in relation to mating system. *J. Theor. Biol.* 84 (4), 655–671. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(80\)90026-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(80)90026-9).
- Cherbas, Lucy, Cherbas, Peter, 1993. The arthropod initiator: The capsid consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23 (1), 81–90. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90085-7](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90085-7).
- Chown, S.L., Gaston, K.J., 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biol. Rev. Cambridge Philosophic. Soc.* 74 (1), 87–120. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00182.x>.
- Coppin, C.W., Jackson, C.J., Sutherland, T., et al., 2012. Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 42 (5), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.01.004>.
- Corbel, V., Duchon, S., Zaim, M., Hougard, J.M., 2004. Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 41 (4), 712–717. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.712>.
- Crawford, J.E., Alves, J.M., Palmer, W.J., et al., 2017. Population genomics reveals that an anthropophilic population of *Aedes aegypti* mosquitoes in West Africa recently gave rise to American and Asian populations of this major disease vector. *BMC Biol.* 15 (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0351-0>.
- Crossthwaite, A.J., Rendine, S., Stenta, M., Slater, R., 2014. Target-site resistance to neonicotinoids. *J. Chem. Biol.* 7 (4), 125–128. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0116-y>. PMID: 25320645; PMCID: PMC4182339.
- Darriet, F., Chandre, F., 2013. Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae). *Pest Manag. Sci.* 69 (8), 905–910. <https://doi.org/10.1002/ps.3446>.
- David, J.P., Coissac, E., Melodelima, C., et al., 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 11, 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-216>.
- David, J.P., Faucon, F., Chandor-Proust, A., et al., 2014. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* 15, 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-174>.
- David, J.P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J., 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B. Prog. Nucl. Energy Biol. Sci.*, 1612 368, 20120429. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>.
- Devonshire, A.L., Heidari, R., Huang, H.Z., Hammock, B.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2007. Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37 (9), 891–902. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.011>.
- Diniz, D.F., de Melo-Santos, M.A., Santos, E.M., et al., 2015. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasit Vectors* 8:662 doi:10.1186/s13071-015-1276-5.
- Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., Girod, R., 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (3), 346–352. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000300015>.
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J.P., et al., 2019. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: advances and challenges. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (10), e0007615 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>.
- Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., et al., 2015. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (11), e0004226 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004226>.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R., 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64 (11), 1099–1105. <https://doi.org/10.1002/ps.1616>.
- Faucon, F., Dusfour, I., Gaude, T., et al., 2015. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res.* 25 (9), 1347–1359. <https://doi.org/10.1101/gr.189225.115>.
- Faucon, F., Gaude, T., Dusfour, I., et al., 2017. In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: an integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (4), e0005526 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005526>.
- Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., et al., 2010. Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in *B-biotype Bemisia tabaci* (Hemiptera: aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.* 66, 313–318. <https://doi.org/10.1002/ps.1877>.
- Feyerisen, R., 2005. *Insect Cytochrome P450*. In: Gilbert, L.I., Latrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam vol 4.
- Feyerisen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.004>.
- Fouet, C., Ashu, A.F., Ambadiang, M.M., Tchappa, W.T., Wondji, C.S., Kamdem, C., 2020. Resistance of *Anopheles gambiae* to the new insecticide clothianidin associated with unrestricted use of agricultural neonicotinoids in Yaoundé, Cameroon, 2020. *BioRxiv*, 08.06.239509.
- Franz, A.W., Balaraman, V., Fraser Jr., M.J., 2015. Disruption of dengue virus transmission by mosquitoes. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 8, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.12.009>.
- Fuseini, G., Phiri, W.P., von Fricken, M.E., Smith, J., Garcia, G.A., 2019. Evaluation of the residual effectiveness of Fludora fusion WP-SB, a combination of clothianidin and deltamethrin, for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Acta Trop.* 196, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.006>.
- Goindin, D., Delannay, C., Gelas, A., et al., 2017. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect. Dis. Poverty* 6 (1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0254-x>.
- Harak, M., Lamprecht, I., Kuusik, A., Hiiesaar, K., Metspalu, L., Tärtes, U., 1999. Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochim Acta* 333 (1), 39–48. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(99\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(99)00093-3).
- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G., Russell, R.J., 2005. Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35 (6), 597–609. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.018>.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., Mccarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.

- Hostetler, M.E., Anderson, J.F., Lanciani, C.A., 1994. Pesticide resistance and metabolic rate in german cockroaches (Dictyoptera, Blattellidae). *Florida Entomologist* 77 (2), 288–290. <https://doi.org/10.2307/3495517>.
- Ingham, V.A., Pignatelli, P., Moore, J.D., Wagstaff, S., Ranson, H., 2017. The transcription factor Maf-S regulates metabolic resistance to insecticides in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 18 (1), 669. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4086-7>.
- Jouben, N., Heckel, D.G., Haas, M., Schuphan, I., 2008. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Manag. Sci.* 73, 65–73. <https://doi.org/10.1002/ps.1472>.
- Juven-Gershon, Tamar, Kadonaga T, James, 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology* 339 (2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., et al., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 634–644. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.008>.
- Karunker, I., Morou, E., Nikou, D., et al., 2009. Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.08.006>.
- Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., et al., 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (6), e2948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002948>.
- Kolla, V., Gonzales, L.W., Gonzales, J., et al., 2007. Thyroid transcription factor in differentiating type II cells: regulation, isoforms, and target genes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36 (2), 213–225. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0207OC>.
- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, N.J., et al., 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33 (7), 701–708. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(03\)00064-x](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00064-x).
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25 (14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- Li, X., Ma, Schuler, Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>.
- Lucas, E.R., Miles, A., Harding, N.J., et al., 2019. Whole-genome sequencing reveals high complexity of copy number variation at insecticide resistance loci in malaria mosquitoes. *Genome Res.* 29 (8), 1250–1261. <https://doi.org/10.1101/gr.245795.118>.
- Ma, K., Tang, Q., Zhang, B., Liang, P., Wang, B., Gao, X., 2019. Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflox resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pestic. Biochem. Physiol.* 157, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.021>.
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., et al., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE* 7 (2), e30989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030989>.
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., et al., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique (French West Indies). *BMC Genomics* 10, 494. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-494>.
- Margam, V.M., Gelman, D.B., Palli, S.R., 2006. Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *J. Insect Physiol.* 52 (6), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.02.003>.
- Martinez-Jimenez, C.P., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V., Jover, R., 2005. Transcriptional regulation of the human hepatic CYP3A4: identification of a new distal enhancer region responsive to CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms (liver activating protein and liver inhibitory protein). *Mol. Pharmacol.* 67 (6), 2088–2101. <https://doi.org/10.1124/mol.104.008169>.
- McKenzie, J.A., Batterham, P., 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol. Evol.* 9 (5), 166–169. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90079-5).
- Miah, M.A., Elzaki, M.E.A., Han, Z., 2017. Resistance irrelevant CYP417A2v2 was found degrading insecticide in *Laodelphax striatellus*. *Ecol. Evol.* 7 (14), 5032–5040. <https://doi.org/10.1002/ece3.3047>.
- Moeur, J., Istock, C., 1980. Ecology and evolution of the pitcher-plant mosquito. IV. Larval influence over adult reproductive performance and longevity. *J. Anim. Ecol.* 49 775–792. <https://doi.org/10.2307/4226>.
- Mouhamadou, C.S., de Souza, S.S., Fodjo, B.K., Zoh, M.G., Bli, N.K., Koudou, B.G., 2019. Evidence of insecticide resistance selection in wild *Anopheles coluzzii* mosquitoes due to agricultural pesticide use. *Infect. Dis. Poverty* 8 (1), 64. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0572-2>.
- Moyes, C.L., Vontas, J., Martins, A.J., et al., 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (7), e0005625 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>.
- Mullins, J.W., 1993. Imidacloprid - a new nitroguanidine insecticide. *ACS Symposium Series* 524, 183–198. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0524.ch013>.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (14), 7464–7468. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7464>.
- Paris, M., David, J.P., Despres, L., 2011. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20 (6), 1184–1194. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0663-8>.
- Paul, A., Harrington, L.C., Scott, J.G., 2006. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *J. Med. Entomol.* 43 (1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0663-8>.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Vontas, J., David, J.P., Reynaud, S., 2010. Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.* 19 (2), 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00967.x>.
- Pridgeon, J.W., Zhao, L.M., Becnel, J.J., Clark, G.G., Linthicum, K.J., 2008. Developmental and Environmental Regulation of AelAPI1 Transcript in *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.* 45 (6), 1071–1079. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[1071:daeroa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[1071:daeroa]2.0.co;2).
- Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.P., Reynaud, S., 2017. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: on the relevance of transgenerational studies. *Environ. Pollut.* 220 (Pt A), 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.056>.
- Prud'homme, S.M., Renault, D., David, J.P., Reynaud, S., 2018. Multiscale Approach to Deciphering the Molecular Mechanisms Involved in the Direct and Intergenerational Effect of Ibuprofen on Mosquito *Aedes aegypti*. *Environ. Sci. Technol.* 52 (14), 7937–7950. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00988>.
- Puinean, A.M., Denholm, I., Millar, N.S., Nauen, R., Williamson, M.S., 2010. Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.008>.
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., Black, W.C., 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *Trop. Infect. Dis.* 1 (1), 0–0.
- Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Dauphin-Villeman, C., et al., 2013. Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquat. Toxicol.* 126, 326–337. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.010>.
- Riveron, J.M., Yunta, C., Ibrahim, S.S., 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 (2), R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27>.
- Smith, L.B., Kasai, S., Scott, J.G., 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: important mosquito vectors of human diseases. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>.
- Smith, L.B., Tyagi, R., Kasai, S., Scott, J.G., 2018. CYP-mediated permethrin resistance in *Aedes aegypti* and evidence for trans-regulation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (11), e0006933 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006933>.
- Tabbabi, A., Daaboub, J., 2018. Fitness cost in field *Anopheles labranchiae* populations associated with resistance to the insecticide deltamethrin. *Rev. Bras. Entomol.* 62, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.12.003>.
- Tiawsirirup, S., Nithiuthai, S., Kaewthamasorn, M., 2007. Repellent and adulticide efficacy of a combination containing 10% imidacloprid and 50% permethrin against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Parasitol. Res.* 101 (3), 527–531. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0508-9>.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>.
- Uragayala, S., Verma, V., Natarajan, E., Velamuri, P.S., Kamaraju, R., 2015. Adulticidal & larvicidal efficacy of three neonicotinoids against insecticide susceptible & resistant mosquito strains. *Indian J. Med. Res.* 142 (Suppl), S64–S70. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.176624>.
- Vorou, R., 2016. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int. J. Infect. Dis.* 48, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>.
- Wang, R., Zhu, Y., Deng, L., et al., 2017. Imidacloprid is hydroxylated by *Laodelphax striatellus* CYP6AY3v2. *Insect. Mol. Biol.* 26 (5), 543–551. <https://doi.org/10.1111/imb.12317>.
- WeetmanD., DjogbenoulS., LucasE. (2018) Copy number variation (CNV) and insecticide resistance in mosquitoes: evolving knowledge or an evolving problem? Current opinion in insect science 27:82–88 doi:10.1016/j.cois.2018.04.005.
- Wei, X., Pan, Y., Xin, X., et al., 2017. Cross-resistance pattern and basis of resistance in a thiamethoxam-resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pestic. Biochem. Physiol.* 138, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.03.007>.
- WHO, 2016. Monitoring and Managing Insecticide Resistance in *Aedes* mosquito populations. Interim guidance for Entomologists. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>.