



Influence de la mutation kdr (L1014F) sur la réponse comportementale d'*Anopheles gambiae* aux insecticides pyréthrinoïdes.

Malal Mamadou Diop

► To cite this version:

Malal Mamadou Diop. Influence de la mutation kdr (L1014F) sur la réponse comportementale d'*Anopheles gambiae* aux insecticides pyréthrinoïdes. . Zoologie des invertébrés. Université de Montpellier, 2015. Français. <tel-01374896>

HAL Id: tel-01374896

<https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01374896>

Submitted on 2 Oct 2016

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques
et Biologiques pour la Santé - **ED 168**
Et de l'unité de recherche **UMR 224-MIVEGEC**

Spécialité : **Biologie-Santé**

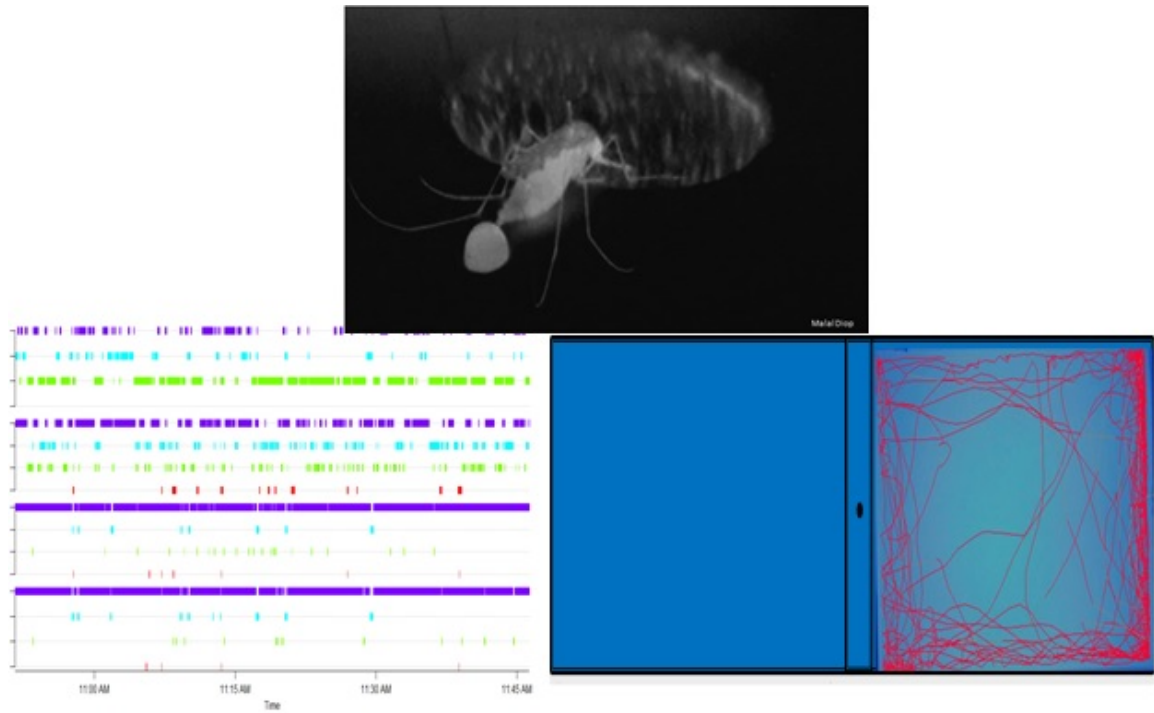
Présentée par **Malal Mamadou DIOP**

**Influence de la mutation *kdr* (L1014F) sur
la réponse comportementale d'*Anopheles
gambiae* aux insecticides pyréthrinoïdes**

Soutenue le 23 novembre 2015 devant le jury composé de

Mr Claudio LAZZARI , Professeur des universités Université François Rabelais, Tours	Rapporteur (Président du Jury)
Mme Alphonsine KOFFI , Maître de recherche Institut Pierre Richet, Côte d'Ivoire	Rapporteur
Mr Haoues ALOUT , Research associate Colorado State University, USA	Examineur
Mr Cédric PENNETIER , Chargé de recherche Institut de recherche pour le développement, Montpellier	Directeur de thèse
Mr Fabrice CHANDRE , Chargé de recherche Institut de recherche pour le développement, Montpellier	Co-directeur de thèse





Thèse : Influence de la mutation *kdr* (L1014F) sur la réponse comportementale d'*Anopheles gambiae* aux insecticides pyréthrinoïdes

Remerciements

Nous y sommes, la dernière page à écrire pour parler d'autres choses que d'expérimentations. Ici, prend fin une aventure, mais avant de la clôturer, il convient de rendre grâce à Dieu et de remercier les personnes qui ont fait de ce projet, une réussite.

Cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans Cédric PENNETIER qui m'a accordé sa confiance et son soutien pour démarrer ces travaux de recherche sur l'écologie comportement des anophèles. L'aventure a débuté, il y a quatre ans où je n'étais qu'un novice en entomologie médicale dans l'implantation secondaire de l'IRD à Cotonou. Vous m'avez guidé pas à pas dans monde de la recherche, élargit mon champ de recherche sur le comportement des insectes en général ainsi qu'à m'intéresser à l'écologie chimique. Cette aventure fut très riche en expérience et difficile avec plus de 18 mois de galère que j'ai rencontré dans la mise en place de dispositifs expérimentaux pour étudier la réponse comportementale aux odeurs de l'hôte en condition semi-naturelle. Ça n'a pas été facile de travailler sur le comportement. Je finis cette thèse avec un sentiment de satisfaction. J'ai beaucoup appris de vous. Vous avez été un mentor. Je n'ai pas été facile et tout de repos durant cette thèse. Je tenais à vous dire un grand merci pour votre compréhension et patience et pour cette opportunité que vous m'avez accordé afin de réaliser ce projet.

Je tiens à remercier Fabrice CHANDRE qui a fait de ce projet une réussite en m'accordant tous les moyens nécessaires pour réaliser mes expérimentations sur le comportement au LIN et qui a accepté de codiriger cette thèse. Vous avez toujours répondu présent pour m'aider dans toutes mes difficultés de doctorant. Merci pour l'accueil, la sympathie et la disponibilité tout au long de ma thèse.

Ce travail n'aurait pas eu sa valeur sans tous ces chercheurs qui ont accepté d'évaluer cette thèse. Merci à l'ensemble des membres de jury : Claudio LAZZARI, Alphonsine KOFFI, Haoues ALOUT.

Je remercie également ces chercheurs qui ont suivi et critiqué cette thèse aux différents comités de thèse : Claudio LAZZARI, Gérard DUVALLET, Thierry BALDET, Carlo CONSTANTINI, Anne Laure BANULS, Denis SERENO, Anna COHUET.

Je tenais à remercier ces personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail : Angélique PORCIANI, tu m'as rejoint dans l'aventure et tu as toujours été disponible, merci pour cette aide précieuse durant cette thèse. Le meilleur est à venir.

Nicolas MOIROUX, tu t'es vraiment impliqué sur ce travail de recherche, tu as toujours répondu présent à toute préoccupation concernant mes travaux, merci beaucoup.

MARIE ROSSIGNOL, sans toi mon séjour ainsi que ma vie à Montpellier n'aurait jamais été facile, toujours disponible avec le sourire, une personne attentionnée qui fait que le LIN en plus de sa renommée scientifique, est un environnement convivial, merci pour cet accueil chaleureux et ton soutien.

Carole GINIBRE merci pour ton aide à l'insectarium (et les chocolats de Pâques)

Merci à ces deux stagiaires du LIN Hadrien MARTIN-HERROU et Mathieu CHATEAU pour avoir contribué à la réalisation des dispositifs expérimentaux et des tests préliminaires.

Je remercie aussi l'équipe de l'ISEM Pascal MILESI et Pierrick LABBE.

Mes séjours au Bénin et en France ont été rendus possibles grâce à l'implication d'un bon nombre de personnes. Au Bénin, je veux remercier l'ensemble du personnel de l'IRD-CREC plus particulièrement Martin AKOGBETO (le directeur du CREC), Félix ZOUMENOU, Oriane AICHEOU, ainsi que Rita SAUDEGBEE. Un grand merci à Thierry BALDET, Vincent CORBEL, Franck REMOUE. Un remerciement particulier à Marc EGROT pour avoir répondu présent pendant une période particulièrement effrayante de cette thèse.

En France, j'aimerais d'abord remercier Didier FONTENILLE (pour m'avoir recommandé à la bourse de l'IRD), Frédéric SIMARD, Félicité METONOU, Francine MARTIN, MANUEL RIVAL, Valérie DELPLANQUE, Audrey RAVAT, Majoline Tchioffo

TSAPI et à l'ensemble du personnel du MIVEGEC avec qui j'ai passé des moments sympas d'échanges. Je n'oublie pas mes collègues à Montpellier Gildas YAHOUEDO, Abel BIGUEZOTON, Myriam HARRABI, Adama SANOU.

Sur le plan personnel, l'aventure a été riche avec plein de rencontres. :

Mes collègues et compagnons au bureau des doctorants de l'IRD-CREC : Emmanuel ELANGA merci grand frère pour ton support et tes conseils tout au long de cette traversée, Merci à Olayidé BOUSSARI et Innocent DJEGBE pour m'avoir supporté et encouragé. Merci à ma grande sœur Georgia DAMIEN pour ton hospitalité et ton soutien infailible durant toute la thèse. Merci aussi à Flore GBOFAN et à Carine AICHEOU.

En terre inconnue, j'ai rencontré deux familles géniales qui m'ont accueilli à bras ouverts, Makiath BOURAIMA & Spero HOUNKPE, Merci aussi aux familles CHAFFA de Calavi et GBENOU de Porto-Novo, many thanks to Huguette and Landri.

A Annick TUYISHIME et Jean Luc NTA « Mes potos de cototrou » Mille mercis pour les beaux moments passés ensemble. A Vestine UWIRINGIYIMANA, thanks my dia for your support and good luck for your research.

En Mauritanie, mes remerciements vont à Ali Ould Mohamed Salem O. BOUKHARY qui m'a épaulé sur cette voie de la recherche. Je veux remercier mes amis qui ont toujours répondu présents tout au long de mon parcours : Oumar Sow, Mamadou Diop, Moctar Kelly, Mohamed Kane, Elhassan Guèye ainsi qu'à leurs familles respectives, recevez ici ma plus grande gratitude pour votre soutien.

Je ne saurais finir sans parler de ceux qui m'ont le plus supporté tout au long de mon cursus universitaire, j'aimerais remercier mes parents pour vos sacrifices, mes grandes sœurs Djeba et Amicolé, et mes grands frères Mika et Harouna pour vos soutiens inconditionnels et sans failles et de m'avoir redonné la joie pendant des moments de doute. The last but not least merci à ma perle Aminata, pour ta patience et ton soutien durant cette aventure.

Table de matières

Table de matières	i
Résumé	v
Abstract	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	x
Abréviations.....	xi
Introduction.....	1
Chapitre I. Revue de littérature.....	7
I.1. État des lieux sur le paludisme	7
I.2. <i>Anopheles gambiae</i> : vecteur majeur de plasmodies humaines	8
I.3. Etapes comportementales du cycle gonotrophique	12
I.3.1 Localisation d'un hôte.....	13
I.3.1 Le comportement de piqûre.....	15
I.4. Les stratégies de lutte contre le vecteur <i>An. gambiae</i>	17
I.5. Les insecticides et modes d'action	19
I.6. Résistance aux insecticides	21
I.7. Modification de la réponse comportementale aux insecticides.....	23
Chapitre II. Réponse comportementale <i>d'Anopheles gambiae</i> aux odeurs attractives d'un hôte vertébré en présence de matériaux imprégnés d'insecticide	28
Résumé.....	29
Abstract	32
Background	33
Materials and methods	34
Ethics statement	34

Mosquitoes	35
Behavioural assay	35
Experiments	36
Behavioural indicators	37
Statistical analysis	38
Results.....	40
Environmental variables	40
Do <i>An. gambiae</i> females respond to the air flow?	40
Do <i>An. gambiae</i> females respond to an attractive odour source?	40
Is mosquito progression influenced by insecticide-treated nets?	41
Is the set-up symmetric?.....	41
Is the attractiveness of the odour source influenced by the untreated net?.....	41
Is the attractiveness of the odour source influenced by the ITN?	42
Discussion	42
Funding	46
Acknowledgement.....	46
Conflict of interest.....	46
References.....	46
Tables.....	52
Figures	54
Supporting information	56
Chapitre III. Réponse comportementale d' <i>Anopheles gambiae</i> au contact d'un matériel traité d'insecticide	57
Résumé.....	58
Abstract	62
Introduction.....	62

Results.....	63
Cost of the homozygous resistant genotype for the <i>kdr</i> locus	63
Overdominance of <i>kdr</i> mutation under PYR pressure.....	64
Discussion	66
Experimental procedures.....	70
Mosquito strains and rearing:	70
Experimental setup:	71
Statistical analysis:	72
Ethical Considerations.....	74
Acknowledgments.....	74
References.....	74
Supplementary material	82
Chapitre IV. Comportement de piqûre d' <i>Anopheles gambiae</i> après une exposition sub-létale à des insecticides pyréthrinoïdes.....	84
Résumé.....	86
Abstract	88
Introduction.....	89
Methodology.....	91
Mosquito strains and rearing procedures.....	91
Insecticide exposure	92
Behavioural assay	92
Behavioural parameters	93
Blood meal volume measurement.....	93
Statistical analysis	94
Results.....	95
Discussion	97

Ethical Considerations	100
Financial statement	100
References	100
Tables	106
Figures	107
Chapitre V : Conclusion & Perspectives	110
Modifications comportementales dues aux insecticides	111
Valeur sélective, mutation <i>kdr</i> et traits comportementaux	115
Limites méthodologiques	118
Perspectives	121
Conclusion	125
Références bibliographiques	128

Résumé

Les parasites du genre *Plasmodium* responsables du paludisme sont transmis du moustique à l'homme et de l'homme au moustique pendant la prise du repas de sang. L'utilisation massive des moustiquaires imprégnées d'insecticide pyréthrinoïdes vise à limiter la prise du repas de sang et à réduire la survie des moustiques. Dans un contexte de lutte antivectorielle généralisée, des mécanismes d'adaptations physiologiques et comportementaux ont été sélectionnés chez les populations d'Anophèles vecteurs. Les mécanismes de résistances physiologiques font l'objet d'un large effort de recherche alors que nous ne disposons que de peu de connaissances sur le comportement de recherche et de piqûre d'un homme protégé par une moustiquaire. L'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à la compréhension des interactions entre un mécanisme de résistance physiologique aux insecticides, le comportement des moustiques et les outils de lutte antivectorielle. Pour réaliser cette étude, nous avons testé l'effet de la moustiquaire imprégnée d'insecticide sur le comportement de recherche de l'hôte chez *Anopheles gambiae* en relation avec le génotype *kdr*L1014F, qui confère une résistance aux pyréthrinoïdes utilisés sur les moustiquaires imprégnées. Dans la première partie, nous avons analysé l'effet de l'insecticide pyréthrinoïde présent sur la moustiquaire sur l'attractivité de l'hôte chez *An. gambiae*. Nos résultats ont montré que les moustiques résistants étaient plus attirés par un hôte protégé par une moustiquaire traitée de perméthrine comparé une moustiquaire non traitée. Nous avons ensuite analysé la performance des trois génotypes *kdr* à atteindre un hôte protégé par une moustiquaire et leur activité comportementale au contact de la moustiquaire. Cette expérience a mis en évidence d'une part un coût adaptatif du gène *kdr* sur l'activité comportementale des moustiques résistants et d'autre part, une meilleure performance des hétérozygotes (superdominance) pour localiser une faille sur une moustiquaire traitée afin d'atteindre un hôte protégé. Enfin, nos expériences ont porté sur l'effet d'une exposition sublétales des moustiques à des insecticides pyréthrinoïdes sur le comportement de piqûre lors de la recherche d'un hôte protégé. Cette préexposition aux pyréthrinoïdes a eu un effet contrasté sur le taux de gorgement des moustiques résistants toutefois elle a réduit la durée de gorgement, de prédiurèse ainsi que le volume de repas de sang des trois génotypes. À travers l'étude de 3 séquences comportementales, nos résultats ont permis d'apporter des informations cruciales sur le comportement des anophèles vecteurs du paludisme face aux moustiquaires imprégnées et ouvre la voie à de nombreuses pistes de recherches.

Mots-clés : Anophèles, *Kdr*, Comportement, Olfaction, Insecticide, Valeur sélective

Abstract

The blood feeding behaviour is a crucial step in the reproductive cycle of female mosquitoes for egg maturation. However the widespread use of insecticide treated bed nets reduce the ability of mosquitoes to feed on human host. In this context of integrated vector control strategies, mosquitoes have evolve physiological and behavioural adaptations to scope the deleterious effect of insecticides. Despite the progress made on understanding of physiological resistance, few data exist on effects of insecticide treated nets on host seeking behaviour. The aim of my thesis was to determine whether host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* in the presence of insecticide-treated materials is modulated by the presence of the *kdr L1014F* mutation which confers resistance to pyrethroids used on treated bed nets. Firstly, our results show that the *kdr* gene modulate the host seeking behaviour in the presence of insecticide treated nettings and the fitness of *kdr*-resistant mosquitoes. Homozygous resistant mosquitoes for *kdr* gene have oriented flight to host odours in the presence of permethrin treated net compared to untreated net. The analysis of the performance of the three genotypes to pass through a hole on untreated net in the presence of a vertebrate host showed a cost of *kdr* mutation on behavioural activity of resistant mosquitoes. In addition, this work highlighted a high performance of heterozygous (overdominance) to pass through a hole treated net to reach a vertebrate host. Finally, our data reveals that a sub-lethal exposure of resistant mosquitoes to two pyrethroid treated nets has a contrasting effect on blood feeding rate. In addition, the pre-exposure of the three genotypes to pyrethroid impact the biting behaviour of susceptible and resistant mosquitoes by reducing the feeding duration, pre-diuresis duration and blood meal size. All of these results are discussed in the context of blood seeking behaviour in natural conditions. Through the study of 3 complementary behavioural sequences, our results brought new insights about the malaria vector behavior in front of pyrethroid-impregnated bed nets and highlighted complex gene-environment interactions.

Keywords: *Anopheles*, *Kdr*, Behaviour, Olfaction, Insecticide, Fitness

Liste des figures

	Pages
Chapitre I	
Figure 1.	Distribution des vecteurs de plasmodies humaines 9
Figure 2.	Cycle gonotrophique et principales étapes du cycle de vie du moustique 11
Figure 3.	Schéma du système olfactif et d'une sensille olfactive 13
Figure 4.	Séquence comportementale de recherche de l'hôte 14
Figure 5.	Prédiurèse d' <i>Anopheles gambiae</i> 17
Figure 6.	Mode d'action d'un insecticide sur un insecte sensible et résistant 21
Chapitre II	
Figure 1.	Experimental set-up. Dual-choice olfactometer (right side) connected to the treatment boxes (middle) and the wide chamber 54
Figure 2.	Upwind flight and localisation indicators for the three genotypes in relation to treatment (Mean±95% Confidence Interval). ***p<0.001, **p≤0.01, *p≤0.05, ns= not significant. 54
Figure 3.	Relative attractiveness rates. RA: number of mosquitoes found in one arm relative to the total number of mosquitoes found in both arms. (A) Experiment 2 (rabbit only). (B) Experiment 3 (rabbit + UTN or empty box). (C) Experiment 4 (Rabbit+ UTN or ITN). Asterisks show difference to 0.5, traducing a choice for one treatment rather than the other. Error bars show the 95% CI; **p≤0.01, *p≤0.05. UTN: Untreated net, ITN: Insecticide-treated net. SS: homozygote for the L1014S allele (insecticide-susceptible), RS: 55

heterozygous for the L1014F allele, RR: homozygous for L1014F allele (insecticide-resistant).

Chapitre III

- Figure 1. A- Proportions of *Anopheles* females of each *kdr* genotype successfully penetrating a 1cm hole in (i) an untreated net, (ii) a permethrin-treated Olyset Net, and (iii) a deltamethrin-treated PermaNet 2.0. B- Proportions of knocked-down (KD) females among the failed when faced with ITN (permethrin-treated Olyset Net on the left, deltamethrin-treated PermaNet 2.0 on the right), for each *kdr* genotype (untreated net is not presented since no mosquito from any strain presented the KD phenotype during those exposures). The number of mosquitoes tested for each genotype (SS, RS and RR: homozygous susceptible, heterozygous, and homozygous resistant for the *kdr* mutation, respectively) is indicated. Error bars represent the 95% binomial confidence intervals for the different proportions. Significance of the different tests is indicated (NS $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). 81
- Figure S1. Panel A. A wind tunnel to study the ability of malaria vector mosquitoes to pass through a holed net. C1: Chamber one (release chamber); C2: Chamber 2; GC: Glass cage receiving the guinea pig bait; RO: Release opening; NS: Net screens; HN: Holed net. Panel B. Photo of the experimental setup. 82
- Figure S2. Tukey's boxplots of (A) contact rates, (B) proportions of flight time, (C) flight speed, (D) proportion of time spent on the holed net, (E) proportions time spent on the tunnel walls, and (F) elapsed time before passing through the hole in *An.* 8

gambiae of the three *kdr* genotypes faced with an untreated holed net

Chapitre IV

- Figure 1. Biting behavioral assay to visualize the sequence of biting behavior on rabbit's hear. OT: Observational tunnel, TP: Transparent plastic, OZ: Observational zone, R: Rabbit RC: Restraining cage 106
- Figure 2. Proportion of *Anopheles* females of each *kdr* genotype that had a blood meal after exposure for 30 seconds to (i) untreated net (ii) permethrin-treatment Olyset® Net, and (iii) deltamethrin-treatment PermaNet 2.0. Error bars represent the 95% binomial confidence intervals of the proportions. Significance of the different tests is indicated (ns $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). 107
- Figure 3. Biting behavioural parameters of *An. gambiae* exposed to untreated, permethrin-treated and deltamethrin-treated nettings in relation to *kdr* genotypes (SS, RS, and RR) 108

Chapitre V

- Figure 1. Perception et intégration du signal chimique 120
- Figure 2. Différentes étapes de la séquence comportementale étudiée 123

Liste des tableaux

	Pages
Chapitre II	
Table 1.	Description of the experiments (UTN: untreated net, ITN: insecticide-treated net) 52
Table 2.	Number of releases performed per genotype and experiment (UTN: Untreated net, ITN: Insecticide-treated net) 52
Table 3.	Results of the generalized linear model for treatment comparisons in each genotype. We compared mosquito progress first when the rabbit was added as an odour source (vs. no odour) and then when ITN was present (vs. UTN). *** $p < 0.0001$, ** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.01$, ns: not significant. UTN: untreated net, ITN: insecticide-treated net. OR: Odds-ratio. 53
Table S1:	Effect of treatment on CO ₂ and Relative Humidity (RH) in the two arms. *** $p < 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, ns= not significant. 56
Chapitre IV	
Table 1.	Numbers of mosquito releases per genotype and treatment 105

Abréviations

<i>Ace.1^R</i>	Nom du gène codant la mutation de l'acétylcholinestérase insensible
CMs	Carbamates
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cyp	Cytochromes
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
DDT	Dichlorodiphenyl-trichloroéthane
GABA	Acide gamma-amino butyrique
GST	Glutathion-S-transférases
KCl	Chlorure de potassium
<i>Kdr</i>	Nom du gène codant la mutation du <i>Knockdown resistance</i>
MILD	Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action
NaCl	Chlorure de sodium
OBP	Odorant Binding Protein
OBET	Odour Baited Entry Trap
OCs	Organochlorés
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPs	Organophosphorés
OR	Olfactory Receptor
ORN	Olfactory Receptor Neuron
PID	Pulvérisation intradomiciliaire
PYRs	Pyréthroïdes
<i>Rdl</i>	Nom du gène codant la mutation du <i>Resistance to dieldrine</i>
RR	Génotype homozygote résistant pour l'allèle <i>kdr</i>
RS	Génotype hétérozygote résistant pour l'allèle <i>kdr</i>
SS	Génotype homozygote sensible pour l'allèle <i>kdr</i>
VGSC	Voltage-Gated Sodium Channel
WHOPES	WHO Pesticide Evaluation Scheme

Introduction

Malgré les efforts nationaux et internationaux, le paludisme reste un problème de santé publique majeur (WHO 2014). La lutte contre la maladie se heurte à différents obstacles d'ordre biologique notamment la résistance des parasites aux médicaments antipaludéens (Plowe 2009) et la résistance des moustiques vecteurs aux insecticides (Ranson *et al.* 2011). La lutte antivectorielle tient une place prépondérante dans la lutte contre le paludisme, mais le développement des mécanismes de résistance aux insecticides constitue une réelle menace pour les programmes de lutte mis en place qui s'appuient majoritairement sur les insecticides pyréthrinoïdes. Deux mécanismes ont fait et font l'objet d'une recherche soutenue : la résistance métabolique (dégradation accrue des insecticides par des enzymes surexprimées ou plus actives) et la résistance par mutation de cible (mutation non silencieuse sur le gène codant la cible physiologique de l'insecticide qui diminue l'affinité pour l'insecticide). D'autres mécanismes potentiels sont à l'inverse très peu étudiés. Il s'agit de la séquestration, l'excrétion accrue de l'insecticide, la résistance cuticulaire ou de la résistance comportementale.

Des travaux de recherche ont permis de montrer que la lutte antivectorielle pouvait entraîner une modification du comportement des vecteurs (Pates & Curtis 2005; Gatton *et al.* 2013). Dans des zones de résistance aux pyréthrinoïdes, des observations indirectes en cases pièges sur le terrain ont montré qu'il y avait une réduction du taux d'entrée dans les cases traitées par rapport aux cases non traitées et une variabilité de la réponse comportementale aux moustiquaires imprégnées d'insecticide entre des moustiques résistants et sensibles (Corbel *et al.* 2010). Les observations indirectes faites sur le terrain laissent penser qu'une partie des populations de vecteurs du paludisme pourrait détecter les insecticides appliqués tant sur les moustiquaires ainsi que les murs des habitations et adopter un comportement d'évitement. Ces modifications comportementales semblent être associées à la présence d'insecticide PYR sur les MILDs mais aussi modulées par les mécanismes de résistance.

Dans les zones d'intervention de lutte antivectorielle où les hôtes préférentiels sont protégés par une moustiquaire traitée, les populations d'*An. gambiae* développent des stratégies pour faire face à cette pression insecticide. Malgré les avancées réalisées sur la compréhension des mécanismes d'adaptation physiologique (Ranson *et al.* 2011; Corbel & N'Guessan 2013), nous disposons de peu de connaissance sur le comportement de recherche d'un hôte protégé par un MILD (Takken 2002; Sutcliffe & Yin 2014).

Dans la littérature, la question des modifications comportementales (modifications des préférences trophiques ou évitement) qu'elles soient la cause de la résistance ou la conséquence des mécanismes physiologiques tels que les mutations de cibles ou la résistance métabolique a été très peu étudiée (Lockwood *et al.* 1984). Le comportement peut être considéré comme une conséquence observable des mécanismes de résistance physiologique (Lockwood *et al.* 1984). Des études antérieures ont montré que les mutations de cible physiologique des insecticides peuvent affecter plusieurs traits comportementaux : le vol (Homyk & Sheppard 1977; Foster *et al.* 2003), la compétitivité sexuelle (Rowland 1991a; Berticat *et al.* 2002), l'évitement à la prédation (Rowland 1991b). Une revue de littérature sur la résistance aux insecticides suggère que les mutations de cible physiologique des insecticides au niveau du système nerveux central peuvent modifier le comportement des vecteurs du fait de la connexion évidente entre le comportement et le système nerveux (Rivero *et al.* 2010). Toutefois, il existe peu d'étude sur les interactions entre gènes de résistance et les modifications comportementales de type dépendant de stimulus par exemple le comportement d'évitement de l'insecticide.

Dans le contexte actuel, où la résistance aux pyréthriinoïdes est très largement répandue en Afrique (Ranson *et al.* 2011), la compréhension du rôle des gènes de résistance sur la réponse comportementale des populations anophéliennes aux MILDs est cruciale pour améliorer nos outils de lutte contre *An. gambiae* vecteur majeur de plasmodies humaines.

La mutation *kdr* se situe sur le gène codant le canal sodium voltage-dépendant. Chez les moustiques, le canal sodium voltage dépendant est impliqué dans la transduction du signal chimique des récepteurs olfactifs vers le système nerveux central (Zwiebel & Takken 2004). Une telle mutation pourrait donc rendre les moustiques moins sensibles aux signaux olfactifs donc à localiser leur hôte. En ce sens, il est nécessaire de développer une approche expérimentale phénotypique pour étudier la relation existante entre la mutation *kdr* et les modifications comportementales aux odeurs de l'hôte en présence de matériaux imprégnés de PYRs. De nombreuses questions de recherche subsistent : Est-ce que les pyréthrinoïdes repoussent les moustiques ou perturbent les signaux attractifs de l'hôte ? Est-ce que le moustique détecte et évite l'insecticide avant contact avec la moustiquaire ? Quel est l'impact des mécanismes de résistance sur la réponse comportementale des moustiques aux insecticides ? Quel est l'effet d'une exposition aux pyréthrinoïdes sur le comportement de piqûre d'*Anopheles gambiae* ? Toutes ces questions font l'objet d'un large projet nommé BeIn (pour Behaviour and Insecticide) mené par l'équipe VECOPS (Stratégies de Lutte et Prévention du Contact Homme-Vecteurs) de l'UMR 224-MiVEGEC (IRD/CNRS/Univ Montp 1 & 2) dont l'objectif général est l'étude des modifications du comportement de type stimulus dépendant et indépendant par les méthodes de lutte antivectorielle en relation avec la résistance aux insecticides, l'infection par le parasite et l'environnement.

Objectifs

Nos travaux de recherche visent à étudier les différentes étapes de la séquence comportementale allant du choix de l'hôte jusqu'à la piqûre chez *Anopheles gambiae* Giles. Plus précisément, nous nous intéresserons aux modifications de cette séquence comportementale induite par les méthodes de lutte antivectorielle et leurs interactions avec la résistance aux insecticides utilisés en santé publique.

Dans ce cadre de recherche, **l'objectif de mon travail de thèse était d'étudier les modifications du comportement chez *Anopheles gambiae* lorsque ce dernier est exposé ou non à des moustiquaires imprégnées de PYRs et l'interaction avec**

la mutation *kdr*L1014F. Les objectifs spécifiques se déclinent en trois parties complémentaires visant à étudier les étapes de la séquence comportementale d'*Anopheles gambiae* allant du choix d'un hôte en présence de support traité d'insecticides pyréthrinoïdes jusqu'à la piquêre.

1^{er} partie : Influence de la mutation *kdr*L1014F sur le comportement de recherche de l'hôte en présence de support traité d'insecticide.

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet de l'insecticide pyréthrinoïde présent sur la moustiquaire sur l'attractivité de l'hôte chez *An. gambiae*. Nous avons étudié leurs préférences entre les odeurs émanant d'un hôte en présence d'une moustiquaire imprégnée *versus* non-imprégnée afin de répondre à deux questions importantes : i) la présence d'insecticide sur la moustiquaire influence-t-elle le comportement de recherche d'un hôte ? ; ii) la mutation *kdr* modifie-t-elle le choix de l'hôte en l'absence et en présence d'insecticide ? Cette expérience consistait à analyser différentes étapes de la séquence comportementale de recherche de l'hôte des femelles d'*An gambiae* ayant un fond génétique commun mais différent par le génotype *kdr* en présence/absence d'insecticides. Nous avons développé un dispositif expérimental constitué d'un olfactomètre en Y pour mesurer différentes réponses comportementales. Parmi les étapes de la séquence comportementale, nous avons mesuré l'activation qui est la proportion de moustiques entrés dans une phase active de recherche de l'hôte en réponse à des stimuli volant de la zone de lâcher des moustiques vers une source d'odeur et le choix des moustiques pour une panache d'odeur de l'hôte en présence/absence de support traité d'insecticide dans un olfactomètre.

2^{eme} partie : Le comportement au contact avec un matériel traité d'insecticide et la capacité à trouver une faille sur un filet de moustiquaire

Après avoir abordé les premières étapes de la séquence comportementale de localisation d'un hôte protégé par une moustiquaire. Nous nous sommes intéressés au comportement au contact avec la moustiquaire traitée. En effet pour atteindre l'hôte protégé par une moustiquaire, une autre étape s'ajoute à cette séquence

comportementale, la recherche d'une ouverture dans cette barrière physico-chimique. En utilisant un système d'enregistrement vidéo, nous avons analysé le comportement d'*An. gambiae* dans un tunnel séparé en deux compartiments par un filet de moustiquaire troué. Cette approche a permis d'une part d'évaluer et de comparer la capacité des moustiques sensibles et résistants aux PYRs à trouver un trou sur une moustiquaire et d'autre part d'analyser le comportement de vol d'*An. gambiae* au contact avec un support traité d'insecticide.

3^{eme} partie : L'effet d'une préexposition aux PYRs des MILDs sur la capacité et le comportement de piqûre

La séquence comportementale de localisation d'un hôte protégé par une moustiquaire prend fin quand le moustique se pose sur l'hôte pour prendre un repas de sang. Le passage du moustique à travers la moustiquaire traitée implique un contact avec la moustiquaire avant d'y entrer et de piquer l'hôte. Ce contact avec la moustiquaire expose les moustiques à des doses d'insecticide. Malgré l'avantage conféré par la mutation *kdr* pour résister à l'effet irritant des pyréthrinoides, il est probable que cette exposition aux insecticides ait un impact sur la prise de repas de sang des moustiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la capacité de piqûre sur un hôte après une courte exposition à une MILD et analysé la séquence comportementale de piqûre en tenant compte de la mutation *kdr*. L'analyse de la séquence comportementale a conduit à l'élaboration d'un répertoire comportemental en mesurant le nombre de piqûres, le temps nécessaire à prendre un repas sanguin ainsi que le volume du repas. Cette dernière expérience a permis d'établir un profil comportemental des moustiques portant ou non la mutation *kdr* en présence/absence d'insecticide.

Ce manuscrit de thèse comprend (1) une revue de littérature permettant de rappeler le contexte dans lequel ont été conduit ces travaux, trois chapitres expérimentaux abordant chacun une étape de la séquence comportementale d'*Anopheles gambiae* : (2) l'attractivité de de hôte en présence de support traité d'insecticides pyréthrinoides ; (3) le passage à travers une moustiquaire trouée et (4) le

comportement de piqûre après exposition à une moustiquaire traitée. Les résultats de ces différentes expériences sont, pour finir, mis en perspective dans une (5) discussion générale.

Chapitre I. Revue de littérature

I.1. État des lieux sur le paludisme

Le paludisme est l'une des plus importantes parasitoses humaines et constitue jusqu'à présent un problème majeur de santé publique. Il est causé par un parasite du genre *Plasmodium* transmis de l'homme à l'homme par une piqûre infectante de moustique du genre *Anopheles*. Quatre espèces parasitaires sont responsables des infections plasmodiales humaines : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* (Mouchet 2004) et également, une cinquième espèce qui touche principalement les primates *P. knowlesi* capable d'infecter l'homme (Singh *et al.* 2004).

Le paludisme est largement répandu dans les zones intertropicales sur le continent africain, mais aussi en Amérique du Sud, en Asie et dans quelques pays de la région méditerranéenne. Selon les dernières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2013 environ 198 millions de cas et 584 000 décès étaient imputables au paludisme (WHO 2014). Cette infection touche principalement les enfants de moins de cinq ans, les nourrissons et les femmes enceintes. Cette forte mortalité palustre est causée par l'espèce *P. falciparum*, l'espèce la plus pathogène (Snow *et al.* 2005). De plus, le paludisme a des conséquences néfastes sur l'économie des pays en développement entravant la croissance économique avec 12 milliards de \$US de pertes directes par an (WHO, 2010).

Grâce aux efforts consentis ces dernières années par la communauté internationale pour mobiliser les financements consacrés à la prévention et à la lutte (WHO 2014), le taux de mortalité a été réduit d'environ 42% dans le monde et de 49% dans les régions africaines (WHO 2014).

A l'heure actuelle, la protection contre cette infection parasitaire par la vaccination reste une méthode en cours de développement. Les recherches se poursuivent pour le développement d'un vaccin efficace (Arama & Troye-Blomberg 2014). Le principal vaccin candidat de la firme GlaxoSmithKline, le RTS,S (une

protéine recombinante basée sur une chaîne polypeptidique de la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum*, et qui contient à la fois des épitopes de lymphocytes B et de lymphocytes T, fusionnés à l'antigène de surface de l'hépatite B) n'a pas encore atteint l'efficacité protectrice recherchée à l'échelle communautaire (Campo *et al.* 2014). Toutefois, des nouvelles pistes de recherche utilisant les sporozoïtes atténués (Roestenberg *et al.* 2011) à travers des méthodes de l'irradiation gamma ont montré des résultats satisfaisants et ont entraîné un regain d'espoir (Pfeil *et al.* 2014).

Dans le but d'atteindre les objectifs du millénaire pour le développement, les politiques actuelles de lutte visent à réduire la mortalité dans les groupes les plus vulnérables. Pour ce faire, les recommandations de l'OMS reposent essentiellement sur deux méthodes : l'une curative après un diagnostic précoce par l'administration de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, et l'autre préventive par la mise en place d'opération de la lutte antivectorielle. Malheureusement la lutte contre la maladie se heurte à différents obstacles d'ordre biologique notamment la résistance des parasites aux médicaments antipaludéens (Plowe 2009) et la résistance des moustiques vecteurs aux insecticides menaçant l'efficacité des programmes de lutte contre le paludisme (Rivero *et al.* 2010; Ranson *et al.* 2011).

La présente thèse s'intéresse à *Anopheles gambiae*, vecteur majeur de plasmodies humaines en Afrique subsaharienne. Nous aborderons ici quelques aspects de sa biologie, son écologie, son comportement et sa physiologie dans un contexte de lutte intégrée contre le paludisme.

I.2. *Anopheles gambiae* : vecteur majeur de plasmodies humaines

Sur 537 espèces d'anophèles répandues dans le monde, une cinquantaine sont des vecteurs de *Plasmodium sp.* dont une vingtaine sont à l'origine de la majorité des cas de paludisme (Harbach 2013). Les autres espèces ne participent pas à la transmission parce qu'elles ne sont pas "compétentes" pour permettre le développement du parasite (Cohuet *et al.* 2010).

En Afrique de l'Ouest, les vecteurs majeurs de plasmodies humaines sont les membres du complexe *Anopheles gambiae* Giles *sensu lato* (ci-après *Anopheles gambiae s.l.*), ou du groupe *Anopheles funestus* Giles avec des aires de répartition très importantes (Figure 1).

Le complexe *Anopheles gambiae s.l.* est constitué d'espèces jumelles (morphologiquement très semblables) (Coluzzi *et al.* 2002; Gentile *et al.* 2002) qui diffèrent par leur comportement biologique et leur aptitude vectorielle (White 1974): *An. gambiae s.s.* avec deux formes moléculaires, S et M (ci-après *An. gambiae* Giles et *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson **sp.n.** respectivement d'après la nouvelle nomenclature de Coetzee et collaborateurs (Coetzee *et al.* 2013)), *An. arabiensis* Patton, *An. quadriannulatus* Theobald, *An. Amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee **sp.n.**, *An. melas* Theobald, *An. merus* Dönitz, *An. bwambae* White.

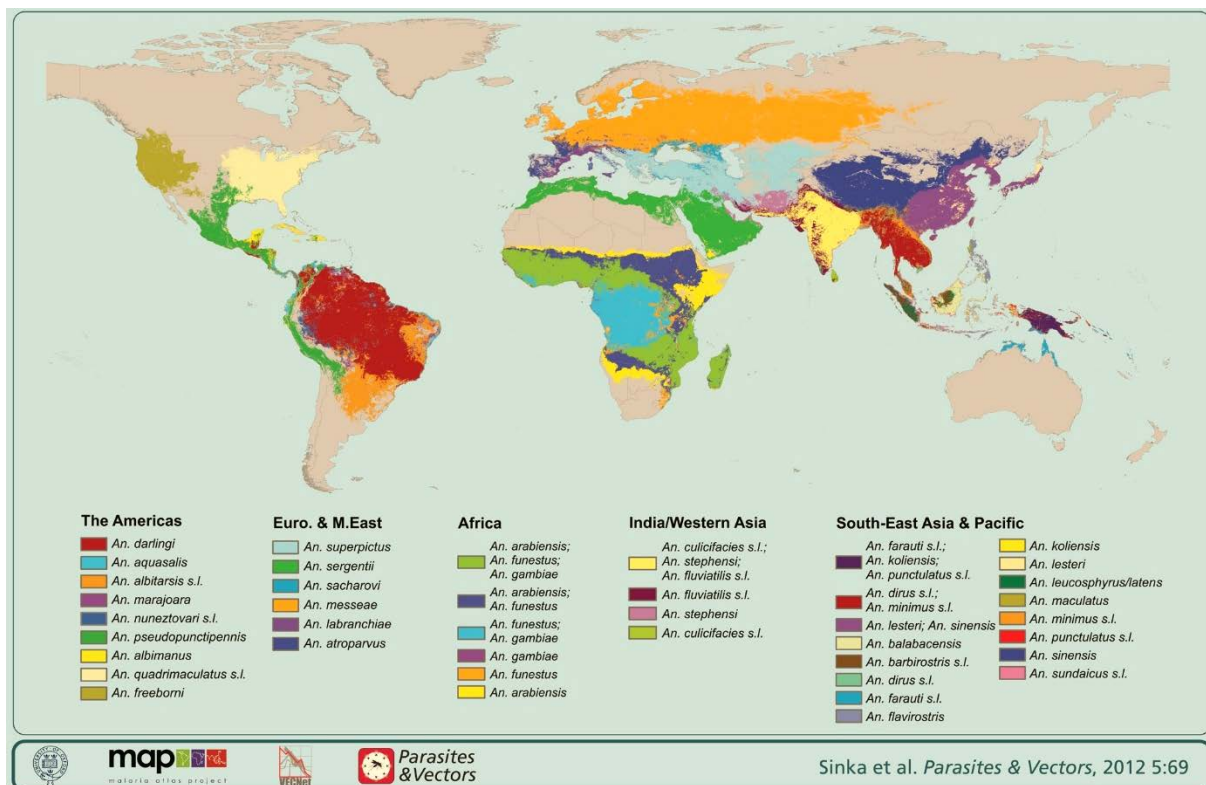


Figure 1. Distribution des vecteurs de plasmodies humaines

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'espèce vectrice *An. gambiae* Giles, dont nous aborderons quelques aspects de son écologie et comportement.

Les femelles *An. gambiae*, l'espèce prédominante dans les régions humides de l'Afrique tropicale (Lindsay *et al.* 1998), pondent leurs œufs à la surface de l'eau. Les larves d'*An. gambiae* se développent dans des réservoirs, et collections d'eau ensoleillées, peu profondes tels que les flaques d'eau, mare temporaire, bas-fond. Ces gîtes larvaires sont des collections d'eau douce, peu polluées et peu agitées (Carnevale *et al.* 2009). Après quatre stades larvaires, la larve donnera une nymphe d'où émergera l'individu adulte.

Dans la nature, les femelles adultes d'*An. gambiae* sont étroitement liées à l'homme. L'étude de leur préférence trophique montre qu'elles sont très anthropophiles et endophages, c'est-à-dire piquent préférentiellement les hommes à l'intérieur des habitations (White 1974; Takken & Verhulst 2013). Après un repas de sang, la digestion et la maturation s'effectuent à l'intérieur des habitations (endophiles) avant d'entrer dans la phase d'oviposition (Figure 2) (Clements 1992; Carnevale *et al.* 2009).

Seules les femelles d'anophèles sont hématophages. Les mâles se nourrissent uniquement de nectar des fleurs. C'est à l'occasion du repas de sang que les femelles ingèrent des gamétocytes présents dans le sang de l'hôte. Le cycle sexué ou sporogonie du parasite se déroule chez le moustique. Les gamétocytes mâles et femelles ingérés lors de la prise d'un repas de sang vont passer par plusieurs stades pour devenir des sporozoïtes. Les macrogamètes sont fécondés par des microgamètes dans l'intestin du moustique et forment à cet endroit des zygotes. Ceux-ci deviennent mobiles et prennent une forme allongée, s'appelant alors des ookinètes, et pénètrent dans la paroi intestinale du moustique où ils se transforment en oocytes. La croissance et la division de chaque oocyte produisent des milliers de formes haploïdes actives appelées sporozoïtes. Les sporozoïtes libérés dans l'hémolymphe migrent vers les glandes salivaires (Wery 1967). La compétence vectorielle des anophèles est définie comme la permissivité intrinsèque d'un vecteur à s'infecter

après ingestion d'un repas de sang infecté, puis la replication et la transmission du pathogène à un autre vertébré par une piqûre infectante, qui mesure le niveau de coadaptation entre le *plasmodium* et le vecteur (Cohuet *et al.* 2010) et dépend des facteurs génétiques (Bongfen *et al.* 2009) et environnementaux comme la température, la nutrition et la flore microbienne intestinale (Lefèvre *et al.* 2013). Le rôle vectoriel d'une espèce d'anophèle dans la transmission palustre est mesuré par

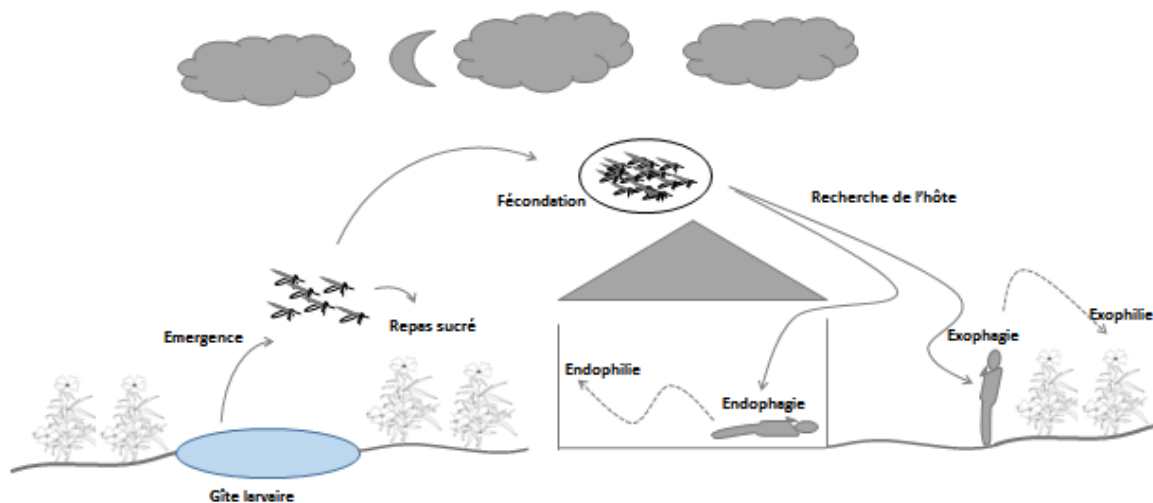


Figure 2. Cycle gontrophique et principales étapes du cycle de vie du moustique (d'après Carnevale *et al.* 2009)

un autre index, la capacité vectorielle de Garrett-Jones (1964) qui est définie comme le nombre d'infections secondaires par unité de temps qu'une personne infectante peut générer par l'intermédiaire d'une population d'espèces vectrices (Carnevale *et al.* 2009).

C'est durant le cycle gontrophique que le moustique femelle peut s'infecter par les parasites. Le cycle gontrophique est défini comme une séquence comportementale contrôlée par des états physiologiques du moustique qui sépare deux ovipositions. Il est subdivisé en trois phases en se référant à (Beklemishev & Detinova 1940) cité dans (Carnevale *et al.* 2009) : (i) le comportement de recherche de l'hôte pour la femelle à jeun (ii) l'ingestion et la digestion du repas de sang accompagnée de la maturation des ovaires (iii) la recherche d'un site de ponte pour y

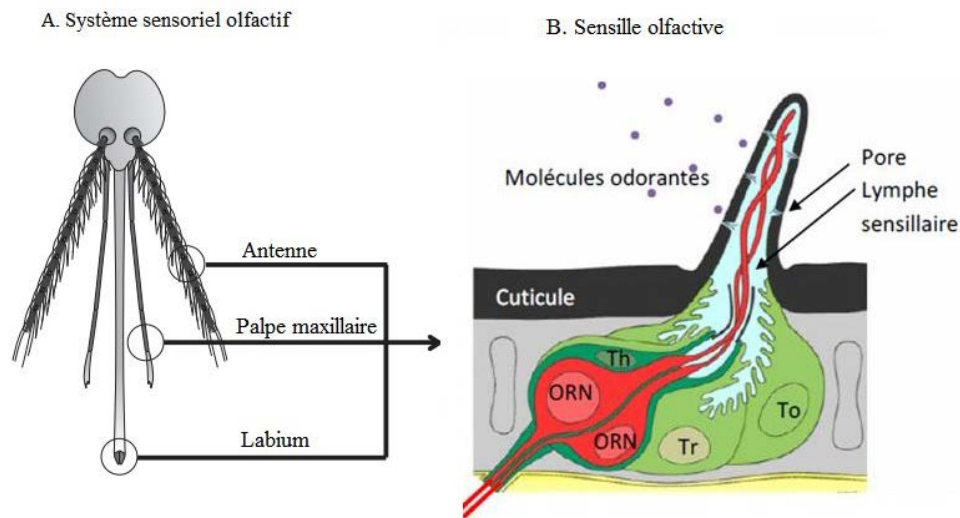
déposer des œufs. La durée du cycle gonotrophique d'*An. gambiae* est d'environ 2 à 4 jours (Gillies & Wilkes 1965; Mutero & Birley 1987; Klowden & Briegel 1994). Après un repas de sang, les moustiques femelles passent environ 48 heures pour convertir environ 20% de celui-ci en constituants de l'œuf (Briegel 1990), en utilisant l'autre fraction pour soutenir les activités biosynthétiques intenses durant cette période et déféquer le reste. Les femelles d'*An. gambiae* survivent à plus de trois ou quatre cycles gonotrophique, seulement un petit nombre survivent au-delà de dix cycles (Carnevale *et al.* 2009). Cette longévité est suffisante pour permettre le développement du *Plasmodium sp.* dans son organisme.

I.3. Etapes comportementales du cycle gonotrophique

Après avoir abordé le cycle gonotrophique dans sa globalité, nous allons nous focaliser sur deux séquences comportementales du vecteur *An. gambiae*, la recherche de l'hôte du vecteur et la piqure qui sont au cœur de cette thèse.

L'olfaction tient un rôle primordial dans le cycle de vie du moustique pour la survie et la capacité à se reproduire. Les moustiques utilisent leur sens olfactif pour trouver une source d'alimentation (nectar des plantes) (Foster 1995), un repas sang et un site d'oviposition (Takken & Knols 1999). Les moustiques disposent d'un système sensoriel très développé pour leur permettre de reconnaître et discriminer des substances olfactives (Qiu & van Loon 2010). Les signaux chimiques sont détectés par les antennes et les palpes maxillaires qui sont recouverts de sensilles (structures cuticulaires) renfermant des cellules sensorielles (Olfactory Receptor Neurons, ORNs) exprimant à leur surface des récepteurs olfactifs (Olfactory Receptors, ORs). Lorsqu'une molécule volatile arrive au niveau de l'antenne, elle doit d'abord traverser généralement la cuticule des sensilles *via* des pores. Une fois passée au travers de ces pores, la molécule se retrouve dans un compartiment rempli de lymphe et va être transportée par des protéines liant les odeurs (Odorant Binding Proteins ou OBPs) vers les récepteurs olfactifs spécifiques situés sur la membrane des neurones (Figure 3). Une fois que la molécule odorante est fixée sur le récepteur olfactif transmembranaire, une cascade de transduction va engendrer l'émission de

potentiels d'actions qui parcourront le nerf antennaire en direction du lobe antennaire (Zwiebel & Takken 2004; Bohbot *et al.* 2010).



ORN : Neurone Récepteur Olfactif, Th : Cellule thécogène, Tr : Cellule trichogène, To : Cellule thormogène

Figure 3. Schéma du système olfactif et d'une sensille olfactive d'après Bohbot *et al.* (2010) et Poivet (2012)

I.3.1 Localisation d'un hôte

La localisation de l'hôte vertébré par *An. gambiae* n'est pas le résultat d'évènement isolé «stimulus-réponse» mais un processus comportemental dans lequel chaque phase est liée à l'évènement qui l'a précédé, et qui est modulé par des facteurs endogènes et exogènes (Lehane 2005). Ce processus comportemental a été bien étudié chez plusieurs espèces de moustiques et peut être divisé en 3 grandes phases selon les auteurs (Lehane 2005; Clements 1999; Sutcliffe 1987) (Figure 4):

Phase de recherche appétitive (« *ranging behaviour* »): Cette étape peut être modulée par plusieurs facteurs endogènes et exogènes. Le rythme circadien est un facteur majeur qui régule le rythme journalier et l'organisation temporelle des différents processus biochimiques, physiologiques et comportementaux au sein d'un individu. Pour le vecteur *An. gambiae*, des études montrent que le rythme circadien contrôle son comportement (Jones *et al.* 1974; Jones & Gubbins 1978). D'autres facteurs comme le statut nutritionnel et d'insémination sont aussi des états

physiologiques qui modulent l'entrée dans une phase de recherche de l'hôte (Jones & Gubbins 1977; Rowland 1989). Par ailleurs, d'autres stimuli comme la photopériode et l'intensité lumineuse sont des facteurs déclencheurs de l'activité comportementale des moustiques nocturnes (Jones *et al.* 1972; Wilton & Fay 1972; Beck 2012) ainsi que des facteurs environnementaux comme la température, la vitesse et la turbulence du vent (Service 1980; Gibson & Torr 1999).

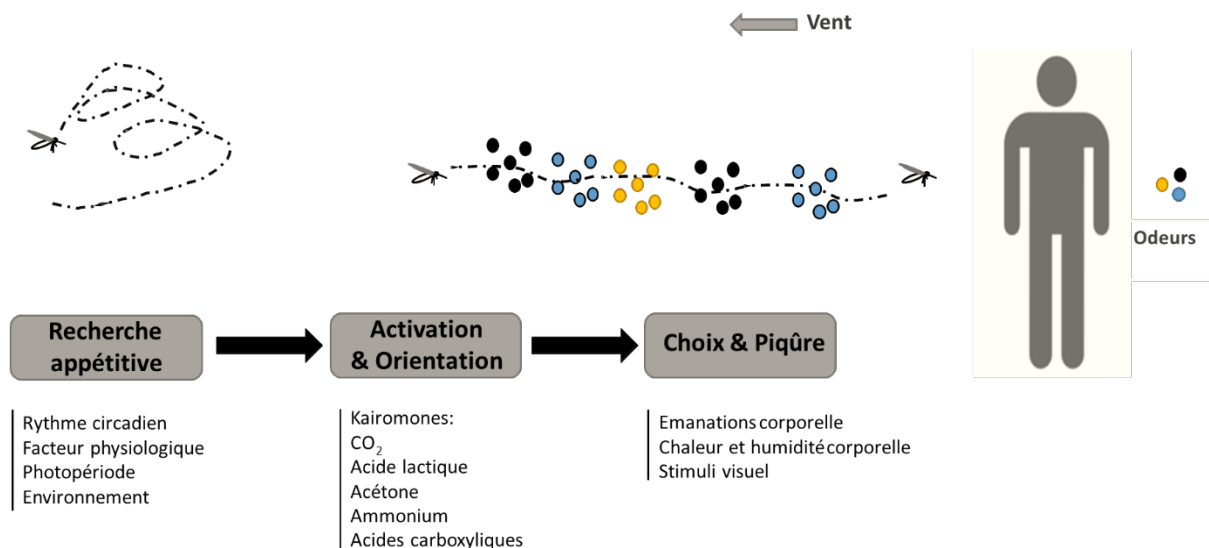


Figure 4. Séquence comportementale de recherche de l'hôte

Pendant cette phase, les insectes utilisent deux stratégies différentes : rester immobiles jusqu'à ce que des signaux olfactifs de l'hôte deviennent perceptibles dans leur environnement (par exemple le moustique *Eretmapodites chrysogaster* Graham (Clements 1999) et ce qui pourrait être le cas d'*An gambiae s.l* (Webster *et al.* 2015)), ou initier des vols non-orientés en augmentant la probabilité d'entrer en contact avec des stimuli émanant de l'hôte. Le comportement de vol non-orienté est généralement induit par un flux d'air et non par un stimulus de type olfactif (Clements 1999).

Activation & Orientation : cette étape commence lorsque l'insecte entre en contact avec un signal activateur de l'hôte (activation). Elle se traduit par un changement de trajectoire de vol pour s'orienter vers l'hôte (orientation). La recherche en écologie chimique des moustiques vecteurs a permis d'identifier plusieurs composés chimiques impliqués dans la phase d'activation et d'orientation.

Le CO₂ qui est expiré par les vertébrés, contribue partiellement à l'activation et à l'orientation de plusieurs espèces de moustiques à une dizaine de mètres de la source d'odeur (Costantini *et al.* 1996; Mboera & Takken 1997). L'acétone est considérée comme une molécule à effet synergique avec le CO₂ qui augmente la réponse d'activation d'*An. gambiae* (Takken *et al.* 1997). D'autres kairomones comme l'ammonium, l'acide lactique et les acides carboxyliques sont des molécules attractives et constituent des stimuli d'orientation pour *An. gambiae* (Smallegange *et al.* 2005).

Les moustiques actifs volent en remontant un flux d'air. Cette direction de vol dépend de leur vitesse de vol ainsi que la vitesse et la direction du vent. Les insectes utilisent en plus des stimuli olfactifs, des mécanismes anémotactiques (déplacement dans le sens opposé au courant d'air en l'absence de tout stimulus : anémotactisme positif) et optomoteurs (reflexe visuel de stabilisation en réponse aux mouvements d'objets de l'environnement) pour s'orienter vers son hôte à longue distance (Cardé & Gibson 2010).

Phase d'attraction et de choix du site de piqûre : cette étape est l'approche à courte distance où le moustique choisira entre plusieurs hôtes disponibles le cas échéant et choisira la zone du corps de l'hôte où il se posera pour piquer. Durant cette dernière étape, les facteurs comme la vision, la chaleur et l'humidité corporelle deviennent d'importants stimuli. Cette ultime étape se termine par une phase de sondage mettant en jeu des stimuli tactiles (par exemple, la composition de la flore microbienne de la peau) (Verhulst *et al.* 2011) qui amène l'insecte à prendre son repas sanguin.

I.3.1 Le comportement de piqûre

La prise de repas de sang suit une séquence comportementale et joue un rôle important dans la dynamique de transmission palustre. La piqûre se produit peu de temps après que le moustique ait atterri sur la peau de l'hôte. Le comportement de piqûre a été étudié en détail pour les insectes hématophages et peut être divisé en plusieurs étapes (Clements 1992; Robert & Brey 1998; Lehane 2005) :

- phase exploratoire («*pre-probing*») qui correspond au temps mis pour trouver une zone de piqûre sur l'hôte avant l'introduction du proboscis à travers la peau
- phase de piqûre («*probing*») est le temps nécessaire pour introduire le proboscis dans la peau par des mouvements répétés jusqu'à atteindre un vaisseau sanguin
- phase de gorgement («*feeding*») est une phase ingestion du repas du sang qui débutent avec l'aspiration du sang dans le stylet, suivi d'un passage du sang dans l'intestin, cette phase prend fin au moment où le proboscis est retiré de la zone de piqûre
- phase de prédiurèse («*prediuresis*») correspond à l'excrétion d'un fluide rectal rouge vif pendant la prise du repas de sang jusqu'à retrait du proboscis
- phase de la diurèse («*diuresis*») qui débute après la fin du repas de sang et correspond à l'excrétion des déchets métaboliques (Nijhout & Carrow 1978; Williams *et al.* 1983; Van Handel & Klowden 1996).

Le sang des mammifères contient une grande quantité de NaCl, KCl et de l'eau qui affectent le comportement de vol du moustique. Cette quantité de sang peut perturber l'homéostasie de l'hémolymphe. La régulation osmotique et ionique pendant la prise du repas de sang chez le moustique se déroule pendant la prédiurèse et la diurèse (Beyenbach & Piermarini 2009). Certains moustiques femelles déclenchent un mécanisme intestinal pour excréter l'excédent de sel (NaCl) et d'eau (Briegel & Rezzonico 1985) et réguler le choc thermique (thermorégulation) (Lahondère & Lazzari 2012) durant la phase de prédiurèse (Figure 5).



Figure 5. Prédiurèse d'*Anopheles gambiae*

Une seconde phase d'excrétion débute à la fin du repas de sang, la diurèse qui est contrôlée par les tubes Malpighi (Nijhout & Carrow 1978). Durant cette phase, on observe une excrétion de l'acide urique, l'urée et l'ammonium qui prend fin environ 30 h après l'ingestion de sang. Elle est suivie par la défécation qui dure environ 24 h. Cette dernière étape est caractérisée par l'excrétion de l'hématine (produit de digestion de l'hémoglobine) et des enzymes protéolytiques (Briegel & Lea 1975). La défécation peut être observée visuellement par les points noirs des fèces (Van Handel & Klowlon 1996). Une fois que l'hématine est complètement excrétée, le tractus intestinal est vidé des produits de dégradation du repas de sang et l'oviposition devient possible.

I.4. Les stratégies de lutte contre le vecteur *An. gambiae*

Les stratégies de lutte contre le paludisme visent différents stades du cycle de vie du moustique (stade larvaire aquatique, stade adulte). Ces méthodes de lutte visent à réduire la transmission par une réduction de la densité des vecteurs, de leur longévité ou du contact homme-vecteur.

La lutte anti-larvaire

Cette méthode de lutte vise à réduire la densité des stades larvaires donc la production d'adultes par des traitements insecticides, mécaniques (Walker & Lynch 2007) ou biologiques (poissons prédateurs) (Howard *et al.* 2007) des gîtes

larvaires. Toutefois, la méthode larvicide reste difficile à appliquer dans les zones endémiques du paludisme du fait de la distribution et la dynamique des gîtes larvaires d'*An. gambiae* et de son coût économique. Elle est uniquement recommandée par l'OMS en tant que mesure complémentaire à la lutte antivectorielle dans les zones où les gîtes larvaires sont peu nombreux, faciles à localiser, cartographier et à traiter (WHO 2013b).

La lutte anti-imagos

La lutte contre les vecteurs adultes est une composante essentielle dans la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme (WHO 2008). Cette méthode vise l'élimination des moustiques adultes (imago) par la pulvérisation intradomiciliaire (PID) d'insecticide et les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD). L'efficacité de ces deux méthodes repose sur les préférences trophiques des vecteurs majeurs qui sont considérés comme anthropophiles et endophiles.

L'outil le plus utilisé en lutte antivectorielle est la MILD développée dans l'objectif de réduire le contact homme-vecteur en agissant comme une barrière physico-chimique entre les femelles d'*An. gambiae* et l'homme et de tuer les moustiques qui viennent à son contact (Darriet *et al.* 1984; Darriet 1991). Ces deux caractéristiques sont essentielles pour que cet outil lorsqu'il est utilisé avec une large couverture confère une protection communautaire significative induisant une baisse globale de la transmission (Lengeler *et al.* 2004; Darriet 2007). L'un des objectifs du partenariat Roll Back Malaria dans son plan stratégique mondial est qu'une couverture universelle supérieure à 80% soit maintenue pour l'ensemble des populations à risque pour une meilleure efficacité de la protection communautaire (RBM 2011).

La PID consiste à pulvériser une dose efficace d'insecticide sur les murs à l'intérieur des habitations et vise à réduire la densité et la longévité des moustiques endophiles. Le choix de cette méthode est fait en fonction de l'efficacité résiduelle de l'insecticide, de son coût, de son innocuité et du type de surface à pulvériser ainsi que des dernières données sur la résistance aux insecticides (WHO 2013a). Toutefois, les

programmes de PID sont couteux et nécessitent une logistique importante (Walker 2000) ce qui les rend difficiles à étendre à l'échelle de pays entiers.

I.5. Les insecticides et modes d'action

Dans cette section, nous allons aborder les insecticides actuellement autorisés par l'OMS pour la lutte antivectorielle ainsi que leur mode d'action. Leur utilisation en santé publique repose sur leur mode d'action, leur niveau de toxicité, et leur innocuité pour l'homme. Les insecticides recommandés par le département de l'OMS en charge de l'évaluation des pesticides (WHOPES) appartiennent à quatre familles d'insecticides neurotoxiques (Enayati & Hemingway 2010): les pyréthriinoïdes (PYRs) utilisés en MILDs et en PID, les organophosphorés (OPs), les organochlorés (OCs), et les carbamates (CMs) utilisés en PID (WHO 2001).

Les organochlorés (OCs)

Les OCs furent la première famille d'insecticide utilisée en pulvérisation intradomiciliaire avec le dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT) dans les années 50 (Bruce-Chwatt 1984). Les OCs avaient montré une bonne rémanence et toxicité contre les vecteurs (Smith & Webley 1969), cependant ils ont été abandonnés à cause de leurs effets néfastes sur l'environnement (Bevenue 1976; Rogan & Chen 2005). Le DDT est un insecticide neurotoxique qui altèrent la transmission nerveuse en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (Davis & Wedemeyer 1971; Coats 1990). D'autres OCs (finopril et cyclodiène) agissent sur le fonctionnement des récepteurs de l'acide gamma-amino butyrique (GABA) (Zhao *et al.* 2003).

Les Carbamates (CMs)

Les CMs sont des insecticides utilisés en pulvérisation intradomiciliaire tels que le bendiocarbe, et le propoxur (Coosemans & Carnevale 1995; Chavasse & Yap 1997). Ils agissent sur les synapses utilisant un important neurotransmetteur commun aux insectes et aux vertébrés, l'acétylcholine qui est essentielle pour la communication nerveuse. Après le passage d'un influx nerveux entre deux neurones, l'acétylcholine est dégradée par une enzyme, l'acétylcholinestérase. Les CMs bloquent cette enzyme et perturbent le fonctionnement propre des neurones (Casida 1963; Fulton &

Key 2001). Cette famille d'insecticide est appelée inhibiteur d'acétylcholinestérase. Il en résulte une accumulation de l'acétylcholine dans la fente synaptique qui se traduit chez l'insecte par une paralysie suivie d'une mort.

Les organophosphorés (OPs)

Les insecticides OPs sont des dérivés de l'acide phosphorique. Ils sont très utilisés en lutte anti-larvaire et en PID (Coosemans & Carnevale 1995; Sk & Kv 2004) notamment le malathion, le fenitrothion et le pirimiphos-méthyl dont certaines formulations sont recommandées par l'OMS. Ils ont le même mécanisme d'action que les CMs. L'action toxique prédominante des esters organophosphorés est l'inhibition sélective de l'acétylcholinestérase par phosphorylation de son site actif avec, comme conséquence, une accumulation d'acétylcholine synaptique qui entraîne une tétanie et la mort de l'insecte (Casida & Durkin 2013).

Les pyréthrinoïdes (PYRs)

Actuellement, les PYRs sont la seule famille d'insecticides recommandée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires compte tenu de leur efficacité à faible dose, leur effet irritant sur les moustiques et leur innocuité pour les mammifères (Zaim *et al.* 2000; WHO 2012).

Les PYRs et le DDT ont le même site d'action et agissent sur l'activité électrique du système nerveux central et périphérique des insectes en interagissant avec le canal sodium voltage dépendant (VGSC «Voltage-Gated Sodium Channel») (Wakeling *et al.* 2012). Ils ralentissent la fermeture des canaux sodiques qui s'ouvrent pendant la dépolarisation, pour que la propagation du signal persiste après que la membrane soit repolarisée (Vijverberg *et al.* 1982). Cela se traduit au niveau de l'insecte par un effet de choc ou une tétanie appelé « *knockdown* ».

Les PYRs sont des dérivés synthétiques des pyréthrines qui se divisent en deux groupes en fonction de leur structure chimique : (i) les PYRs de type I non α -cyanés (perméthrine), (ii) les PYRs de type II α -cyanés (deltaméthrine, lambda-cyhalothrine).

I.6. Résistance aux insecticides

Depuis l'introduction des insecticides synthétiques dans les années 1950, il y a eu sélection de mécanismes d'adaptation chez les insectes qui leur permettent survivre aux traitements insecticides (Georghiou 1972). Pour qu'un insecticide soit efficace, l'insecte doit entrer en contact avec l'insecticide et la molécule active doit pénétrer dans le corps de l'insecte, être transportée jusqu'à sa cible et interagir avec celle-ci (Figure 6a). Tout mécanisme modifiant cette séquence d'événements peut conduire à une résistance (figure 6 b). En d'autres termes, la résistance peut être définie comme tout mécanisme permettant à un individu de survivre à des doses de substances toxiques létales pour la majorité des individus composant une population normale de la même espèce. Un mécanisme de résistance est héritable et soumis à la sélection darwinienne.

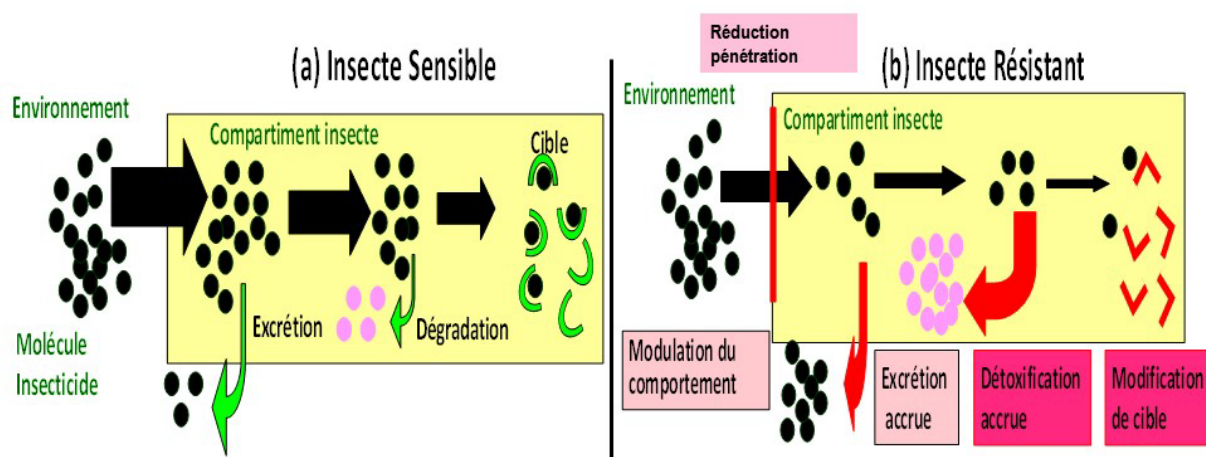


Figure 6. Mode d'action d'un insecticide sur un insecte sensible et résistant

Plusieurs types de mécanismes de résistance aux insecticides ont été identifiés. Deux principaux mécanismes ont fait l'objet d'une recherche soutenue dans la résistance aux insecticides (Hemingway *et al.* 2004; Ranson *et al.* 2011) : (i) la mutation de cible qui réduit ou supprime l'effet délétère des molécules chimiques en réduisant leur affinité avec la cible. (ii) la résistance métabolique qui est due à une surexpression des enzymes de détoxification ou des mutations de leur site catalytique

(pour dégrader l'insecticide avant que celui-ci ne se fixe sur sa cible). Deux autres mécanismes ont été identifiés comme pouvant conduire à une résistance aux insecticides, mais restent encore trop peu étudiés chez les vecteurs hématophages. Il s'agit de la résistance comportementale qui tend à limiter le contact avec les surfaces traitées d'insecticides de telle sorte qu'il ne soit pas létal (Muirhead-Thomson 1960; Sparks *et al.* 1989) et la résistance cuticulaire qui est une modification de la cuticule pour diminuer la pénétration ou l'absorption de l'insecticide (Stone & Brown 1969; Apperson & Georghiou 1975; Wood *et al.* 2010).

La résistance métabolique : l'analyse des bases moléculaires de la résistance métabolique a permis d'identifier les 3 classes d'enzymes impliquées dans la détoxification des différentes familles insecticides utilisées en lutte antivectorielle (Hemingway & Ranson 2000; Hemingway *et al.* 2004; Ranson & Hemingway 2005). (i) Les carboxylesterases qui sont plus impliquées dans la résistance aux OPs et CMs ainsi qu'aux PYR. (ii) Les glutathion-S-transférases (GST) qui sont impliquées dans la résistance aux OPs et au DDT (Hemingway 2000; Ranson *et al.* 2001; Enayati *et al.* 2005). Ils peuvent jouer un rôle important dans la résistance aux PYRs par une détoxification des produits de la peroxydation des lipides induites par les PYR (Kostaropoulos *et al.* 2001; Vontas *et al.* 2001). (iii) Les mono-oxygénases à cytochromes P450 (*Cyp*) qui sont principalement impliquées dans la détoxification des PYRs mais jouent aussi un rôle dans la résistance aux CMs et OPs. Une analyse génomique d'*An. gambiae* a permis d'identifier plus de 100 gènes de *Cyp* P450 et que la résistance aux pyréthriinoïdes était en partie associée à une surexpression des gènes *Cyp* appartenant généralement à la famille *Cyp6* (Djouaka *et al.* 2008; Müller *et al.* 2008).

Modification de la cible physiologique de l'insecticide : Les principales mutations de cible les plus répandues sont les mutations *kdr* (*Knockdown resistance*) affectant le gène codant le canal sodium voltage dépendant exprimé au niveau de membranes neuronales qui confère une résistance croisée aux DDT et pyréthriinoïdes (Martinez-Torres *et al.* 1998; Chandre *et al.* 1999); et la mutation *Ace.1^R* du gène codant l'enzyme acétylcholinestérase qui confère une résistance croisée aux

insecticides OPs et CMs (Weill *et al.* 2002, 2004). Une autre mutation, la mutation *Rdl* « *resistance to dieldrin* » du gène codant le canal chlorure GABA-dépendant confère une résistance aux Cyclodiènes et fipronil (Thompson *et al.* 1993; Zhao *et al.* 2003; Du *et al.* 2005).

La mutation *kdr* : un mécanisme de résistance aux insecticides PYRs

Dans cette thèse, nous nous intéressons à la mutation de cible physiologique des PYRs, la mutation *kdr*. Les insecticides PYRs ont comme cible physiologique le système nerveux central et périphérique de l'insecte en perturbant le fonctionnement normal des canaux sodiques. L'effet *knockdown* est défini comme une perte de coordination et une paralysie rapide suite à l'exposition aux PYRs. Dans la littérature, la résistance à l'effet « *knockdown* » dans plusieurs espèces d'insectes a été associée à une mutation sur le gène codant le canal sodium voltage dépendant (Dong 2007). La mutation *kdr* a été identifiée sur une lignée d'*An. gambiae* résistante aux PYRs. Le locus *kdr* se situe dans le domaine IIS4-IIS6 du gène codant le canal sodium voltage-dépendant (Martinez-Torres *et al.* 1998). En Afrique de l'Ouest, la mutation *kdr* est due à une substitution non synonyme de la leucine par la phénylalanine en position 1014 du gène associé à la résistance aux PYRs. Elle est notée ***kdr* L1014F**. Une autre mutation décrite en Afrique de l'Est, une substitution de la leucine par la serine à la même position (L1014S) a été initialement détectée dans une souche résistante à la perméthrine au Kenya (Ranson *et al.* 2000). Cependant, ces deux mutations se dispersent géographiquement (Pinto *et al.* 2007). Les mutations L1014F et L1014S ont été détectées simultanément chez *An. gambiae* en Afrique de l'Est en Ouganda (Verhaeghen *et al.* 2006) alors que la mutation L1014S a été retrouvée en Afrique Centrale dans des pays comme le Gabon (Pinto *et al.* 2006) et le Cameroun (Etang *et al.* 2006) ainsi qu'en Afrique de l'Ouest au Bénin (Djègbè *et al.* 2011).

I.7. Modification de la réponse comportementale aux insecticides

La résistance comportementale des insectes aux insecticides reste peu documentée, mais elle peut être définie comme une modification du comportement des insectes qui permet d'éviter un contact avec une dose létale d'insecticide. Deux

types de résistance comportementale ont été identifiés : stimulus-indépendant et stimulus-dépendant (Lockwood *et al.* 1984). Le comportement de type stimulus-indépendant ne nécessite pas une stimulation sensorielle pour produire une réponse comportementale. Alors que le comportement de type stimulus-dépendant est le résultat soit de l'irritation qui est une stimulation sensorielle de l'insecte par contact direct poussant l'insecte à quitter immédiatement l'environnement toxique, soit de la répulsion qui est une stimulation sensorielle sans contact tarsal avec la substance toxique afin de produire un évitement (Roberts *et al.* 1997; Grieco *et al.* 2007).

Modification comportementale de type indépendant du stimulus

Les populations anophéliennes s'adaptent aux environnements soumis à des pressions insecticides en modifiant leurs préférences trophiques, comportementales et rythme circadien (Pates & Curtis 2005; Gatton *et al.* 2013).

Récemment, l'utilisation massive des MILDs a été associée une modification du comportement de piqûre chez *An gambiae* qui est devenu plus exophage au Bénin (Corbel *et al.* 2012) ou dont le pic d'agressivité s'est décalé plutôt dans la soirée au Sénégal (Trape *et al.* 2011). Les mêmes modifications ont été observées sur le comportement d'*An. funestus* dans des villages traités massivement par des MILDs en Tanzanie (Russell *et al.* 2011). Plus récemment, d'autres études similaires en Afrique de l'Ouest ont montré que, suite à l'utilisation massive de MILDs, le pic d'agressivité d'*An. funestus* a été décalé tant dans l'espace que dans le temps. En effet, trois ans après distribution universelle de MILDs dans des villages du sud Bénin, *An. funestus* pique plus fréquemment à l'extérieur des habitations et très tôt le matin aux heures où les habitants sortent de sous leurs moustiquaires (Moiroux *et al.* 2012 b). Enfin ces modifications peuvent aussi être modulées par les gènes de résistance comme la mutation *kdr*. Au Sénégal après l'introduction des MILDs, les moustiques sensibles sont devenus plus exophages et moins anthropophiles tandis que le comportement des moustiques résistants n'a pas été pas modifié par cette pression insecticide (Ndiath *et al.* 2014)

Dans un contexte de lutte antivectorielle, où les hommes sont inaccessibles à cause de l'utilisation des MILDs, les moustiques vecteurs peuvent aussi changer d'hôte préférentiel. Une étude menée au Burkina Faso a montré une plasticité phénotypique du comportement alimentaire chez *An. gambiae* dans une zone où les hommes sont inaccessibles à cause de l'utilisation des MILDs (Lefevre *et al.* 2009). Une analyse de leur préférence trophique par piège de capture à appât d'odeur OBET (Odour Baited Entry Trap) montre un taux élevé d'anthrophilie (88%) mais une analyse du repas de sang des moustiques collectés dans cette zone montre que 40% des repas de sang étaient d'origine animale (bovins) (Lefevre *et al.* 2009). De même, une étude rétrospective au Kenya, montre qu'*An. gambiae* et *An. funestus* ont changé d'hôte préférentiel de l'homme vers l'animal pour se nourrir (Mwangangi *et al.* 2013). Ces modifications comportementales peuvent avoir des bases endogènes (Prasad 1985; Brown *et al.* 1994; Rund *et al.* 2013) mais aussi être associées à des facteurs environnementaux (température, utilisation des moustiquaires, comportement des hommes) (Gibson & Torr 1999; Sattenspiel 2000; Geissbühler *et al.* 2007; Lefevre *et al.* 2009; Moiroux *et al.* 2012a). A l'heure actuelle, peu de données existent sur les mécanismes responsables de ces modifications comportementales de type stimulus indépendant dans un contexte de lutte intégrée. Le comportement de recherche de l'hôte des insectes hématophages est modulé par le rythme circadien (Lazzari & Insausti 2008). Le rythme circadien est régulé par un ensemble de gènes dont les gènes *Clock* (*circadian locomotor output cycles kaput*), *Cycle*, *Period*, *Timeless*, *Cryptochromes* (Saunders 2002). Il a été montré aussi chez *Anopheles gambiae*, un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation des processus biologiques (neuraux et comportementaux, la détoxification, l'olfaction...) (Rund *et al.* 2011). Ce qui soulève une question de recherche à savoir si ces modifications observées sur le terrain sont liées à une modification d'expression des gènes impliqués dans le contrôle du rythme circadien des moustiques vecteurs en zone de lutte antivectorielle.

Modification comportementale de type dépendant du stimulus

Pour aborder cette partie, nous allons d'abord définir les terminologies comportementales utilisées pour mesurer l'action chimique d'un insecticide ou d'un répulsif sur le comportement des insectes. L'effet irritant est défini comme un mouvement orienté du vecteur poussant l'insecte à quitter la surface traitée d'insecticide après contact tarsal. Tandis que l'effet répulsif est défini comme un mouvement orienté du vecteur poussant l'insecte à éviter la surface traitée sans contact tarsal avec le composé chimique qui possède des propriétés volatiles (voir la revue de White (2014)).

Concernant l'action chimique des PYRs sur le comportement, des expériences au laboratoire ont permis de mesurer la stimulation de l'activité locomotrice par la mise en place de bio-essais (Grieco *et al.* 2007). Il a été aussi montré que les moustiques étaient irrités au contact avec les PYRs en d'autres termes une excitation qui entraîne une fuite des moustiques après contact avec le support traité (Chareonviriyaphap *et al.* 1997; Achee *et al.* 2009; Deletre *et al.* 2013; Spitzen *et al.* 2014). D'autres études utilisant un système d'enregistrement vidéo ont permis de montrer que l'exposition aux PYRs augmente la fréquence de contact et réduit le temps de contact avec la surface traitée comparée à une surface non traitée (Cooperband & Allan 2009; Siegert *et al.* 2009).

Cet effet excito-répulsif des PYRs porte à confusion dans la littérature (Miller *et al.* 2009). Le terme irritabilité (« *contact irritancy* ») ou le terme excito-répulsif (« *excito-repellency* ») sont utilisés pour faire part de l'effet irritant par contact (Roberts *et al.* 1997; Chareonviriyaphap, Prabaripai & Sungvornyothin 2002). Toutefois, certaines observations indirectes en cas expérimentales suggèrent un comportement d'évitement des moustiquaires imprégnées de PYRs par une baisse du taux d'entrée des moustiques dans les cases (effet déterrent) et une augmentation du nombre de moustiques collectés dans la véranda piège (exophilie induite) (Lindsay *et al.* 1991; Arredondo-Jiménez *et al.* 1997; Bøgh *et al.* 1998). Il en est de même pour une étude qui suggérait un effet répulsif de l'utilisation de la deltaméthrine en PID (Grieco *et al.* 2000). Toutes ces observations ont été faites sans une observation directe de l'effet répulsif des PYRs. Les réponses comportementales des anophèles aux MILDs

sur le terrain semblent être associées plus à un effet de contact qu'à un effet répulsif proprement dit des insecticides PYRs (Kongmee *et al.* 2012) qui ont généralement une très faible pression de vapeur saturante et par conséquent sont peu volatils. L'existence d'un effet répulsif des PYRs supposerait une détection avant contact tarsal avec la substance toxique afin de produire un évitement du support traité. Dans la littérature, nous avons un exemple documenté sur la détection et l'évitement d'un insecticide concernant la lutte contre *Musca domestica* L., en Géorgie (Etats-Unis d'Amérique) avec des pièges attractifs à base de malathion (voir la revue (Pluthero & Singh 1984). Il a été observé que la majorité des mouches s'approchaient du piège en vol, mais n'atterrissaient pas sur celui-ci (Kilpatrick & Schoof 1958). Néanmoins, dans les limites de nos connaissances, l'hypothèse d'une détection à distance des PYRs et d'évitement des surfaces traitées n'a jamais été explorée chez *An gambiae*. D'où l'importance de développer une approche expérimentale pour étudier la détection à distance des PYRs présents sur un support traité.

Par ailleurs, les mécanismes de résistance peuvent aussi modifier la réponse comportementale des moustiques aux pyréthrinoides. C'est le cas de la mutation *kdr*L1014F qui entraîne une résistance à leur effet irritant (Chandre *et al.* 2000). Une étude multicentrique dans des zones avec différents profils de résistance aux PYRs, des observations en cases pièges sur le terrain ont montré qu'il y avait une réduction des taux d'entrée dans les cases traitées par rapport aux cases non traitées et une variabilité de la réponse comportementale aux MILDs entre des moustiques résistants et sensibles (Corbel *et al.* 2010). Au vu de ces modifications comportementales, il semble important d'étudier de façon approfondie les modulations comportementales en présence des outils de lutte antivectorielle en relation avec les gènes de résistance qui fait l'objet de mon travail de recherche.

Chapitre II. Réponse comportementale *d'Anopheles gambiae* aux odeurs attractives d'un hôte vertébré en présence de matériaux imprégnés d'insecticide¹

¹ A pyrethroid-treated bed net attracts *Anopheles gambiae s.s.* carrying the *kdr* allele in a dual-choice olfactometer

Angélique Porciani, Malal M Diop, Nicolas Moiroux, Anna Cohuet, Fabrice Chandre, Laurent Dormont and Cédric Pennetier.

Soumis à *Infection, Genetics and Evolution*

Résumé

L'utilisation des MILDs a été largement adoptée comme la méthode principale de lutte contre les vecteurs. Toutefois, peu de données existent sur les effets directs des MILDs sur le comportement de recherche de l'hôte d'*An. gambiae* et l'interaction avec la mutation *kdr*L1014F qui confèrent une résistance aux insecticides PYRs. L'objectif de cette étude était de tester l'influence d'un insecticide pyréthrianoïde présent sur une MILD sur l'attractivité de l'hôte pour *An. gambiae* en relation avec le génotype *kdr*.

Méthodologie

Les expériences ont été réalisées sur trois souches de laboratoire d'*An. gambiae* : 1) la souche de référence KISUMU homozygote sensible (SS), 2) la souche *KDR*KIS homozygote résistante (RR) et 3) des individus hétérozygotes (RS) issus du croisement des femelles KIS et males *KDR*KIS.

Pour étudier l'attractivité relative d'un hôte vertébré protégé par une moustiquaire, nous avons utilisé un olfactomètre en Y et avons travaillé avec un lapin comme source d'odeurs attractives. Les trois génotypes *kdr* (SS, RS, RR) ont été soumis à diverses combinaisons d'odeur comprenant air ambiant, odeur de l'hôte, odeur de l'hôte en présence de filets imprégnés et non imprégnés d'insecticide. Pour analyser les réponses comportementales, nous avons mesuré l'activation et leurs déplacements dans les différents compartiments de l'olfactomètre. Enfin, nous avons mesuré l'attractivité relative de l'hôte vertébré en présence de tissus de moustiquaire traitée *versus* non-traitée d'insecticide.

Résultats & Discussion

Nous avons d'abord analysé la réponse anémotactique (réponse à flux d'air) des trois génotypes en absence de tout stimulus olfactif. Dans cette configuration, les hétérozygotes (RS) se sont significativement plus déplacés que les homozygotes résistants (RR). En présence d'odeurs attractives, les RS se sont également significativement plus déplacés que les SS et RR. Ces résultats montrent que la

mutation *kdr* module le comportement des vecteurs notamment pendant la phase de recherche appétitive (avant et après détection d'une odeur attractive).

Nos expériences sans odeurs attractives et sans moustiquaire traitée nous ont permis de vérifier la symétrie de notre olfactomètre. En présence des odeurs attractives de l'hôte, nos résultats ont montré que la présence de la moustiquaire sans insecticide modifie le choix, indiquant ainsi que la barrière physique est une variable qui modifie significativement le comportement du moustique.

La comparaison entre l'attractivité relative des bras de l'olfactomètre ne différant que par le traitement sur la moustiquaire a montré une variabilité de réponses entre les 3 génotypes. Les moustiques homozygotes résistants (RR) sont plus attirés par l'hôte en présence des filets traités contrairement aux deux autres génotypes qui n'ont montré aucune préférence entre les 2 bras. Ces résultats indiquent 1) que dans notre dispositif nous n'avons pas détecté d'effet déterrent de la perméthrine souvent décrit dans la littérature ; 2) que la présence à l'état homozygote de la mutation *kdr* est associée avec une préférence pour l'odeur attractive de l'appât en présence d'une moustiquaire imprégnée de perméthrine. Ce résultat inattendu soulève des questions sur les mécanismes qui pourraient expliquer ce phénotype comportemental, ouvrant ainsi plusieurs axes de recherche par exemple l'étude de l'influence de la mutation *kdr* sur la transduction d'un signal d'origine olfactive.

Conclusion

Cette étude apporte donc la confirmation que la barrière physico-chimique que constitue la moustiquaire imprégnée d'insecticide modifie à distance le comportement de recherche de l'hôte en association avec le génotype du moustique pour le locus *kdr* (1014). Cette étude ouvre des nouvelles perspectives de recherche afin de rechercher quels stimuli sont à l'origine de ces changements de comportement et comment la mutation *kdr* influence la réponse à ces stimuli.

1 **A pyrethroid-treated bed net attracts *Anopheles gambiae* s.s.**
2 **carrying the *kdr* allele in a dual-choice olfactometer**

3 Angélique Porciani^{1,2,∅}, Malal M Diop^{1,2,∅}, Nicolas Moiroux³, Tatiana Kadoke-Lambi^{1,}
4 ², Anna Cohuet³, Fabrice Chandre³, Laurent Dormont⁴ and Cédric Pennetier^{1,2}

5 ¹MiVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), Institut de Recherche pour le
6 Développement (IRD), Cotonou, Bénin

7 ²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Bénin.

8 ³MiVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), Institut de Recherche pour le
9 Développement (IRD), Montpellier, France

10 ⁴ Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), CNRS UMR 5175, Route de
11 Mende, 34293 Montpellier, France

12 [∅]These authors contributed equally to this work

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **Abstract**

25 The use of long lasting insecticide nets (LLINs) treated with pyrethroid has
26 been widely adopted as the main method to control malaria vectors. But little is
27 known of the influence of LLINs on host choice despite the fact that a modification of
28 mosquitoes' choice in presence of LLIN might have a drastic effect on the
29 *Plasmodium sp.* transmission. Another parameter to take into account is pyrethroid
30 resistance as threatening for LLIN efficiency. Due to such widespread resistance
31 among mosquitoes, it becomes urgent to investigate whether and how the use of
32 insecticide-impregnated materials might affect the host-seeking behaviour of malaria
33 vectors that are resistant or not to insecticides. In this study, we explored permethrin-
34 impregnated net impact on the host attractiveness for *Anopheles gambiae*
35 mosquitoes sharing the same genetic background except the knockdown resistance
36 (*kdr*) genotypes. Groups of female mosquitoes were released in a dual-choice
37 olfactometer and their movements towards an odour source (a rabbit) protected by
38 insecticide-treated (ITN) or untreated nets (UTN) were monitored. *Kdr* homozygous
39 mosquitoes (resistant to insecticides) were more attracted by a host behind an ITN
40 than an UTN. This result suggests that the *kdr* mutation modulates the mosquito's
41 behaviour and its perception of the volatiles host cues and second, that permethrin-
42 impregnated net is detectable.

43

44 **Keywords:** *Anopheles gambiae*, Behaviour, Insecticide, *Kdr* mutation, Insecticide
45 resistance management

46

47

48

49

50 Background

51 *Anopheles gambiae* is one of the major mosquito vectors of human malaria
52 pathogens in sub-Saharan Africa. Its remarkable vectorial capacity (Cohuet *et al.*
53 2010) mainly relies on its high degree of anthropophily. Moreover, *An. gambiae*
54 prefers to bite humans indoors and rest inside houses (Garrett-Jones & Shidrawi 1969;
55 Coluzzi *et al.* 1979; Garrett-Jones *et al.* 1980). These behavioural preferences led to the
56 development of insecticide-based indoor vector control measures, such as
57 insecticide-treated bed nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS), to limit the
58 human-vector contacts and hamper mosquito survival. To date, four insecticide
59 families are available for IRS (organochlorides, organophosphates, carbamates and
60 pyrethroids), whereas only pyrethroids are recommended for mosquito nets because
61 of their low mammalian toxicity and high insecticidal potency (Zaim *et al.* 2000).

62 To kill, insecticide molecules must contact and penetrate through the mosquito
63 cuticle/gut to then reach and interact with their target before being degraded. Any
64 physiological or behavioural mechanism that may interfere with one of these steps
65 can lead to insecticide resistance. The widespread use of pyrethroid (PYR)
66 insecticides in malaria vector control and agriculture has favoured the development
67 of resistance in malaria vector species (Ranson *et al.* 2011). One of the most studied
68 physiological mechanisms involved in PYR resistance is the reduced sensitivity of the
69 voltage-gated sodium channels to PYR binding caused by non-silent mutations,
70 known as knockdown resistance (*kdr*) mutations (Ranson *et al.* 2001). Behavioural
71 resistance is another mechanism involved in PYR resistance. This can be defined as a
72 modification of the mosquito behaviour to avoid contact with a lethal dose of
73 insecticide (Gatton *et al.* 2013). However, behavioural resistance to insecticides
74 remains poorly studied and documented, despite its huge potential impact on malaria
75 transmission.

76 Behavioural adaptations can be classified as stimulus-dependent or -
77 independent (Georghiou 1972). Stimulus-independent adaptations are not associated
78 with the perception of chemicals, but more probably with modifications of the vector
79 intrinsic behaviour, such as changes in host-seeking behaviour preferences (level of

80 anthropophily, endophagy, endophily or hourly biting activities). These behavioural
81 modifications have recently been observed in the context of ITN widespread use
82 (Corbel *et al.* 2012; Moiroux *et al.* 2012; Ndiath *et al.* 2014). These changes may limit
83 the contact between aggressive malaria vectors and treated surfaces, thus threatening
84 the efficiency of indoor vector control tools. Conversely, stimulus-dependent
85 behavioural adaptations are specifically linked to the detection of chemicals.
86 Stimulus-dependent insecticide avoidance can be defined as a “fly away” behaviour
87 to leave the immediate toxic environment after contact (irritancy) or not (repellence)
88 with the treated surface (Lockwood *et al.* 1984; Chareonviriyaphap *et al.* 2013).
89 Avoidance behaviour following contact with PYR has been reported in some cases
90 (Chareonviriyaphap *et al.* 1997; Malima *et al.* 2009; Achee *et al.* 2009; Deletre *et al.*
91 2013), but similar behaviour in the absence of direct contact with the insecticide has
92 been poorly documented. Some indirect observations in experimental huts revealed
93 a reduction of entry rates in insecticide-treated huts compared to control huts,
94 together with variability of the behavioural response to ITNs in resistant and
95 susceptible mosquitoes (Corbel *et al.* 2010). Therefore, it is urgent to investigate the
96 possible modulation of the host-seeking behaviour in the presence of indoor vector
97 control tools.

98 In this study, we examined the long-range host-seeking behaviour of *An.*
99 *gambiae* mosquitoes to determine whether the attractiveness of a vertebrate host
100 (rabbit) in a dual-choice olfactometer was influenced by physical and/or chemical
101 barriers (insecticide-treated and untreated nets) and by the mosquito *kdr* (L1014F)
102 genotype.

103 **Materials and methods**

104 **Ethics statement**

105 All experiments were performed in accordance and approved by National
106 Comity for Ethic and Research (CNERS) and Health ministry of Benin (N°023).

107 **Mosquitoes**

108 Two laboratory reference strains of *Anopheles gambiae sensu stricto* (formerly
109 called S molecular form) (Coetzee *et al.* 2013) were used in this study. The Kisumu
110 reference strain, isolated in Kenya in 1975 (VectorBase, <http://www.vectorbase.org>,
111 KISUMU1), is free of any detectable insecticide resistance mechanism. The *kdr*-kis
112 strain was obtained by introgression into the Kisumu genome of the *kdr*-west allele
113 (L1014F) (Martinez-Torres *et al.* 1998) that originated from a PYR-resistant population
114 collected in Kou Valley, Burkina Faso and reared as the VKPer strain. Introgression
115 was obtained through 19 successive back-crosses between Kisumu and VKPer (Djegbé
116 2013). VKPer strain used to obtain *kdr*-Kis displayed the same expression level of
117 metabolic resistance enzyme as Kisumu (N'Guessan *et al.* 2007). Kisumu and *kdr*-kis
118 mosquitoes are therefore homozygous susceptible (SS) and homozygous resistant
119 (RR) at the *kdr* locus, respectively. The heterozygous genotype RS was obtained by
120 crossing Kisumu SS females with *kdr*-kis RR males.

121 Mosquitoes were reared in insectary conditions (27±3°C, 60-80% relative
122 humidity and a 12:12 light and dark cycle). Ground cat food was used to feed larvae
123 and 10% sucrose solution (with rabbit blood twice per week) to feed adult females.
124 For behavioural experiments, 5-12 days/old females, without prior access to a blood
125 meal, were starved for 4h before the test.

126 **Behavioural assay**

127 The dual-choice olfactometer was adapted from (24). It was made of Plexiglas
128 and was divided in four parts: release zone (RZ), flight chamber (FC) and one
129 collecting zone in each of the two arms (A1 or A2) (Fig 1). Rotating doors made from
130 mesh gauze were present in the RZ and in both arms to allow mosquito release or
131 capture. The upwind part of the experimental set-up was composed of a wide
132 chamber for the odour source (rabbit) that was connected to two treatment boxes that
133 contained or not the nets, according to the experiment. Each treatment box was
134 connected to one arm of the olfactometer. In order to avoid any perturbation by the
135 treatment on the airflow, the fans are placed on the downwind faces of the
136 experiment boxes and aspirated the air from the treatment boxes to the olfactometer,

137 providing the odour-laden air current. At the beginning of each experiment, the
138 airflow was measured in arm 1 and 2 and in release zone with Testo® 435-1
139 multifunctional meter (Testo, Forbach, France) and thermo-anemometric probe (m.s.
140 ¹) and regulated at $0.20 \pm 0.03 \text{ m.s}^{-1}$. During the experiment, a thick black tarpaulin
141 covered the olfactometer to keep all the system in darkness and avoid any visual
142 disturbance.

143 **Experiments**

144 Four different experiments, summarized in Table 1, were performed using SS,
145 RR and RS mosquitoes. The treatment boxes and the wide chamber were empty
146 during the first experiment. For the other experiments, the wide chamber contained
147 a rabbit as odour source. The treatment boxes contained, depending on the
148 experiment, nothing or 2m^2 of untreated (UTN) or insecticide-treated net (ITN,
149 Olyset® Net impregnated with $1000\text{mg}/\text{m}^2$ of permethrin). Nets were divided in 50
150 pieces of $20 \times 20\text{cm}$ and hung on a metallic structure perpendicularly to the air flow.
151 The same nets were used during all experiment, the Olyset was conserved at 4°C
152 between each day of experiment.

153 The four experiments were performed each day for 20 days between
154 10:00am and 14:00pm (corresponding to usual feeding time in laboratory). We always
155 start with experiment 1, to prevent odour or insecticide contaminations. When
156 possible (i.e., when the insectary production was sufficient), females of the three
157 genotypes were tested the same day in each experiment (1 to 4), otherwise at least two
158 genotypes were tested the same day (a summary of the design is available in
159 supplementary data). Each day, treatments in experiments 3 and 4 were rotated one
160 time between boxes to prevent any arm effect. Between rotations, the boxes were
161 carefully cleaned with ethanol to avoid any residual insecticide effect. Moreover, the
162 olfactometer was cleaned with ethanol every day to remove odour contaminants. The
163 experimenter wore latex gloves to avoid contamination. The same rabbit was used as
164 odour source during all the study. It was a 1-year old female reared in the same
165 conditions as those used in insectaries to feed mosquitoes. CO_2 concentration and
166 relative humidity (RH) were monitored in each arms with a Testo® 435-1

167 multifunctional meter (Testo, Forbach, France) equipped with an Indoor Air Quality
168 (IAQ) probe [%RH; range: 0 to +100 %RH; accuracy: ± 2 %RH (+2 to +98 %RH)], [CO₂;
169 range: 0 to +10000 ppm; accuracy: (± 75 ppm CO₂ $\pm 3\%$ of mv) (0 to +5000 ppm CO₂)]. The
170 room was kept at a constant temperature of 25°C during the experiment.

171 For each experiment, a batch of 20-23 females was released in the RZ for 5 min
172 for acclimation. The rotating doors were then opened and females were free to fly in
173 the olfactometer. After 5 minutes, the rotating doors were closed and the numbers of
174 mosquitoes in RZ (N_{RZ}), FC (N_{FC}), A1 and A2 (N_{A1} and N_{A2}) were recorded (Figure 1).

175 Behavioural indicators

176 The indicators used in this study describe the mosquito progress inside the
177 olfactometer and the relative attractiveness (RA) of treatments or arms.

178 Two indicators of the progression inside the olfactometer are calculated. First,
179 upwind flight (UF) that is the proportion of female that left the release zone (i.e.
180 collected in FC, A1 and A2) relative to the total number of released mosquitoes (N).
181 Second is the localisation (L) of odour source that is the proportion of female that
182 reached A1 and A2 (N_{A1} and N_{A2}), relative to the number of mosquitoes that left the RZ
183 ($N - N_{RZ}$). These indicators were calculated for each release and for each odour source
184 (none, rabbit without ITN and rabbit with ITN).

185 The upwind flight and localisation values measured in experiment 1 (empty set-up,
186 clean air) are baseline indicators of the anemotactic response of the three mosquito
187 genotypes to air flow. The influence of rabbit was determine comparing the upwind
188 flight and localisation between values recorded in experiment 1 (empty) and merged
189 values of experiment 2 and 3 (rabbit odour, no ITN). The merged upwind flight and
190 localisation values recorded in experiments 2 and 3 (rabbit odour, no ITN) were
191 compared to those recorded in experiment 4 (rabbit odour and ITN) to determine ITN
192 influence on mosquito behaviour.

193 The relative attractiveness (RA) of one arm versus the other was calculated as the
194 proportion of mosquitoes in A1 or A2 (N_{A1} or N_{A2}) relative to the sum of the mosquitoes
195 collected in both arms. In order to verify the symmetry of the experimental set-up,

196 we measured RA_{exp2} in experiment 2 (rabbit as an odour source, empty boxes) as
197 follow and expect it to not be different than 0.5:

$$198 \quad RA_{exp2} = N_{A1} / (N_{A1} + N_{A2})$$

199 Relative attractiveness of UTN versus empty box (RA_{exp3}) and ITN versus UTN (RA_{exp4})
200 were also calculated from experiments 3 and 4, respectively, using the following
201 equations:

$$202 \quad RA_{exp3} = N_{UTN} / (N_{Empty} + N_{UTN})$$

$$203 \quad RA_{exp4} = N_{ITN} / (N_{UTN} + N_{ITN})$$

204 with N_{UTN} the number of mosquitoes collected in the arm with the box containing the
205 UTN (experiment 3 or 4), N_{Empty} the number of mosquitoes in the arm with the empty
206 box (experiment 3) and N_{ITN} the number of mosquitoes collected in the arm with the
207 box containing the ITN (experiment 4). The measure of RA_{exp3} will help to assess the
208 effect of the physical barrier of the UTN on the diffusion of odour coming from the
209 rabbit to the olfactometer.

210

211 **Statistical analysis**

212 All analyses were performed using the R software, version 3.0.2 (R Core Team, 2014),
213 with the lme4 additional package (Bates et al., 2014). We analysed upwind flight and
214 localisation using binomial logistic mixed-effect models. The day of release was set as
215 random intercept because releases performed on a same day might not be
216 independent and because all three genotypes have not been tested each day. The *kdr*
217 genotypes (SS, RS or RR), the different odour sources (none, Rabbit without ITN, and
218 Rabbit+ITN) and interactions were included in the models as explanatory variables.
219 Upwind flight (UF) and localisation (L) models were written as follow:

$$220 \quad \text{logit}(UF \text{ or } L_{ijk}) = \beta_0 + \beta_i^{Genotype} + \beta_j^{Odour} + \beta_i^{Genotype} \times \beta_j^{Odour} + d_k$$

221 , where UF or L_{ijk} is the proportion UF or L recorded for genotype i with odour source
 222 j on day k , $\beta_i^{Genotype}$ denotes the effect on the logit of the classification in category i
 223 (SS, RS or RR) of Genotype; β_j^{Odour} denotes the effect of the classification in category j
 224 of Odour source: Empty (experiment 1), Rabbit without ITN (experiment 2 and 3), or
 225 Rabbit+ITN (experiment 4); and d_k denoted the random intercept for day k . Each
 226 combination of categories i and j of the explanatory variables was successively used
 227 as reference class for multiple comparisons among genotypes and odour sources.
 228 Odds ratios and their 95% confidence intervals (CI) were computed.

229 We verified the symmetry of the experimental set-up by modelling the relative
 230 attractiveness measured in experiment 2 (RA_{exp2}) using a binomial mixed-effect model
 231 with the release day as random effect:

$$232 \quad \text{logit}(RA_{exp2,ik}) = \beta_0 + \beta_i^{Genotype} + d_k$$

233 , where $RA_{exp2, ik}$ is the proportion RA in A1 for genotype i in experiment 2 on day k ,
 234 $\beta_i^{Genotype}$ denotes the effect on the logit of the classification in category i (SS, RS or
 235 RR) of Genotype; and d_k denotes the random intercept for day k .

236 Relative attractiveness of UTN vs. empty box and ITN vs. UTN were analysed using a
 237 similar model that, in addition, allows for random effects of the box that received the
 238 treatment:

$$239 \quad \text{logit}(RA_{ikl}) = \beta_0 + \beta_i^{Genotype} + b_l + d_k$$

240 , where RA_{ikl} is the proportion RA_{exp3} or RA_{exp4} for genotype i on day k with the
 241 treatment placed in box l , $\beta_i^{Genotype}$ denotes the effect on the logit of the classification
 242 in category i (SS, RS or RR) of Genotype; b_l denotes the effect on the logit of the the
 243 box l that received the treatment (UTN or ITN for RA_{exp3} and RA_{exp4} , respectively) and
 244 d_k denotes the random intercept for day k . Each genotype was successively used as
 245 reference class for multiple comparisons. Odds ratios and their 95% CI were
 246 computed.

247 CO₂ concentrations were compared between arms using the Wilcoxon signed-rank
248 test for paired data. RH values were compared between arms using the paired T test.

249 **Results**

250 Over the 20 days of the study, we tested seven times the three genotypes during
251 the same day and 14 times we tested two genotypes (one SS-RS, one RR-RS and 11 SS-
252 RR). Overall, 6286 mosquitoes were released (2621 SS, 1268 RS and 2397 RR)
253 corresponding to 278 releases (Table 2).

254 **Environmental variables**

255 CO₂ concentration and RH were not different between arms, except in
256 experiment 3 where RH was significantly lower (paired T test p-value = 0.007) in the
257 UTN arm (63.9 %) than in the empty arm (64.9 %). Detailed results are available in
258 supplementary data.

259 **Do *An. gambiae* females respond to the air flow?**

260 We first investigated the response to the airflow (anemotactic response) by
261 calculating the proportion of upwind flight (UF) females and those located (L) in arms
262 in the empty set-up (Experiment 1). Overall, probability to left RZ (UF) was 0.43
263 (95%CI [0.38 – 0.48]; Fig 2A). Among these mosquitoes, 10% (95%CI [6 – 17]) reached
264 A1 or A2 (Fig 2B). Although we were not able to find any differences in upwind flight
265 proportion among genotypes, probability of localisation (L) for RS anopheles was
266 higher than those of RR mosquitoes (Figure 2B; OR_L = 2.15, 95%CI [1.04, 4.41]).

267 **Do *An. gambiae* females respond to an attractive odour source?**

268 Addition of the rabbit as an attractive odour source (experiments 2 and 3) did
269 not change the proportion of upwind flight mosquitoes, compared to no odour
270 (experiment 1), independently of their genotype (Table 3). However, the upwind
271 flight probability of RS mosquitoes became significantly higher than that of SS and RR
272 individuals (Fig 2A; OR_{RSvsSS} = 1.24 95%CI [1.01, 1.54]; OR_{RSvsRR} = 1.29 95%CI [1.04, 1.59]).
273 Moreover, the localisation probability was significantly increased for all genotypes in
274 the presence of an odour stimulus compared to no odour (Table 3) but no difference
275 was found among genotypes (Fig 2B). The higher localisation values in the presence

276 of an odour source suggest that mosquitoes can detect and respond to attractive
277 odours. In other words, they were activated by the presence of the rabbit.

278 **Is mosquito progression influenced by insecticide-treated nets?**

279 To test whether the insecticide on net fibres affected mosquito progression, we
280 compared upwind flight and localisation probabilities in the presence (experiment 4)
281 or absence (experiments 2 and 3) of the ITN. The probabilities were similar in
282 presence or absence of the ITN, regardless of the genotype (Table 3; Fig 2A, 2B).
283 Nevertheless, upwind flight probabilities for heterozygous RS mosquitoes remained
284 higher than that of the two other genotypes both in the presence and absence of
285 insecticide (Fig 2A; $OR_{RSvsSS} = 1.28$ 95%CI [1.01, 1.62], $OR_{RSvsRR} = 1.20$ 95%CI [0.94, 1.53]).

286 **Is the set-up symmetric?**

287 Analysis of the arms' relative attractiveness data from experiment 2 (Rabbit
288 odour; two empty boxes) shown no significant difference between the number of
289 mosquitoes collected in A1 vs. A2, regardless of the genotypes (Fig 3A; $RA_{exp2, SS} = 0.58$,
290 95%CI [0.34, 0.79]; $RA_{exp2, RS} = 0.62$, 95%CI [0.34, 0.83]; $RA_{exp2, RR} = 0.54$, 95%CI [0.30,
291 0.76]). No difference in RA_{exp2} was observed among genotypes ($OR_{SSvsRS} = 1.16$ 95%CI
292 [0.46, 2.94]; $OR_{SSvsRR} = 0.85$ 95%CI [0.38, 1.94], $OR_{RSvsRR} = 0.73$ 95%CI [0.28, 1.90]).
293 Moreover, CO₂ concentration and RH were not different between arms ($p > 0.05$; S1).
294 These results demonstrated that the olfactometer was symmetrical. Moreover,
295 analyses of RA_{exp3} and RA_{exp4} , which results are described below, show no effect of the
296 box receiving the treatment (i.e. variable no significant in the model) indicating that
297 symmetry was saved during experiments 3 and 4.

298 **Is the attractiveness of the odour source influenced by the untreated net?**

299 In experiment 3 (Rabbit odour; one empty box and one box with 2 m² of UTN),
300 empty box was more attractive for SS and RR mosquitoes but not for RS ($RA_{exp3, SS} = 0$,
301 31 95%CI [0.20, 0.46], p -value= 0.013; $RA_{exp3, RR} = 0.27$, 95%CI [0.17, 0.42], p -value=0.002)
302 (Fig 3B). No significant difference of behaviour was evidenced between genotypes
303 ($OR_{SSvsRS} = 1.24$, 95%CI [0.61, 2.50]; $OR_{SSvsRR} = 0.83$, 95%CI [0.41, 1.66], $OR_{RSvsRR} = 0.67$,
304 95%CI [0.31, 1.47]). CO₂ concentration was not different between arms whereas a

305 significant 1% difference in RH was observed (63.9 % in the UTN arm and 64.9% in
306 the empty arm, paired T test p-value = 0.007).

307 **Is the attractiveness of the odour source influenced by the ITN?**

308 Analysis of RA_{exp4} from experiment 4 (Rabbit odour; one box with 2 m² of UTN
309 and one with 2 m² of ITN) shown that RR mosquitoes significantly chose the ITN arm
310 with probability 0.63 (95%CI [0.53-0.73], p-value=0.01; Fig 3C). This probability was
311 significantly higher than those of RS ($RA_{exp4, RS} = 0.47$ 95%CI [0.34-0.60]; $OR_{RRvsRS} = 1.95$,
312 95%CI [1.06, 3.57], p-value=0.03) and SS ($RA_{exp4, SS} = 0.5$ 95%CI [0.40-0.61]; $OR_{RRvsSS} = 1.71$,
313 95%CI [1.03, 2.83], p-value=0.04). CO₂ concentration and RH were not different
314 between arms.

315

316 **Discussion**

317 The host-seeking behaviour of mosquitoes towards humans sleeping under a
318 mosquito net has been poorly studied. Particularly, it is not known whether specific
319 volatile chemicals emanating from treated nets might modulate this behaviour. Here,
320 we used a dual-choice olfactometer to investigate whether the presence of
321 permethrin-treated nets may influence the host attractiveness for mosquitoes with
322 different *kdr* genotypes. In our experimental conditions, nets represent both a
323 physical and a chemical signal that modulate mosquito activation and/or choice.
324 Moreover, the three *kdr* genotypes displayed significant differences in their
325 responses to host odours in the presence of ITNs or UTNs.

326 Our results clearly indicate that the *kdr* mutation modulates the host choice of
327 *An. gambiae* mosquitoes in the presence of Long Lasting Insecticide Net (LLIN). The
328 behaviour of insects, such as mosquitoes, is driven by the perception and integration
329 of odorant signals in antennae and higher brain centre (Sachse and Krieger, 2011;
330 Wicher, 2015). In this study we observed an olfactory preference for a host behind a
331 permethrin-treated net rather than behind an untreated net for *kdr* resistant
332 mosquitoes. These mosquitoes are thus able to perceive at distance the difference
333 between the two nets. Preference in mosquitoes is closely related to the presence and

334 expression of olfactory receptors (McBride, 2016). We can hypothesize that *kdr*
335 resistant mosquitoes may detect permethrin released by net, implying the presence
336 of olfactory receptor tuned to this insecticide. To our knowledge, no OR tuned to
337 pyrethroid molecules has been found yet in *Anopheles* mosquitoes. A receptor tuned
338 to synthetic pyrethroid has recently been found in *Aedes aegypti* (Bohbot *et al.* 2011),
339 suggesting that such an OR may exist in *Anopheles* mosquitoes. Such a hypothesis
340 needs further investigations using OR expression and neurophysiology studies.
341 Nevertheless, the strains used in our study share the same genetic background
342 implying that none or all mosquitoes might have the pyrethroid-sensitive OR.

343 In this context, only a pleiotropic effect of the *kdr* mutation inducing an
344 overexpression of a permethrin-tuned OR in *kdr* resistant homozygous might
345 explain the different behaviours between genotypes.

346 Another hypothesis to explain such differences relies on the fact that the *kdr* mutation
347 may likely influence the transmission of an odorant signal towards higher brain
348 regions by enhancing the closed-state inactivation of the voltage-gated sodium
349 channel, which plays a central role in message propagation in the nervous system. As
350 a consequence, a reduction of nervous system excitability could be observed in *kdr*
351 mutants in comparison to susceptible individuals (Vais *et al.* 2000). All chemical
352 signals are transduced by spike frequencies in the olfactory sensory neurons
353 (Guidobaldi *et al.* 2014) and the information sent by stimulated or inhibited neurons
354 is treated in the antennal lobe (Hanson *et al.* 1999). Therefore, if the depolarization
355 frequency differs in homozygous *kdr* genotypes, the response pattern of the olfactory
356 neurons and subsequently the signal integration and processing in the central
357 nervous system could be altered, leading to a modified behaviour, in this case, a host
358 preference.

359 This result indicates the existence of interactions between the physiological
360 mechanisms that allow mosquitoes to survive a contact with lethal doses of
361 insecticide and the attractive cues driving their host-seeking behaviour. These
362 interactions may have major implications in malaria control. Indeed, from an
363 evolutionary point of view, for phenotypically resistant mosquitoes, volatile

364 compounds emanating from ITNs might represent a good host-specific cue to locate
365 humans. It is urgent to examine the potential epidemiological consequences of the
366 interaction between insecticide resistance and host-seeking behaviour of malaria
367 vectors.

368 Heterozygous RS mosquitoes were more active than SS and RR mosquitoes. The
369 addition of an attractant did not change the proportion of RS leaving the RZ,
370 suggesting that this behaviour might be related to a better anemotactic response (i.e
371 response to air flow) or spontaneous flight activity than a better perception of
372 odorants in RS mosquitoes. This hypothesis is strengthened by the absence of
373 differences in the progression towards the olfactometer arms among genotypes. In
374 simple words, heterozygous mosquitoes fly more, but might not smell better. On the
375 one hand, by flying more they might increase the probability of encountering a host
376 odorant plume which might be advantageous. Such heterozygous advantage for the
377 *kdr* locus in *An. gambiae s.s.* has been recently documented also for another
378 behavioural trait: the ability to find a hole in a piece of bed net (Diop *et al.* 2015) and
379 for male mating (Platt *et al.* 2015). In other hand, it could be a cost for mosquitoes if
380 energy spent in flight is no more available for other traits closely related to fitness as
381 fertility, fecundity and longevity. This trade off must be deeply investigated as this
382 might have great influence on *Plasmodium* transmission.

383 Further studies are needed to investigate such rare phenomenon, but it must be
384 interpreted with caution because other loci (distinct from the *kdr* locus) could also
385 influence this behavioural trait. For example, loci flanking the gene coding for the
386 voltage-gated sodium channel might have been selected during the generation of the
387 homozygous resistant strain (Berticat *et al.* 2002). The variation in the upwind flight or
388 choice between genotypes could also result from other alleles, which were fixed by
389 genetic drift independently of the resistance selection process. Drift effects could
390 indeed occur in laboratory populations during the selection process of the resistant
391 strains as a consequence of the inbreeding associated with their maintenance
392 (Georghiou, 1972; Turissini *et al.* 2014). Therefore, we cannot exclude in our study an
393 effect due to variation in the genetic background.

394 Our results raised the question of the volatile chemicals emanating from nets that may
395 drive this specific behaviour in resistant mosquitoes. Permethrin is not known as a
396 classical volatile compound because of its low vapour pressure (5.18×10^{-8} mm Hg at
397 25°C). Nevertheless, a study in public health detected the presence of permethrin
398 molecules in habitation air (Bouvier *et al.* 2006). Moreover, a study of Bomman (1995)
399 found a low concentration of alpha cypermethrin in the air surrounding an
400 insecticide-treated bed net, showing that insecticides can be present in air and used
401 by mosquitoes during host seeking. It is also possible that others molecules are
402 released by permethrin-treated LLIN. Collection and analysis of volatile chemicals
403 released by ITNs and the hosts are ongoing in order to identify the chemical cues
404 involved in the modulation of the host-seeking behaviour and to assess the ability of
405 *An. gambiae* olfactory system to detect such chemicals.

406 In experiment 3, mosquitoes favoured the arm connected to the empty box rather
407 than the box with UTNs. No difference in CO_2 quantity was noted between arms.
408 However, the humidity level was slightly higher in the arm connected with the empty
409 box. As humidity is known to attract mosquitoes (Takken *et al.* 1997), the observed
410 preference for the empty box (higher humidity) was not surprising. This difference
411 could have been caused by the physical barrier formed by UTNs that absorbed
412 humidity coming from rabbit box. In addition, the net structure could also have
413 retained volatile chemicals emanating from rabbit which are important in mosquito
414 orientation and choice (Dekker *et al.* 2001; Cardé and Gibson 2010).

415 Finally, mosquitoes, regardless of their genotype, were never repelled by permethrin
416 on the net fibres, suggesting an irritant property rather than a long-range repellent
417 one. Recent studies using bio-assays are consistent with this observation (Deletre *et*
418 *al.* 2013; Spitzen *et al.* 2014).

419 In conclusion, our study shows that the *kdr* mutation modulates response to odour
420 coming from host in presence of permethrin-treated net. In the current context of
421 increasing insecticide resistance in malaria vectors, mosquito behavioural
422 modifications and physiological resistance should be taken into account when

423 evaluating the impact or developing new insecticide-based tools. Moreover, in the
424 field, wild mosquitoes often show multiple resistance mechanisms that might
425 concomitantly influence their host seeking behaviour as well as the presence of
426 *Plasmodium* parasites (Cator *et al.* 2013). Therefore, further studies to examine the
427 behaviour of wild mosquitoes in field conditions are urgently needed to better
428 understand the interactions between insecticide-resistant mosquitoes and their
429 environment.

430 **Funding**

431 This work was supported by the Research Institute for Development (IRD). AP is
432 supported by IRD through an international Voluntary fellowship and by François
433 Lacoste (Inkermann fund fellowship). MMD is supported by an IRD PhD fellowship.
434 Authors declare to have no conflict of interest.

435 **Acknowledgement**

436 We would like to thank the IEMTV staff in Abomey Calavi (Benin) for technical
437 assistance.

438 **Conflict of interest**

439 Authors declare to have no conflict of interest

440 **References**

- 441 1. Achee, N.L., Sardelis, M.R., Dusfour, I., Chauhan, K.R., Grieco, J.P., 2009.
442 Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical
443 Actions of Standard Vector Control Compounds 1. J. Am. Mosq. Control Assoc. 25,
444 156–167. doi:10.2987/08-5831.1
- 445 2. Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. lme4: Linear mixed-effects
446 models using Eigen and S4. R package version 1.1-7.
- 447 3. Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance
448 genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. Genet. Res.
449 79, 41–47.

-
- 450 4. Bomann, W., 1995. How Safe are Pyrethroid-treated Mosquito Nets? An Evaluation
451 Based on the example of Solfac EW 050. Public Health Pap., Bayer AG Animal
452 Health Division.
- 453 5. Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., Seta, N., 2006. Pesticide exposure of non-
454 occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: A
455 French pilot study. *Sci. Total Environ.* 366, 74–91.
456 doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.016
- 457 6. Cardé, R.T., Gibson, G., 2010. Host finding by female mosquitoes: mechanisms of
458 orientation to host odours and other cues, in: *Olfaction in Vector-Host*
459 *Interactions*. Willem Takken and Bart G.J. Knols. Wageningen Academic
460 Publishers.
- 461 7. Cator, L.J., George, J., Blanford, S., Murdock, C.C., Baker, T.C., Read, A.F.,
462 Thomas, M.B., 2013. “Manipulation” without the parasite: altered feeding
463 behaviour of mosquitoes is not dependent on infection with malaria parasites.
464 *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280. doi:10.1098/rspb.2013.0711
- 465 8. Chareonviriyaphap, T., Bangs, M.J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V.,
466 Ngoen-Klan, R., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance
467 of vectors of human diseases in Thailand. *Parasit. Vectors* 6, 280. doi:10.1186/1756-
468 3305-6-280
- 469 9. Chareonviriyaphap, T., Roberts, D.R., Andre, R.G., Harlan, H.J., Manguin, S.,
470 Bangs, M.J., 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a
471 malaria vector in the Americas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13, 171–183.
- 472 10. Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Torre, A. Della, Coulibaly, M.B., Besansky,
473 N.J., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the
474 *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* In press, 1–29.
- 475 11. Cohuet, A., Harris, C., Robert, V., Fontenille, D., 2010. Evolutionary forces on
476 *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol.* 26, 130–136.
- 477 12. Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., Deco, M.A.D., 1979. Chromosomal
478 differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae*
479 complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 483–497. doi:10.1016/0035-
480 9203(79)90036-1

- 481 13. Corbel, V., Akogbeto, M., Damien, G.B., Djenontin, A., Chandre, F., Rogier, C.,
482 Moiroux, N., Chabi, J., Padonou, G.G., Henry, M.C., 2012. Combination of malaria
483 vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster
484 randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*
- 485 14. Corbel, V., Chabi, J., Dabire, K.R., Etang, J., Nwane, P., Pigeon, O., Akogbeto, M.,
486 Hougard, J.M., 2010. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net
487 (PermaNet 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study
488 in Western and Central Africa. *Malar. J.* 9:113.
- 489 15. Dekker, T., Takken, W., Carde, R.T., 2001. Structure of host-odour plumes
490 influences catch of *Anopheles gambiae* ss and *Aedes aegypti* in a dual-choice
491 olfactometer. *Physiol. Entomol.* 26, 124–134.
- 492 16. Deletre, E., Martin, T., Campagne, P., Bourguet, D., Cadin, A., Menut, C., Bonafos,
493 R., Chandre, F., 2013. Repellent, Irritant and Toxic Effects of 20 Plant Extracts on
494 Adults of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Mosquito. *PLoS ONE* 8, e82103.
495 doi:10.1371/journal.pone.0082103
- 496 17. Diop, M.M., Moiroux, N., Chandre, F., Martin-Herrou, H., Milesi, P., Boussari, O.,
497 Porciani, A., Duchon, S., Labbé, P., Pennetier, C., 2015. Behavioral Cost &
498 Overdominance in *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* 10, e0121755.
499 doi:10.1371/journal.pone.0121755
- 500 18. Djegbé, I., 2013. Modification physiologique et comportementale induites par la
501 résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme au Bénin. Université
502 d'Abomey Calavi, Bénin.
- 503 19. Foster, S. p., Woodcock, C. m., Williamson, M. s., Devonshire, A. l., Denholm, I.,
504 Thompson, R., 1999. Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus*
505 *persicae* (Hemiptera: Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (
506 kdr) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies.
507 *Bull. Entomol. Res.* 89, 133–138. doi:10.1017/S0007485399000218
- 508 20. Foster, S., Young, S., Williamson, M., Duce, I., Denholm, I., Devine, G., 2003.
509 Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato
510 aphids and houseflies. *Heredity* 91, 98–106.

- 511 21. Garrett-Jones, C., Boreham, P.F.L., Pant, C.P., 1980. Feeding habits of anophelines
512 (Diptera: Culicidae) in 1971–78, with reference to the human blood index: a
513 review. *Bull. Entomol. Res.* 70, 165–185.
- 514 22. Garrett-Jones, C., Shidrawi, G.R., 1969. Malaria vectorial capacity of a population
515 of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bull. World*
516 *Health Organ.* 40.
- 517 23. Gatton, M.L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M.J., Ghani, A.C., Godfray,
518 H.C.J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H., Rowland, M., Shaman, J.,
519 Lindsay, S.W., 2013. The Importance of Mosquito Behavioural Adaptations to
520 Malaria Control in Africa. *Evolution* 67, 1218–1230. doi:10.1111/evo.12063
- 521 24. Geier, M., Boeckh, J., 1999. A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure
522 the attractiveness of host odours. *Entomol. Exp. Appl.* 92, 9–19.
- 523 25. Georghiou, G.P., 1972a. The evolution of resistance to pesticides. *Annu. Rev. Ecol.*
524 *Syst.* 3, 133–168.
- 525 26. Georghiou, G.P., 1972b. Studies on resistance to carbamate and
526 organophosphorus insecticides in *Anopheles albimanus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
527 21, 797–806.
- 528 27. Guidobaldi, F., May-Concha, I.J., Guerenstein, P.G., 2014. Morphology and
529 physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J. Physiol. Paris.*
530 doi:10.1016/j.jphysparis.2014.04.006
- 531 28. Hanson, B., Christensen, T.A., 1999. Functional characteristics of the antennal
532 lobe, in: *Insect Olfaction*. B.S. Hansson, Berlin, pp. 126–157.
- 533 29. Lockwood, J.A., Sparks, T.C., Story, R.N., 1984. Evolution of Insect Resistance to
534 Insecticides: A Reevaluation of the Roles of Physiology and Behavior. *Bull. ESA* 30,
535 41–51.
- 536 30. Malima, R.C., Oxborough, R.M., Tungu, P.K., Maxwell, C., Lyimo, I., Mwingira,
537 V., Masha, F.W., Matowo, J., Magesa, S.M., Rowland, M.W., 2009. Behavioural and
538 insecticidal effects of organophosphate-, carbamate- and pyrethroid-treated
539 mosquito nets against African malaria vectors. *Med. Vet. Entomol.* 23, 317–325.
- 540 31. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B.,
541 Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D., 1998. Molecular

- 542 characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria
543 vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7, 179–184. doi:10.1046/j.1365-
544 2583.1998.72062.x
- 545 32. Moiroux, N., Gomez, M.B., Pennetier, C., Elanga, E., Djènontin, A., Chandre, F.,
546 Djègbé, I., Guis, H., Corbel, V., 2012. Changes in *Anopheles funestus* Biting
547 Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in
548 Benin. *J. Infect. Dis.*
- 549 33. Ndiath, M.O., Mazenot, C., Sokhna, C., Trape, J.-F., 2014. How the Malaria Vector
550 *Anopheles gambiae* Adapts to the Use of Insecticide-Treated Nets by African
551 Populations. *PloS One* 9.
- 552 34. N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbeto, M., Rowland, M., 2007. Reduced efficacy of
553 insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in
554 pyrethroid resistance area, Benin. *Emergent Infect. Dis.* 13, 199–206.
- 555 35. Platt, N., Kwiatkowska, R.M., Irving, H., Diabaté, A., Dabire, R., Wondji, C.S.,
556 2015. Target-site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic
557 resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector
558 *Anopheles gambiae*. *Heredity* 115, 243–252. doi:10.1038/hdy.2015.33
- 559 36. Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., Corbel, V., 2011.
560 Pyrethroid resistance in African Anopheline mosquitoes: what are the
561 implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 27, 91–98.
- 562 37. R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R
563 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 564 38. Sachse, S., Krieger, J., 2011. Olfaction in insects: The primary processes of odor
565 recognition and coding. *E-Neuroforum* 2, 49–60. doi:10.1007/s13295-011-0020-7
- 566 39. Sauphanor, B., Franck, P., Lasnier, T., Toubon, J.-F., Beslay, D., Boivin, T.,
567 Bouvier, J.-C., Renou, M., 2007. Insecticide resistance may enhance the response
568 to a host-plant volatile kairomone for the codling moth, *Cydia pomonella* (L.).
569 *Naturwissenschaften* 94, 449–458. doi:10.1007/s00114-007-0222-6
- 570 40. Spitzen, J., Ponzio, C., Koenraadt, C.J.M., Jamet, H.V.P., Takken, W., 2014.
571 Absence of Close-Range Excitorepellent Effects in Malaria Mosquitoes Exposed to

- 572 Deltamethrin-Treated Bed Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 1124–1132.
573 doi:10.4269/ajtmh.13-0755
- 574 41. Takken, W., Knols, B.G.J., Otten, H., 1997. Interactions between physical and
575 olfactory cues in the host seeking behaviour of mosquitoes: the role of relative
576 humidity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 119–120. doi:10.1080/00034989761427
- 577 42. Turissini, D.A., Gamez, S., White, B.J., 2014. Genome-Wide Patterns of
578 Polymorphism in an Inbred Line of the African Malaria Mosquito *Anopheles*
579 *gambiae*. *Genome Biol. Evol.* 6, 3094–3104. doi:10.1093/gbe/evu243
- 580 43. Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W.,
581 Usherwood, P.N., Cohen, C.J., 2000. Activation of *Drosophila* sodium channels
582 promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-
583 down resistance mutations. *J. Gen. Physiol.* 115, 305–318.
- 584 44. Wicher, D., 2015. Olfactory signaling in insects. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 130,
585 37–54. doi:10.1016/bs.pmbts.2014.11.002
- 586 45. Zaim, M., Aitio, A., Nakashima, N., 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito
587 nets. *Med. Vet. Entomol.* 14, 1–5.

588

589

590

591

592

593

594

595

596 **Tables**

597 **Table 1:** Description of the experiments (UTN: untreated net, ITN: insecticide-
598 treated net)

Experiment no.	Experiment name	Odour source	Treatment box 1	Treatment box 2
1	Empty	None	Empty	Empty
2	Rabbit alone	Rabbit	Empty	Empty
3	Rabbit + UTN	Rabbit	Empty	UTN
			UTN	Empty
4	Rabbit + ITN	Rabbit	ITN	UTN
			UTN	ITN

599

600 **Table 2:** Number of releases performed per genotype and experiment (UTN:
601 Untreated net, ITN: Insecticide-treated net)

<i>Experiment</i>	<i>SS</i>	<i>RS</i>	<i>RR</i>	<i>Total</i>
1 - Empty	19	9	19	47
2 - Rabbit alone	20	10	19	49
3 - Rabbit + UTN	34	18	32	84
4 - Rabbit + ITN	40	20	38	98
Total	113	57	108	278

602

603 **Table 3:** Results of the generalized linear model for treatment comparisons in each
 604 genotype. We compared mosquito progress first when the rabbit was added as an
 605 odour source (vs. no odour) and then when ITN was present (vs. UTN). ***p < 0.0001,
 606 **p ≤ 0.001, *p ≤ 0.01, ns: not significant. UTN: untreated net, ITN: insecticide-treated
 607 net. OR: Odds-ratio.

608

609

610

Behaviour indicator	Experiment (see Table 1)	Mosquito genotype	OR [95%CI]	p-value
Upwind flight	Rabbit +/- UTN (2 and 3) vs Empty (1)	SS	1.09 [0.87, 1.37]	ns
		RS	1.27 [0.91, 1.77]	ns
		RR	1.08 [0.85, 1.37]	ns
	Rabbit+ITN (4) vs Rabbit -/+ UTN (2 and 3)	SS	1.02 [0.85, 1.21]	ns
		RS	1.05 [0.82, 1.34]	ns
		RR	1.12 [0.94, 1.35]	ns
Localisation	Rabbit +/- UTN (2 and 3) vs Empty (1)	SS	2.63 [1.67, 4.15]	***
		RS	1.96 [1.14, 3.36]	*
		RR	4.63 [2.67, 8.02]	***
	Rabbit+ITN (4) vs Rabbit -/+ UTN (2 and 3)	SS	1.3 [0.99, 1.69]	ns
		RS	1.01 [0.72, 1.42]	ns
		RR	1.01 [0.76, 1.33]	ns

Figures

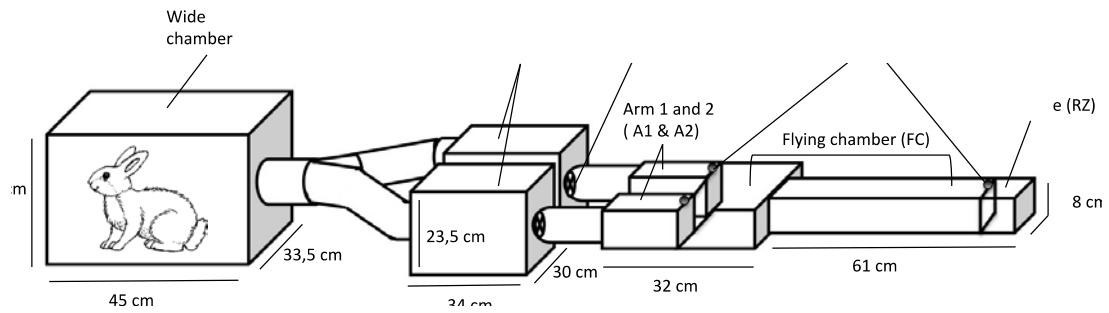


Figure 1: Experimental set-up.

Dual-choice olfactometer (right side) connected to the treatment boxes (middle) and the wide chamber

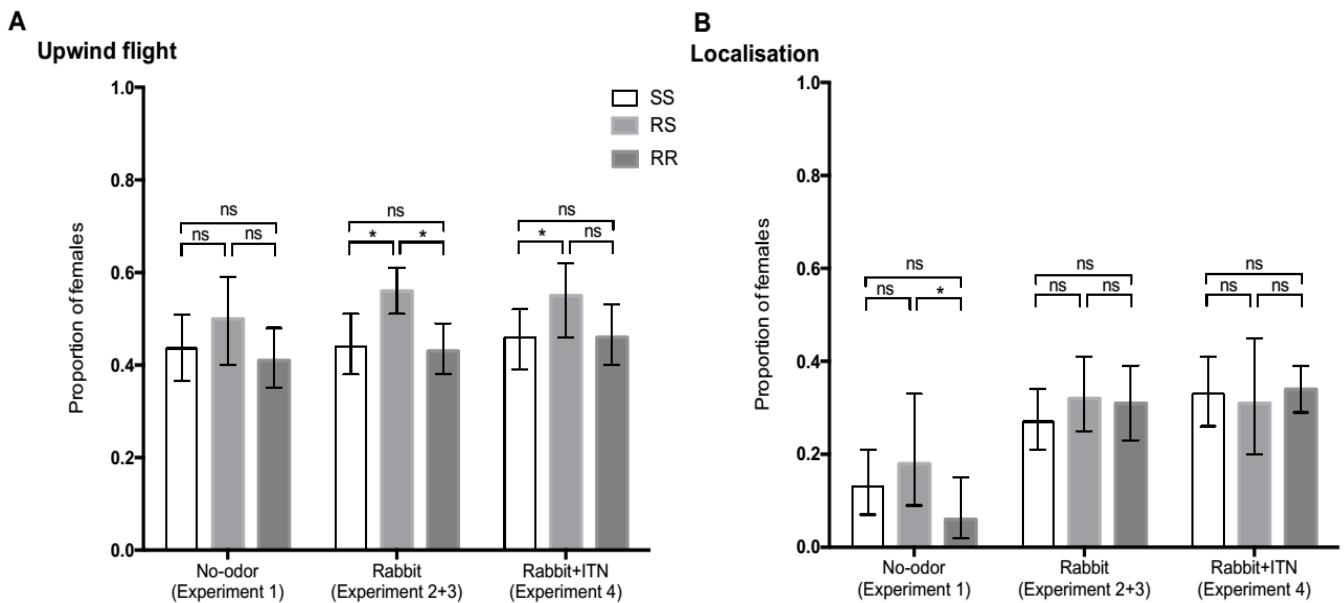


Figure 2: Upwind flight and localisation indicators for the three genotypes in relation to treatment (Mean±95% Confidence Interval). ***p<0.001, **p≤0.01, *p≤0.05, ns= not significant.

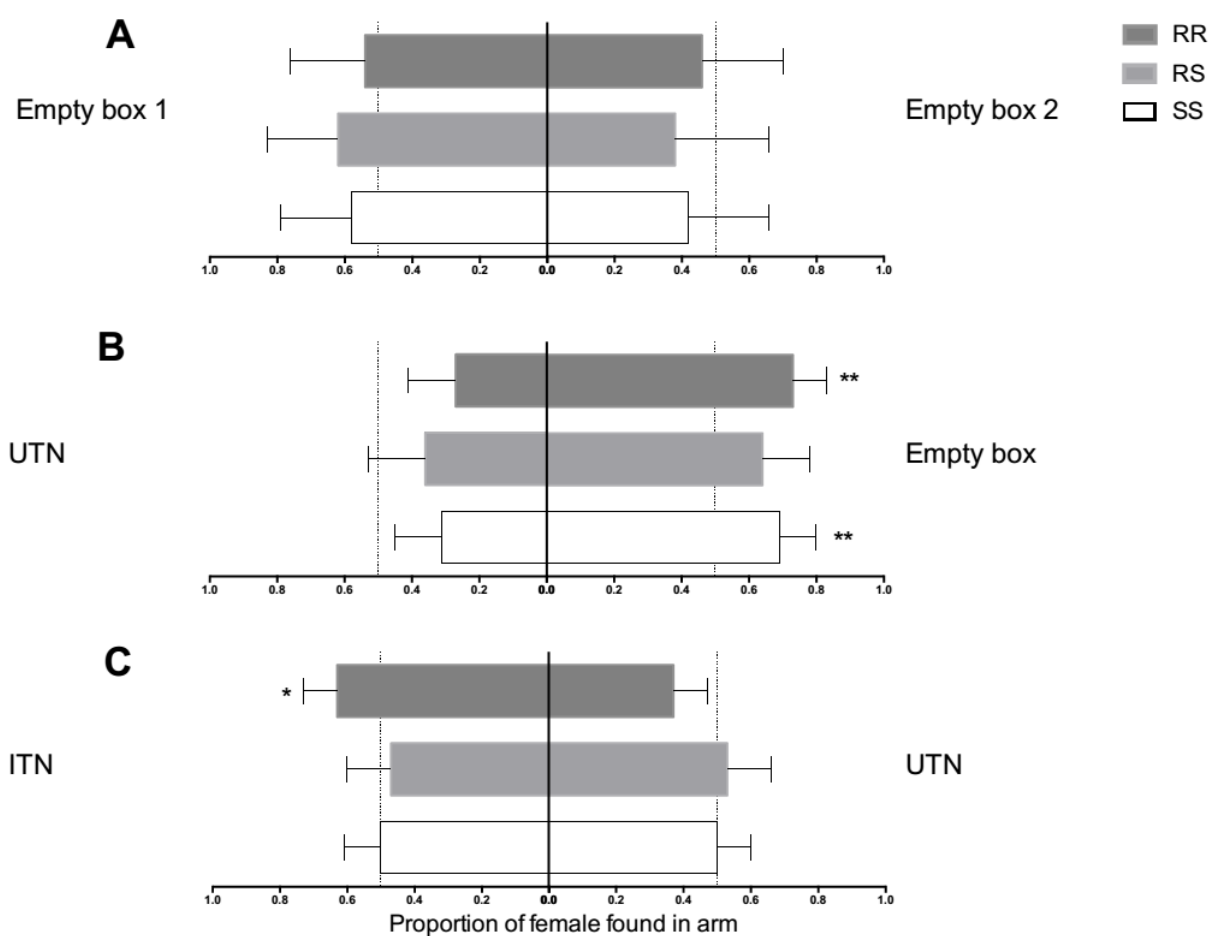


Figure 3: Relative attractiveness rates

RA: number of mosquitoes found in one arm relative to the total number of mosquitoes found in both arms. (A) Experiment 2 (rabbit only). (B) Experiment 3 (rabbit + UTN or empty box). (C) Experiment 4 (Rabbit+ UTN or ITN). Asterisks show difference to 0.5, traducing a choice for one treatment rather than the other. Error bars show the 95% CI; ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$. UTN: Untreated net, ITN: Insecticide-treated net. SS: homozygote for the L1014S allele (insecticide-susceptible), RS: heterozygous for the L1014F allele, RR: homozygous for L1014F allele (insecticide-resistant).

Supporting information

S1-Effect of treatment on environmental variables

When there is only rabbit in the set up, there was no difference between arms for CO₂ (mean=665.2 ppm, Wilcox test, p=0.055) and relative humidity (%RH) (mean= 61.94%, Wilcox test, p= 0.336). For R-UTN vs R-O combination, there was no significant difference in term of CO₂ concentration between the two arms (meanR-O= 636.7ppm and meanR-UTN= 638.7ppm, t-test, p=0.712). For relative humidity (%HR), there was a significative difference between the two arms (meanR-O= 64.95% and meanR-UTN=63.92%, t-test, p=0.0007). For R-UTN vs R-ITN combination, there was no significant difference between treatments for CO₂ concentration (meanR-UTN= 669.7ppm, meanR-ITN= 660.9ppm, Wilcox.test, p=0.51) and for relative humidity (meanR-UTN= 65.1%, meanR-ITN=64.81%, Wilcox.test, p=0.15). These environmental variables was correlated positively with experimental days, thus their effect on behavioural responses were integrated in our statistical analysis as random effect by day term.

Table S1: Effect of treatment on CO₂ and Relative Humidity (RH) in the two arms.

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, ns= not significant.

Treatment	Environmental variable	significativity
Empty	CO ₂	ns
	HR	ns
Rabbit alone	CO ₂	ns
	HR	ns
Rabbit+UTN	CO ₂	ns
	HR	**
Rabbit+ITN	CO ₂	ns
	HR	ns

Chapitre III. Réponse comportementale d'*Anopheles gambiae* au contact d'un matériel traité d'insecticide²

² Behavioral cost & overdominance in *Anopheles gambiae*

Malal M. DIOP, Nicolas MOIROUX, Fabrice CHANDRE, Hadrien MARTIN-HERROU, Pascal MILESI, Olayidé BOUSSARI, Angélique PORCIANI, Stéphane DUCHON, Pierrick LABBÉ, Cédric PENNETIER (2015). PLoS ONE 10(4): e0121755. doi:10.1371/journal.pone.0121755
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121755>

Résumé

Différentes étapes constituent la séquence comportementale qui conduit à la localisation d'un hôte humain (activation, orientation, choix de l'hôte et du site de piqûre). Dans l'expérience précédente, nous avons observé que le comportement de recherche l'hôte est modifié à distance par un support traité d'insecticide en relation avec le génotype pour le locus *kdr*. Lorsque l'hôte humain est protégé par une moustiquaire imprégnée, une étape vient s'ajouter à la séquence comportementale classique : la recherche d'une faille (un trou) dans cette barrière physico-chimique afin d'atteindre l'hôte pour un repas de sang. Lors de cette phase de recherche de l'hôte sous MILD, les moustiques s'exposent à des doses d'insecticides qui modulent le comportement au niveau de la moustiquaire. Une étude au laboratoire a montré que la résistance aux insecticides permet aux moustiques résistants de rester plus longtemps sur des surfaces traitées (Chandre *et al.* 2000). Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au comportement de vol des moustiques à proximité d'un morceau de moustiquaire et à leur capacité à localiser un trou sur cette moustiquaire en relation avec le génotype pour le locus *kdr*.

Méthodologie

Pour ce faire, nous avons mis en place un tunnel sous enregistrement vidéo automatisé. L'étude a porté sur le comportement de trois génotypes d'*An. gambiae* à fond génétique commun : SS (homozygotes sensibles aux pyréthrinoïdes), RS (hétérozygotes pour le gène *kdr*) et RR (homozygotes résistants pour le gène *kdr*) face à un morceau de moustiquaire trouée qui les sépare d'un cobaye (cochon d'Inde) comme source d'odeur. Nous avons enregistré et analysé les déplacements des moustiques dans l'objectif de :

- d'étudier la capacité des trois génotypes d'*An. gambiae* à trouver un trou (1 cm de diamètre) sur un filet moustiquaire traitée d'insecticide
- étudier les différentes variables comportementales pour les trois génotypes d'*An. gambiae* au contact avec filet moustiquaire traitée d'insecticide

Résultats & Discussion

Nous avons d'abord comparé la capacité des trois génotypes d'*An. gambiae* à trouver un trou sur un morceau de moustiquaire non traitée. Les moustiques résistants (RR) ont été les moins performants comparés aux moustiques homozygotes sensibles (SS) et hétérozygotes (RS). Une analyse des paramètres comportementaux dans le tunnel a montré que l'activité des moustiques RR était moins importante avec notamment un nombre de contact avec le filet non traité, un temps en vol qui étaient plus faibles que les autres génotypes. Ceci reflète un coût comportemental de la mutation *kdr* sur le comportement d'*An gambiae*. La mutation *kdr* se localise au niveau du canal sodium voltage dépendant qui joue un rôle central dans la propagation du signal nerveux. Il est probable qu'un tel comportement soit associé à une modification de l'activité électrique du canal sodium. D'où la nécessité de poursuivre les travaux pour étudier les mécanismes sous-jacents à ce type de comportement.

Face aux filets de moustiquaire traitée aux pyréthrinoïdes (perméthrine et deltaméthrine), les moustiques hétérozygotes (RS) ont été les plus performants à trouver un trou afin d'atteindre le cobaye comparé aux homozygotes sensibles et résistants. Ceci constitue un avantage des individus hétérozygotes dans la phase de recherche d'un hôte protégé par une moustiquaire. Ce résultat est un cas de sélection rarement observé appelé superdominance. Cette performance des individus hétérozygotes semble être associée à des pressions de sélection antagonistes qui sont discutées dans l'article.

Conclusion

Nos résultats ont d'abord montré une remarquable capacité des moustiques sensibles et résistants à localiser le trou sur le filet de moustiquaire dans notre système expérimental. Il serait intéressant de s'intéresser à cette question en conditions semi-naturelles en cases pièges par exemple. Cette étude a permis de mettre en évidence un coût du gène *kdr* sur un trait comportemental et un avantage sélectif des hétérozygotes (RS) à trouver un trou sur un filet traité aux pyréthrinoïdes.

Comportement et capacité à trouver une faille sur une moustiquaire

Ces résultats ouvrent des perspectives dans l'étude du comportement des vecteurs dans un contexte de lutte antivectorielle, la gestion de la résistance ainsi que sur la dynamique évolutive des gènes de résistance sur le terrain, qui seront autant d'informations importantes pour le développement de méthode de gestion de la résistance.

.

Behavioral cost & overdominance in *Anopheles gambiae*

Malal M. DIOP^{1,2}, Nicolas MOIROUX³, Fabrice CHANDRE³, Hadrien MARTIN-HERROU³,
Pascal MILESI⁴, Olayidé BOUSSARI^{1,2}, Angélique PORCIANI^{1,2}, Stéphane DUCHON³,
Pierrick LABBÉ⁴, Cédric PENNETIER^{1,2}

¹ MiVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cotonou, Bénin

² Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Bénin.

³ MiVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

⁴ ISEM (CNRS 5554-UM2), Montpellier, France

Contact & correspondence: Cédric Pennetier; cedric.pennetier@ird.fr;
+22994769663

Key-words: heterozygote advantage, balanced selection, genetic cost, insecticide resistance, *Anopheles gambiae*

Abstract

In response to the widespread use of control strategies such as Insecticide Treated Nets (ITN), *Anopheles* mosquitoes have evolved various resistance mechanisms. *Kdr* is a mutation that provides physiological resistance to the pyrethroid insecticides family (PYR). In the present study, we investigated the effect of the *kdr* mutation on the ability of female *An. gambiae* to locate and penetrate a 1cm-diameter hole in a piece of netting, either treated with insecticide or untreated, to reach a bait in a wind tunnel. *kdr* homozygous, PYR-resistant mosquitoes were the least efficient at penetrating an untreated damaged net, with about 51% [39-63] success rate compared to 80% [70-90] and 78% [65-91] for homozygous susceptible and heterozygous respectively. This reduced efficiency, likely due to reduced host-seeking activity, as revealed by mosquito video-tracking, is evidence of a recessive behavioral cost of the mutation. *Kdr* heterozygous mosquitoes were the most efficient at penetrating nets treated with PYR insecticide, thus providing evidence for overdominance, the rarely-described case of heterozygote advantage conveyed by a single locus. The study also highlights the remarkable capacity of female mosquitoes, whether PYR-resistant or not, to locate holes in bed-nets.

Introduction

In an attempt to separate the hungry malaria mosquito female from its human host, a physical and chemical barrier was introduced: the PYR ITN (Lehane 2005; WHO 2013a). The on-going extensive distribution of ITNs aims to reach universal coverage in endemic countries (WHO 2013a). Because ITNs are so effective at killing mosquitoes, and because ITNs can only be treated with PYRs, specific responses have evolved in mosquito populations to confer either behavioral or physiological insecticide resistance to these chemicals (Lefevre *et al.* 2009; Rivero *et al.* 2010; Ranson *et al.* 2011; Moiroux *et al.* 2012; Gatton *et al.* 2013). The most widespread physiological PYR-resistance mechanism among mosquito vectors is the target-site L1014F mutation of the voltage-gated sodium channel gene, named *kdr* mutation. The mutated form decreases the affinity between the PYR molecule and the voltage-gated sodium channel, leading to a resistance phenotype that allows mosquito to survive

contact with ITN (Hougard *et al.* 2003; Ranson *et al.* 2011). The impact of this mutation on the host-seeking behavior of mosquito vectors has been largely overlooked. One especially important component of host-seeking behavior, particularly in the context of widespread ITN use, is the mosquitoes' ability to locate and penetrate weaknesses- i.e., holes- in damaged bed nets in order to reach the human host and be able to reproduce.

We thus investigated how genotype at the *kdr*L1014F locus (hereafter indicated as SS = susceptible homozygotes; RR = resistant homozygotes; RS = heterozygotes) affected the ability of *An. gambiae s.s* females to find a hole in a piece of net (either untreated or treated). Females sharing the same genetic background with only the *kdr* locus altered (Alout *et al.* 2013) were individually video-tracked in a wind tunnel containing an attractive odor plume orientating the mosquitoes toward a guinea pig bait. The wind tunnel consisted of two chambers separated by a holed net (Figure S1). Trials were recorded as successful if the mosquito passed through the hole from the first chamber (C1) to the second chamber (C2) within a 60 min assay.

Results

A first, surprising result was that almost two-thirds of mosquitoes found the 1cm diameter hole that would have allowed them to reach their blood meal (overall success rate = 62.6%, N= 376/601, binomial 95% confidence interval CI [58.6-66.3]) in a mean time of 666.0s [588.8-742.5] (Fig S2 panel f), regardless of the net treatment or the genotype. However, the *kdr* genotype had a major effect on this success.

Cost of the homozygous resistant genotype for the *kdr* locus

With an untreated holed net (UTN), the proportion of successful mosquitoes was significantly higher for both SS and RS genotypes compared to RR (binomial model odds ratios: OR_{SS-RR}= 3.75 [1.74-8.44], p= 0.0009; OR_{RS-RR}= 3.23 [1.36-8.23], p= 0.0102), while not differing significantly from each other (OR_{RS-SS}= 1.16 [0.43-3.01], p= 0.75) (Figure 1A, left panel). The lower performance of the mutant homozygotes in the untreated net environment thus revealed a recessive behavioral cost of the *kdr* mutation.

Comportement et capacité à trouver une faille sur une moustiquaire

Analysis of behavioral traits from video tracks with untreated nets indicated that *An. gambiae* mosquitoes with the RR genotype spent less time flying than those with SS (Kruskal-Wallis rank sum test, $p=0.0016$; Dunn's post tests, $p<0.01$), and had fewer rates of contact with the holed net compared to both the SS and RS genotypes (Poisson model Contact Rate Ratio: $CRR_{RR-SS}=0.261$ [0.245 - 0.278], $p<0.0001$ and $CRR_{RR-RS}=0.187$ [0.176 - 0.2], $p<0.0001$) (Figure S2). This suggests less efficient host-seeking behavior of RR mosquitoes relative to the SS and RS types. RR mosquitoes mean flight speed was higher than that of either SS or RS mosquitoes (Kruskal-Wallis rank sum test, $p<0.0001$; Dunn's post tests, $p<0.01$) (Figure S2). Mosquito flight speed has been shown to be negatively correlated with attractive odor concentration (Beeuwkes *et al.* 2008; Lacey & Cardé 2011; Spitzen *et al.* 2013), so that higher flight speed might be an indication of less efficient odor detection in RR compared with RS and SS mosquitoes. SS and RS mosquitoes showed similar rates of success in penetrating the net, despite significant differences in the various behavioral traits (Figures S2 panels A and C).

Overdominance of *kdr* mutation under PYR pressure

The behavior of the three *kdr* different genotypes was then analyzed in presence of the two long lasting ITN recommended by the World Health Organization. One type (Olyset Net) has 1000mg/m² permethrin incorporated into it, whilst the other (PermaNet 2.0) is coated with 55mg/m² deltamethrin.

Faced with the PermaNet 2.0 net, heterozygote mosquitoes tended to be more successful in finding the hole than either of the homozygotes (Figure 1A, right panel), although these differences were not statistically significant ($OR_{RS-SS}=1.97$ [0.92-4.43], $p=0.088$; $OR_{RS-RR}=1.52$ [0.68-3.49], $p=0.315$). This trend was reinforced (Figure 1A, centre panel) and differences were significant when mosquitoes were faced with the Olyset Net (binomial regression, $OR_{RS-SS}=2.85$ [1.36, 6.24], $p=0.007$; $OR_{RS-RR}=2.47$ [1.17-5.43], $p=0.02$). Heterozygote mosquitoes were better able to penetrate the net than homozygous susceptible or resistant mosquitoes, regardless the net brand (when pooling data gathered with Olyset and PermaNet 2.0; $OR_{RS-SS}=2.13$ [1.30, 3.49], $p=0.0027$; $OR_{RS-RR}=2.42$ [1.47, 4], $p=0.0005$), supporting the heterozygote advantage hypothesis. There was no significant difference between homozygous susceptible or

resistant mosquitoes regardless the ITN brand (Olyset: $OR_{RR-SS}=1.15$ [0.63 2.11], $p=0.64$; PermaNet 2.0: $OR_{RR-SS}=1.30$ [0.70 2.45], $p=0.41$) (Figure 1A, center and right panels).

To further quantify this heterozygote advantage, we computed the proportion of success p_i as a proxy of the relative fitness (w_i) of each genotype i for each treatment, as $w_i = p_i/p_{SS}$ (thus $w_{SS} = 1$, as reference). Moreover, by decomposing the relative fitness as $w_{SS} = 1$, $w_{RS} = 1+hs$ and $w_{RR} = 1+s$, we were able to estimate selection (s) and dominance (h) coefficients in the different treatments. We confirmed that in the absence of PYR the R allele is deleterious ($s = -0.35$, 95% confidence interval [-0.18, -0.49]), and that this cost is recessive ($h = 0.09$ [0.01, 0.68]). However, R is advantageous in an environment with ITNs ($s = 0.07$ [0.001, 0.43] and 0.11 [0.001, 0.40] for Olyset and PermaNet 2.0, respectively). Furthermore, in ITN trials, we always found a dominance coefficient $h > 1$, confirming the observed heterozygote advantage, although quantifying this parameter precisely is more difficult: $h = 6.72$ [1.33, >100] and 2.42 [0.001, >100], for Olyset and PermaNet 2.0, respectively.

The better performances of the heterozygotes during the experiments are explained by two antagonistic forces of selection:

(i) Benefit of R allele in presence of insecticide

SS females failed to find the hole because of the fast-acting knock-down (KD) effect of the PYR insecticides: 97.7% [85.3-99.9] (43/44) and 97.4% [83.2-99.9] (37/38) of the failed SS mosquitoes were KD with Olyset Net and PermaNet 2.0 respectively (Figure 1B, multinomial model $OR_{PermaNet-Olyset} = 0.861$ [0.052-14.269], $p=0.917$). By contrast, almost all of the unsuccessful RR mosquitoes had resisted the KD effect (KD 5.1% [0-18.6] (2/39) and 7.4% [0.04-25.7] (2/27) with Olyset Net and PermaNet 2.0, respectively) (Figure 1B, $OR_{PermaNet-Olyset} = 1.483$ [0.196-11.242], $p=0.703$). For heterozygotes, the result depended on the net: less than half of the failed RS were KD with permethrin-treated Olyset Net (46.2% [17.7-73.9], 6/13), while they were more affected by the deltamethrin-treated PermaNet 2.0 (91.7% [56.1-99.6], 11/12) (Figure 1B, $OR_{PermaNet-Olyset} = 12.911$ [1.264-131.878], $p=0.031$). This

difference may be due to the difference in insecticide molecule, concentration and/or availability on the net fiber.

(ii) Cost of RR in absence of insecticide.

Because of the cost carried by RR mosquitoes, SS and RS mosquitoes showed higher success rates in penetrating a 1cm hole in an untreated net (Figure 1A). Moreover, the performance of RS and RR mosquitoes in finding the hole were not altered by the insecticides (binomial model, $p > 0.05$), while SS mosquitoes' success rate was indeed reduced by 30% [14.5-45.5] and 21.8% [6.8-36.7] with Olyset Net and PermaNet, respectively (binomial model, $OR_{UTN-Olyset} = 4$ [1.96-8.61], $p < 0.001$; $OR_{UTN-PermaNet} = 2.87$ [1.4-6.16], $p = 0.005$) (Figure 1A).

Overall, the balance between the two antagonistic selection pressures, a negative influence of *kdr* mutation on individuals' ability to find the hole on one hand, and the benefit for resistance to KD on the other, was most favorable to heterozygotes, providing evidence for an overdominant effect at the *kdr* locus on this behavioral trait.

Discussion

Insecticide resistance mechanisms are adaptations selected by challenging environmental conditions. The *kdr* mutation is an example of a specific amino acid change at a unique position of the voltage-gated sodium channel that confers resistance to organochlorine and PYR insecticide classes in a major malaria vector in Africa, *Anopheles gambiae s.l.* (Raymond-Delpech *et al.* 2005). PYR pressure can affect the mosquitoes at different stages of their life cycle: larva (contaminated breeding sites) and adult, both during resting (insecticide residual spraying) and host-seeking (ITN) periods. At these different stages, the *kdr* mutation can allow survival, and thus reproduction, in presence of insecticides (selective advantages). However, it also imposes deleterious side-effects (selective costs), revealed in absence of insecticides. Conventional tests used to evaluate the insecticide effects on susceptible and resistant mosquitoes rely on forced and prolonged contact of the mosquitoes with the insecticide (WHO 2013b). The results of these tests summarize the selection processes

occurring at both the larval and adult stages of the mosquito's life and are meant to reflect the levels of resistance in the local mosquito population. Because of the higher resistance of the RR genotype, and if the mutation induces no fitness cost, prolonged insecticide selection in a population should lead to fixation of the *kdr* mutation beyond the treated population (Chandre *et al.* 2000). However, as pointed out by Lynd *et al.* (Lynd *et al.* 2010), there is a serious lack of evidence of *kdr* mutation fixation in wild *Anopheles* populations, even in areas with high insecticide pressure (either from agriculture or from public health programs). Thus, they hypothesized that a fitness cost associated with the *kdr* mutation explained the absence of fixation (Lynd *et al.* 2010). Such costs have been documented in *Culex quinquefasciatus* (through life history trait experiments) (Berticat *et al.* 2008), however, none have been reported so far in *An. gambiae*. Interestingly, Lynd *et al.* (Lynd *et al.* 2010) also suggested that the balance of advantages and costs could lead to overdominance, in which case the heterozygotes would be fitter than the SS and RR homozygotes (Fisher 1922; Asthana, Schmidt & Sunyaev 2005; Andrés *et al.* 2009; Hedrick 2012).

Our study provides the first evidence of a behavioural cost associated with the *kdr* allele that conveys pyrethroid and DDT resistance in *An. gambiae*. Importantly, this evidence comes from an experimental set-up in which mosquito contacts with insecticide were unforced, and thus could be interrupted, similar to the situation in natural settings.

We first noted that the host-seeking performance was reduced in females homozygous for the resistance *kdr* allele (RR) in the absence of insecticide. The RR females are less apt at finding the hole in the net to reach their blood meal. This is the first evidence of behavioral costs associated with this mutation. It suggests a deficiency in the nervous system of RR females. The voltage-gated sodium channel indeed plays a central role in message propagation in the nervous system. The *kdr* mutation enhances closed-state inactivation of nerves, meaning that more stimulation is required before nerves fire and release acetylcholine into the synaptic cleft, relative to susceptible individuals (Vais *et al.* 2000). Consequently, the *kdr* mutation probably affects several behavior-related nervous pathways (Ignell *et al.*

2010). In *kdr* resistant *Heliothis virescens* moths, pharmacological and biophysical properties of sodium channels were found to cause sluggish neural activity in the absence of PYR, and were characterized by decreased cellular and behavioral excitability of sodium channels (Lee *et al.* 1999). Further physiological and behavioral investigations are underway to better understand the physiological processes underlying the behavioral changes we report here.

A second finding is that, while still partially resistant to the insecticide, the heterozygous females are not affected by the cost observed in RR females. This is evidence for heterosis, or hybrid vigor, in which the product of a cross is superior to either parent (Lippman & Zamir 2007). One of the modalities of heterosis is overdominance, the superior fitness of the heterozygous genotype over both homozygotes (Haldane 1949), though reports suggesting heterozygote advantage for single gene mutations are rare and controversial. Interestingly, the majority of the few examples came from the study of resistance to infectious diseases, such as the major histocompatibility complex in vertebrates; in insects, one of the best examples is the alcohol dehydrogenase (*Adh*) locus in *Drosophila melanogaster* (Hedrick 2012). Studying contemporaneous heterozygote advantage implies fulfillment of three criteria: i) identifying genes under selection, ii) establishing relative fitness and iii) understanding the selection mechanism (Hedrick 2012). The present study fulfills these criteria and, thus, provides an unambiguous new example of overdominance. A single substitution in the gene encoding the voltage-gated sodium channel (*kdr*) indeed provides heterozygotes with resistance to the KD effect of PYR higher than susceptible homozygotes SS, while imposing little cost, if any, as compared to the decreased host-seeking success seen in resistant homozygotes RR. Compared to the homozygotes, the RS genotype maintains a better balance between the antagonistic selective pressures to survive insecticide exposure while performing a complex behavior.

Interestingly, overdominance is favorable for the evolution of new resistance alleles in the form of heterozygote duplications (i.e. duplications in which the duplicates are different alleles (Haldane 1932; Spofford 1969; Labbé *et al.* 2014)). An advantageous

heterozygous genotype bears a segregation cost, as only half of two heterozygotes' progeny will bear this fitter genotype. A duplication associating both alleles on the same chromosome would allow this advantageous genotype to fix by eliminating this segregation cost. A similar heterosis situation is probably responsible for the selection of duplications of the *ace-1* gene (encoding the target of organophosphorous insecticides) in both *Cx. pipiens* and *An. gambiae* (Labbé *et al.* 2007; Labbe *et al.* 2007; Djogbénou *et al.* 2008, 2009). With one susceptible and one resistance allele in tandem on the same chromosome, individuals with the duplication have fitness similar to that of heterozygotes (resistance and reduced cost (Labbé *et al.* 2014)); such duplication allows the fixation of this heterozygote advantage in a population (Labbe *et al.* 2007). The overdominance at the *kdr* locus thus provides ground for similar evolution. Interestingly, a study of *An. gambiae kdr* resistance by Pinto *et al.* (Pinto *et al.* 2006) in Gabon showed a significant excess of the heterozygote genotype, which could be a sign of the presence of gene duplication for *kdr*, as was shown in the case of *ace-1* (Lenormand *et al.* 1998; Labbe *et al.* 2007; Djogbénou *et al.* 2009).

In a more applied perspective, our work highlights the overall high performance of all genotypes in the trials: our results confirmed the remarkable ability of both susceptible and resistant mosquitoes to find the only way through a bednet. These observations are in agreement with previous experimental hut studies on the blood feeding rates of *An. gambiae* (see review (Strode *et al.* 2014)). The *kdr* resistance currently at high frequencies across much of Africa is only one of the mechanisms conferring resistance to insecticides. The impact of such insecticide resistance mechanisms on behavior and/or infection by *Plasmodium spp.* is of crucial interest (Alout *et al.* 2013, 2014a; b). A multi-disciplinary approach is needed to study in depth the complex interactions among mosquito behavior, parasite infection and human-made insecticidal barriers, with the objective of designing innovative tools that can more specifically target resistant and infectious mosquitoes (Hemingway 2014; Vontas *et al.* 2014).

Our study highlights the importance of behavioral studies for developing a full understanding of the evolution of insecticide resistance and its impacts. By

modulating host-seeking behavior, insecticide resistance can affect the vectorial capacity of female mosquitoes. Given the ability of heterozygous mosquitoes in particular to readily overcome the barrier of a damaged ITN, the effects of insecticide resistance on host choice and biting behavior remain to be investigated.

Experimental procedures

Mosquito strains and rearing:

PYR insecticides target the voltage-gated sodium channel on the insects' neurons. Non-synonymous mutations in this target site that cause resistance to insecticides are often referred to as knock-down resistance mutations (*kdr*). These alleles confer the ability to survive prolonged exposure to insecticides without being 'knocked-down' (Ranson *et al.* 2011). The substitution of a leucine by a phenylalanine at codon 1014 (L1014F) is the most common sodium channel mutation, associated with PYR resistance in African malaria vectors (Martinez-Torres *et al.* 1998).

Two strains of *An. gambiae* were used. One is the insecticide susceptible strain Kisumu (VectorBase, <http://www.vectorbase.org>, KISUMU1), isolated in Kenya in 1975. This strain is susceptible and homozygous (SS) for the L1014 codon. The second strain named *Kdrkis* is resistant to PYR and homozygous (RR) for the L1014F *kdr* mutation. *Kdrkis* was obtained by introgression of the L1014F mutation into the Kisumu genome through repeated backcrosses (Alout *et al.* 2013). Heterozygous individuals (RS) were obtained through more than 15 crosses of Kisumu SS females with *Kdrkis* RR males. The three genotypes thus share a common genetic background for most of their genome (Alout *et al.* 2013).

The genotype of both susceptible and resistant strains are confirmed every 3 months by PCR following standard operational procedures of a WHO collaborating centre. For the present study, Kisumu and *Kdrkis* strains were checked by PCR (for the *kdr* and *ace-1* mutations) before the beginning of the behavioral assays (July 2012) and after the end of the study (May 2013) confirming that both strains were respectively homozygous susceptible and resistant for *kdr*.

The mosquitoes were reared at 27 ± 1 °C, 60-70% R.H. under 16:8h L:D photoperiod at the insectaries of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) in Montpellier, France. Adults were fed with a 10% glucose solution and received a blood meal twice a week. Gravid females laid eggs on cups placed inside mesh-covered cages. Eggs were dispensed into plastic trays containing de-ionized water. Larvae were kept in these trays and fed with TetraMin fish food. Pupae were removed daily and allowed to emerge inside 50x50x50cm cages. Adult females used to generate these lines were fed with rabbit blood.

Mosquitoes used in the experiments were 7-8 days old females that had never received a blood meal and were deprived of sugar the night before testing. The temperature of the experimental room was maintained at 27 ± 1 °C and 60-70% R.H.

Experimental setup:

Experiments were conducted in a wind tunnel (40x13x13cm), divided into two chambers of equal dimensions separated by a piece of netting (treated with insecticide or untreated) with a 1cm diameter hole in its center (HN) (Figure S1). Three types of holed nets were tested in this study: untreated polyester net, Olyset Net (incorporated with 1000mg/m² of permethrin), and PermaNet 2.0 (coated with 55mg/m² of deltamethrin). The chambers (C) were numbered 1 and 2, respectively. The tunnel was made of foam board with a white opaque Plexiglas floor and a removable transparent Plexiglas roof. The ends of the chambers were screened with untreated net (NS) prevented the mosquitoes from escaping. The airflow entered the tunnel *via* a 10 cm diameter circular opening covered with an untreated net screen that acted as a diaphragm to regulate airflow in the tunnel at 16 ± 3 cm.s⁻¹.

The tunnel was softly illuminated by 12 blue LEDs (450nm) from 83cm underneath. Illumination inside the tunnel was $186.66 \cdot 10^{-4}$ mW/cm².

The tunnel was completed by a glass cage (GC; 60x26x26cm), which held the attractive guinea pig bait (able to move in a limited area in the upper part of the cage) and a fan aimed directly down the tunnel.

Comportement et capacité à trouver une faille sur une moustiquaire

Mosquitoes were released individually for each trial. The trial was replicated for each genotype and treatment. In order to get enough replicates for the analysis of the performances, a minimum of 40 mosquitoes successfully passing through the piece of net was required. The number of replicates range from 40 to 91 depending of the treatment and genotype. Each mosquito was filmed during 60 min maximum using a Sony Digital HD Video Camera (HDR-XR550), placed 50cm above the tunnel. The camera was connected to a computer in an external room from where the assay was controlled in real-time. Recording was stopped when the mosquito passed through the hole to chamber 2. MPEG -2 videos (PAL video: 720x576 pixels at 25 frames/s) were analyzed using Ethovision XT software (v.7, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). During the trials, the mosquito was recorded as successful if it passed through the holed net to reach the upwind chamber and unsuccessful otherwise (i.e. it was still in the downwind chamber after the 60 min). Because ITN can induce a fast-acting effect known as Knock-down (KD), unsuccessful mosquitoes were recorded as KD if they were lying on their side or back with none of their tarsi in contact with the floor, or otherwise alive. Moreover, the following behavioral variables were measured in chamber 1 for the assay duration (60min or until the mosquito passed through the hole): (1) time spent on the walls (except the holed net) of chamber 1, (2) time spent on the holed net, (3) number of contacts with the holed net, (4) flight time, (5) mean flight speed, and (6) elapsed time before passing through the hole (if successful).

During the setting-up phase of each experiment, latex gloves were used to avoid any contamination with human skin odors. Mosquitoes were released individually from an opening (1cm diameter) at the downwind extremity of one of the tunnel walls. Cotton was used to plug the hole after releasing.

Statistical analysis:

All statistical analyses were conducted using the software R version 3.0.2 (R Development Core Team) with the additional nnet, pgrmess and spaMM packages (Dum 1964; Giraudoux 2011; Croissant 2012).

Performances:

We analyzed the performance (i.e. probability of passing through the holed net) using a binomial logistic model with *kdr* genotypes (SS, RS or RR), treatments of the holed net (untreated, Olyset Net or PermaNet) and interactions as explanatory variables. The model was written as follow:

$$\text{logit}(P(y = 1)) = \beta_0 + \beta_i^{Genotype} + \beta_k^{Treatment} + \beta_i^{Genotype} \times \beta_k^{Treatment}$$

, where $\beta_i^{Genotype}$ denotes the effect on the logit of classification in category i (SS, RS or RR) of Genotype and $\beta_k^{Treatment}$ denotes the effect of classification in category k (untreated, Olyset Net or PermaNet) of Treatment. Each combination of categories i and k of the explanatory variables was successively used as reference class to allow multiple comparisons among genotypes and treatments. Odds ratios and their 95% confidence intervals were computed. We calculated binomial confidence interval of the proportions of successful mosquitoes using Wilson's score method (Agresti & Coull 1998) with a continuity correction (Yates 1934).

The selection parameters h (for dominance) and s (for selection) determine the proportion p of successful mosquitoes for the different genotypes in each trial, which are estimated by a binomial generalized linear model with predictor $\text{logit}(p) = a_g$ for the three genotypes $g=SS, RS, RR$. h and s are complex functions of the three a_g coefficients. For simplicity, we therefore randomly generated a_{RS} and a_{RR} values (100,000 such pairs in a uniform distribution), and for all such pairs we fitted a_{SS} and plotted the attained likelihood against the corresponding h or s values. The upper boundary of either cloud of points is the profile likelihood for either parameter, from which maximum likelihood estimates and likelihood ratio confidence intervals were computed.

A multinomial logistic model with 3 possible outcomes (successful, unsuccessful alive or unsuccessful KD) was used to compare the proportions of KD relative to the unsuccessful mosquitoes among genotypes and between insecticidal treatments (Olyset Net or PermaNet). The multinomial model allowed us to take into account the proportion of successful mosquitoes in the analysis. Odds ratios and their 95%

confidence interval were computed. We calculated multinomial confidence intervals for the proportions of KD using the method by Sison and Glaz (Sison & Glaz 1995) (R package "MultinomialCI").

Behavioral variables recorded using video analyses:

The number of contacts with the holed untreated net per time unit was compared among genotypes using a Poisson model with the log of the video duration (i.e. the elapsed time before the mosquito passed through the hole and 60min for successful and unsuccessful mosquitoes, respectively) as an offset.

Proportion of flight time, mean flight speed, proportions of time spent on the holed net and on the walls of chamber 1 were not normally distributed and were therefore compared among genotypes using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post-hoc tests (Rousset & Ferdy; Dum 1964).

For successful mosquitoes, the time needed to pass through the hole in the untreated net was also compared among genotypes using a Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post-hoc tests.

Ethical Considerations

The IRD lab where the experiments were run received the approval from the animal care and use committee named "Comité d'éthique pour l'expérimentation animale; Languedoc Roussillon" (CEEA-LR-1064 for guinea pigs and CEEA-LR-13002 for the rabbits).

Acknowledgments

The authors would like to thank François Rousset, Thierry Lefèvre, Claudio Lazzari, Michel Raymond and Adrian J F Luty for their help during the analysis and writing of the manuscript.

References

1. Agresti, A. & Coull, B. (1998) Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *American statistician*, 52, 119–126.

2. Alout, H., Djègbè, I., Chandre, F., Djogbénu, L.S., Dabiré, R.K., Corbel, V. & Cohuet, A. (2014a) Insecticide exposure impacts vector-parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281.
3. Alout, H., Ndam, N.T., Sandeu, M.M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R.K., Djogbénu, L.S., Corbel, V. & Cohuet, A. (2013) Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae s.s* for *Plasmodium falciparum* field isolates (ed J Vontas). *PLoS ONE*, 8, e63849.
4. Alout, H., Yameogo, B., Djogbénu, L.S., Chandre, F., Dabiré, R.K., Corbel, V. & Cohuet, A. (2014 b) Interplay between malaria infection and résistance to insecticides in vector mosquitoes. *Journal of Infectious Diseases*, jiu276.
5. Andrés, A.M., Hubisz, M.J., Indap, A., Torgerson, D.G., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Gutenkunst, R.N., White, T.J., Green, E.D., Bustamante, C.D., Clark, A.G. & Nielsen, R. (2009) Targets of balancing selection in the human genome. *Molecular biology and evolution*, 26, 2755–2764.
6. Asthana, S., Schmidt, S. & Sunyaev, S. (2005) A limited role for balancing selection. *Trends in genetics: TIG*, 21, 30–32.
7. Beeuwkes, J., Spitzen, J., Spoor, C.W., Van Leeuwen, J.L. & Takken, W. (2008) 3-D flight behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae ss* inside an odour plume. *Proc Neth Entomol Soc Meet*, 19, 137–146.
8. Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M. & Corbel, V. (2008) Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 104.
9. Chandre, F., Darriet, F., Duchon, S., Finot, L., Manguin, S., Carnevale, P. & Guillet, P. (2000) Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 81–88.
10. Croissant, Y. (2012) Estimation of multinomial logit models in R: The mlogit Packages. R package version 0.2-4. URL: <http://cran.r-project.org/web/packages/mlogit/vignettes/mlogit.pdf>.

11. Djogbénou, L., Chandre, F., Berthomieu, A., Dabiré, R., Koffi, A., Alout, H. & Weill, M. (2008) Evidence of introgression of the ace-1R mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s (ed DA Carter). PLoS ONE, 3, e2172.
12. Djogbénou, L., Labbé, P., Chandre, F., Pasteur, N. & Weill, M. (2009) Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. Malaria Journal, 8, 70.
13. Dum, O. (1964) Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics, 241–252.
14. Fisher, R. (1922) On the dominance ratio. Proc Royal Soc Edin, 321–241.
15. Gatton, M.L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M.J., Ghani, A.C., Godfray, H.C.J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H., Rowland, M., Shaman, J. & Lindsay, S.W. (2013) The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. Evolution, 67, 1218–1230.
16. Giraudoux, P. (2011) pgirmess: Data analysis in ecology. R package version 1.5.8.
17. Haldane, J.B.S. (1932) The Causes of Evolution, Harper. NewYork.
18. Haldane, J.B.S. (1949) Disease and evolution. Ric. Sci. Suppl., 19, 68–76.
19. Hedrick, P.W. (2012) What is the evidence for heterozygote advantage selection? Trends in ecology & evolution, 27, 698–704.
20. Hemingway, J. (2014) The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 369, 20130431.
21. Hougard, J.-M., Duchon, S., Darriet, F., Zaim, M., Rogier, C. & Guillet, P. (2003) Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. Bulletin of the World Health Organization, 81, 324–333.
22. Ignell, R., Sengul, M.S., Hill, S.R. & Hansson, B.S. Odour coding and neural connections. Olfaction in vector-host interactions, Wageningen academics publisher.

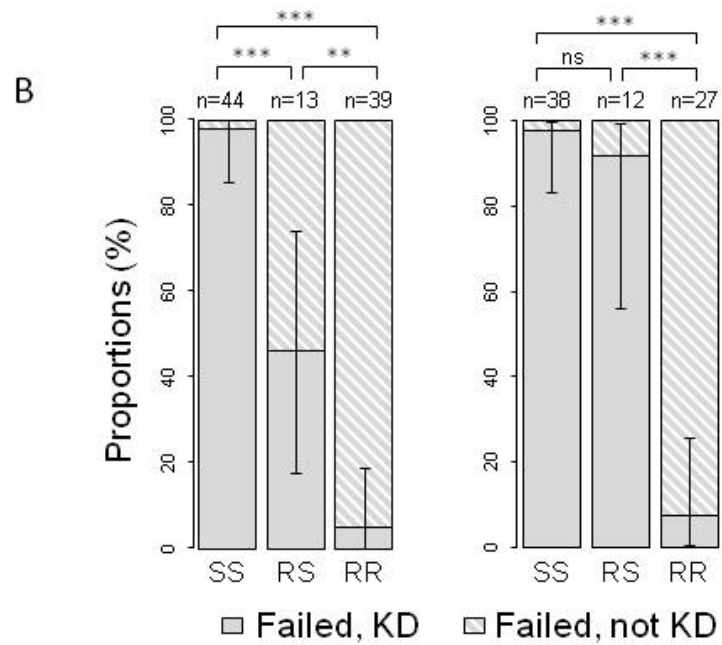
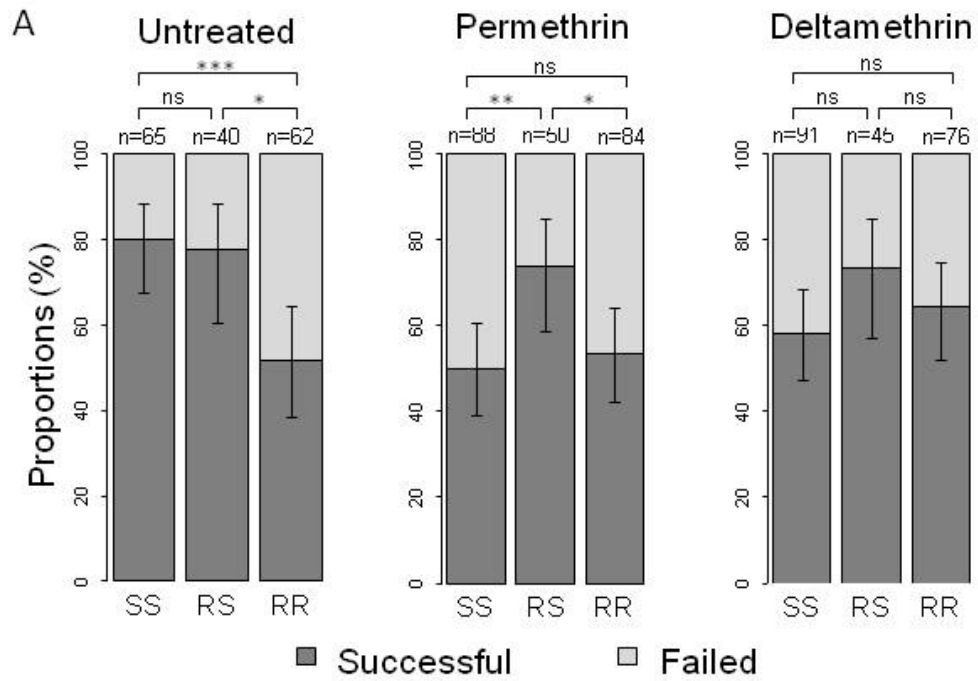
23. Labbe, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T. & Weill, M. (2007) Independent duplications of the acetylcholinesterase Gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1056–1067.
24. Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M. & Lenormand, T. (2007) Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genetics*, 3, e205.
25. Labbé, P., Milesi, P., Yébakima, A., Pasteur, N., Weill, M. & Lenormand, T. (2014) Gene-dosage effects on fitness in recent adaptative duplications: ace-1 in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution; international journal of organic evolution*.
26. Lacey, E.S. & Cardé, R.T. (2011) Activation, orientation and landing of female *Culex quinquefasciatus* in response to carbon dioxide and odour from human feet: 3-D flight analysis in a wind tunnel. *Medical and veterinary entomology*, 25, 94–103.
27. Lee, D., Park, Y., Brown, T.M. & Adams, M.E. (1999) Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Molecular pharmacology*, 55, 584–593.
28. Lefevre, T., Gouagna, L.-C., Dabire, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., Costantini, C. & Thomas, F. (2009) Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae s.s* when humans are not readily accessible. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 1023–1029.
29. Lehane, M.J. (2005) *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. Cambridge University Press.
30. Lenormand, T., Guillemaud, T., Bourguet, D. & Raymond, M. (1998) Evaluating gene flow using selected markers: a case study. *Genetics*, 149, 1383–1392.
31. Lippman, Z.B. & Zamir, D. (2007) Heterosis: revisiting the magic. *Trends in genetics: TIG*, 23, 60–66.
32. Lynd, A., Weetman, D., Barbosa, S., Egyir Yawson, A., Mitchell, S., Pinto, J., Hastings, I. & Donnelly, M.J. (2010) Field, genetic, and modeling approaches

- show strong positive selection acting upon an insecticide resistance mutation in *Anopheles gambiae s.s* *Molecular Biology and Evolution*, 27, 1117–1125.
33. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. & Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s* *Insect molecular biology*, 7, 179–184.
34. Moiroux, N., Gomez, M.B., Pennetier, C., Elanga, E., Djenontin, A., Chandre, F., Djegbe, I., Guis, H. & Corbel, V. (2012) Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *Journal of Infectious Diseases*, 206, 1622–1629.
35. Pinto, J., Lynd, A., Elissa, N., Donnelly, M.J., Costa, C., Gentile, G., Caccone, A. & Rosário, V.E. (2006) Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and veterinary entomology*, 20, 27–32.
36. Ranson, H., N’Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z. & Corbel, V. (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27, 91–98.
37. Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J. & Sattelle, D.B. (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 5, 119–133.
38. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.02. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
39. Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A.F. & Gandon, S. (2010) Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? (ed M Manchester). *PLoS Pathogens*, 6, e1001000.
40. Rousset, F. & Ferdy, J.-B. Testing environmental and genetic effects in the presence of spatial autocorrelation. *Ecography*, In press.
41. Sison, C. & Glaz, J. (1995) Simultaneous confidence intervals and sample size determination for multinomial proportions. *Journal of the American Statistical Association*, 90, 366–369.

42. Spitzen, J., Spoor, C.W., Grieco, F., ter Braak, C., Beeuwkes, J., van Brugge, S.P., Kranenbarg, S., Noldus, L.P.J.J., van Leeuwen, J.L. & Takken, W. (2013) A 3D analysis of flight behavior of *Anopheles gambiae* sensu stricto malaria mosquitoes in response to human odor and heat (ed G Dimopoulos). PLoS ONE, 8, e62995.
43. Spofford, J.B. (1969) Heterosis and the evolution of duplications. Am Nat, 103, 407–432.
44. Strode, C., Donegan, S., Garner, P., Enayati, A.A. & Hemingway, J. (2014) The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African Anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. PLoS medicine, 11, e1001619.
45. Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W., Usherwood, P.N. & Cohen, C.J. (2000) Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. The Journal of general physiology, 115, 305–318.
46. Vontas, J., Moore, S., Kleinschmidt, I., Ranson, H., Lindsay, S., Lengeler, C., Hamon, N., McLean, T. & Hemingway, J. (2014) Framework for rapid assessment and adoption of new vector control tools. Trends in Parasitology, 30, 191–204.
47. WHO. (2013a) World Malaria Report 2013. World Health Organization.
48. WHO. (2013b) Guidelines for Laboratory and Field-Testing of Long-Lasting Insecticidal Nets. World Health Organization.
49. Yates, F. (1934) Contingency table involving small numbers and the Khi² test. Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society, 1, 217–235.

Figure legends

Figure 1: A- Proportions of *Anopheles* females of each *kdr* genotype successfully penetrating a 1cm hole in (i) an untreated net, (ii) a permethrin-treated Olyset Net, and (iii) a deltamethrin-treated PermaNet 2.0. B- Proportions of knocked-down (KD) females among the failed when faced with ITN (permethrin-treated Olyset Net on the left, deltamethrin-treated PermaNet 2.0 on the right), for each *kdr* genotype (untreated net is not presented since no mosquito from any strain presented the KD phenotype during those exposures). The number of mosquitoes tested for each genotype (SS, RS and RR: homozygous susceptible, heterozygous, and homozygous resistant for the *kdr* mutation, respectively) is indicated. Error bars represent the 95% binomial confidence intervals for the different proportions. Significance of the different tests is indicated (^{NS} p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).



Supplementary material

Figure S1: Panel A. A wind tunnel to study the ability of malaria vector mosquitoes to pass through a holed net. C1: Chamber one (release chamber); C2: Chamber 2; GC: Glass cage receiving the guinea pig bait; RO: Release opening; NS: Net screens; HN: Holed net. Panel B. Photo of the experimental setup.

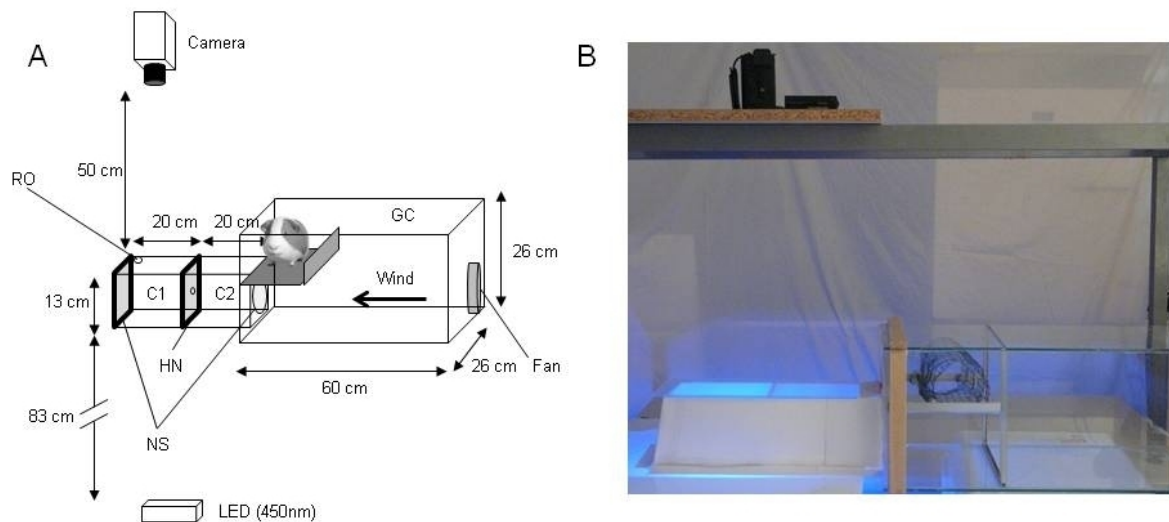
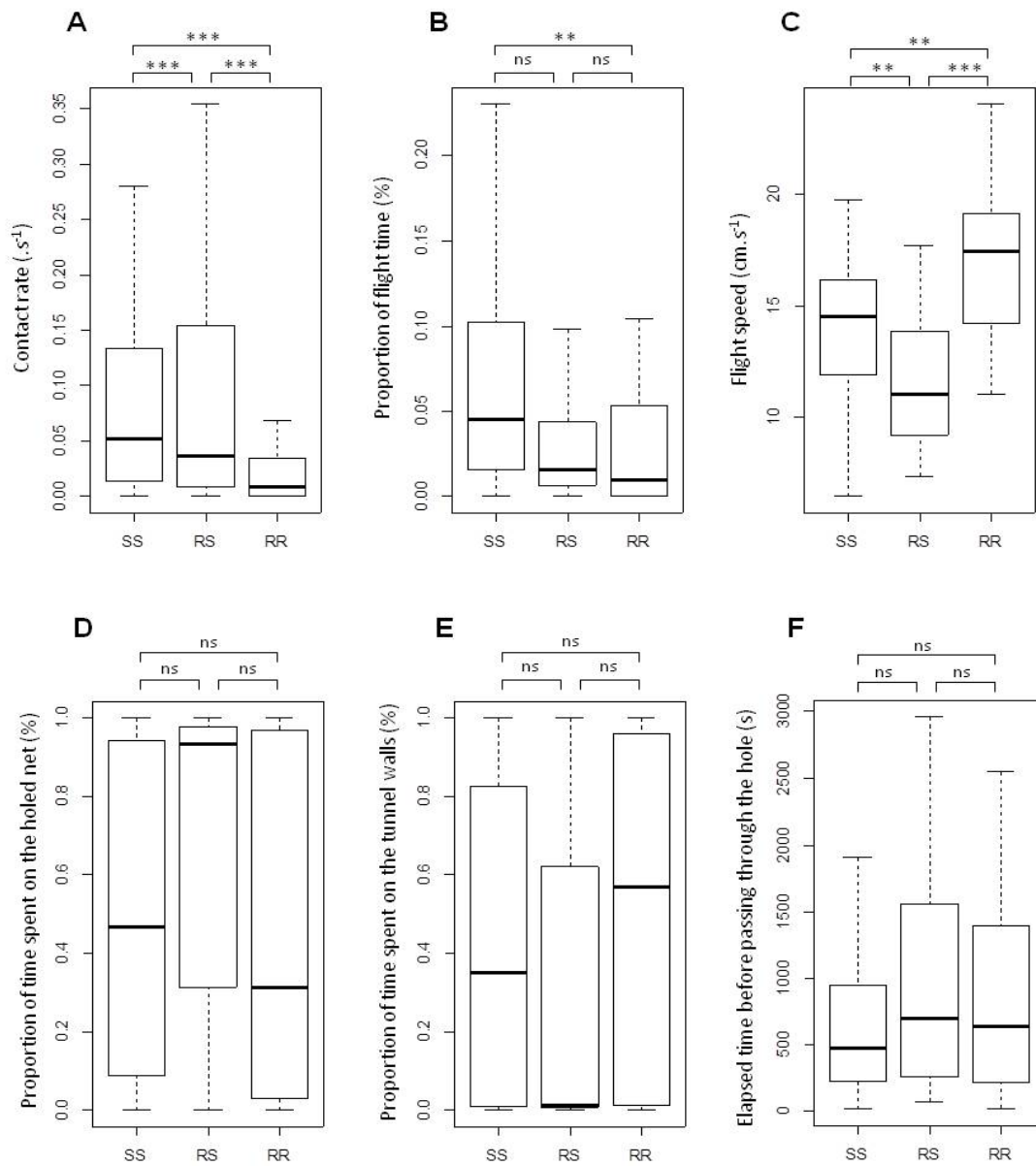


Figure S2: Tukey's boxplots of (A) contact rates, (B) proportions of flight time, (C) flight speed, (D) proportion of time spent on the holed net, (E) proportions time spent on the tunnel walls, and (F) elapsed time before passing through the hole in *An. gambiae* of the three *kdr* genotypes faced with an untreated holed net. Whiskers indicate the most extreme data that is no more than 1.5 times the interquartile range. Outliers are not shown. ns: non significant, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ according to (A) a Poisson model and (B, C, D, E, F) Dunn's post tests after a Kruskal-Wallis test.



Chapitre IV. Comportement de piqûre *d'Anopheles gambiae*
après une exposition sub-létale à des insecticides
pyréthrinoïdes³

³ **Insecticide exposure affects biting behavior of pyrethroid-resistant malaria vectors**

DIOP Malal M, CHANDRE Fabrice, ROSSIGNOL Marie, PORCIANI Angélique,
CHATEAU Mathieu, MOIROUX Nicolas, PENNETIER Cédric

Soumis à [PLOSOne](https://doi.org/10.1371/journal.plosone)

Résumé

La dernière étape de la séquence comportementale du moustique après la localisation d'un hôte protégé par une MILD est la phase de piqûre pour la prise d'un repas de sang. Il existe différents scénarios possibles pour un moustique au contact d'une MILD, soit de piquer à travers la moustiquaire traitée, soit de passer par un trou pour piquer l'hôte. Ces deux scénarios impliquent une exposition à une dose d'insecticide au contact de la moustiquaire traitée. L'objectif de cette expérience était d'étudier si la préexposition à une moustiquaire traitée module la capacité de prise d'un repas de sang ainsi que la séquence comportementale qui précède la piqûre.

Méthodologie

Nous avons construit un nouveau dispositif expérimental pour étudier le comportement de piqûre. Pour ce faire, nous avons enregistré des séquences vidéos de 10 min pendant lesquelles un appât animal était proposé à des moustiques ayant été brièvement exposés à un filet de moustiquaire auparavant (non-imprégné, imprégné de perméthrine ou de deltaméthrine). L'étude a porté sur le comportement de trois génotypes d'*An. gambiae* à fond génétique commun : SS (sensibles aux pyréthrinoïdes), RS (hétérozygotes pour gène *kdr*) et RR (homozygotes résistants aux pyréthrinoïdes).

Nous avons mesuré le taux de gorgement (proportion de moustiques ayant pris un repas sanguin avec succès), les paramètres comportementaux suivants (nombre de piqûre, durée d'une piqûre, durée d'un repas de sang et durée de la prédiurèse) et la quantité de sang ingéré par le moustique.

Résultats & Discussion

En absence d'insecticide, nos résultats montrent que la mutation *kdr* n'a pas influencé la capacité de piqûre c'est-à-dire la capacité à localiser un vaisseau sanguin et à piquer.

Comportement de piqûre après une exposition sublétalement à des pyréthriinoïdes

Après la préexposition à la perméthrine, le taux de gorgement des moustiques résistants RR s'est révélé plus élevé que ceux des génotypes SS et RS, alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre les trois génotypes après préexposition à la deltaméthrine. Ce résultat pourrait être associé à leur action différente sur la cinétique des canaux sodiques qui induirait une réponse comportementale différente à l'exposition de la deltaméthrine ou de la perméthrine.

Par ailleurs, quelle que soit la molécule pyréthriinoïde utilisée, une analyse de la séquence comportementale de piqûre des trois génotypes montre que la durée de la piqûre, de la prédiurèse et la quantité de sang ingérée sont réduits significativement après préexposition aux insecticides. Ce résultat montre que les insecticides pyréthriinoïdes ont une action sublétalement qui peut avoir des conséquences sur la fitness des moustiques sensibles et résistants.

Conclusion

Notre étude a donc permis de montrer une absence de modulation de la séquence comportementale de piqûre par la mutation *kdr* en absence d'insecticide. En présence d'insecticide, les résultats ont été variables révélant une interaction génotype et insecticide dont les mécanismes physiologiques sous-jacents méritent plus d'intérêt et qui peuvent avoir des implications importantes en termes de lutte antivectorielle. Au-delà de la capacité à prendre le repas sanguin, nous avons également montré que la préexposition aux pyréthriinoïdes contribue à modification d'un processus excrétoire du moustique. Tous ces résultats obtenus expérimentalement doivent être intégrés dans le contexte de multirésistance des populations sauvages d'*Anopheles* vecteurs de parasite du paludisme constituant ainsi une première pierre dans la compréhension de la relation « insecticide x résistance x comportement ».

Insecticide exposure affects biting behaviour of insecticide resistant malaria vectors

DIOP Malal M^{1,2}, CHANDRE Fabrice³, ROSSIGNOL Marie³, PORCIANI Angélique^{1,2}, CHATEAU Mathieu³, Moiroux Nicolas^{3,*}, Pennetier Cédric^{1,2,*}

¹ Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC (UM-CNRS 5290-IRD 224), 08BP841, Cotonou, Bénin

² Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Bénin.

³ Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC (UM-CNRS 5290-IRD 224), 34394 Montpellier, France

*contributed equally to this work

Contacts & correspondence: Malal Diop malal_diop@msn.com; Cédric Pennetier cedric.pennetier@ird.fr

Abstract

The massive use of insecticide-treated nets has drastically changed the environment for malaria vector mosquitoes, thus challenging their host-seeking behaviour and biting success. Indeed, mosquitoes must bite a human host through a net hole or after touching the treated net and thus being exposed to the insecticide. Here, we investigated the effect of a brief exposure to insecticide-treated nets on the biting behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes and the interactions between such behaviour and the *kdr* mutation that confers resistance to pyrethroids. To this aim, we developed an assay to film the biting behaviour of mosquitoes with similar genetic background, but different *kdr* locus genotypes (SS i.e. homozygous susceptible, RS i.e. heterozygous and RR i.e. homozygous resistant). In the absence of insecticide exposure, the *kdr* mutation genotype did not influence their blood feeding success. Conversely, the blood feeding success rate of RR mosquitoes was decreased by pre-exposure to deltamethrin and enhanced by pre-exposure to permethrin. Moreover, a brief exposure to a pyrethroid-treated net reduced feeding duration, blood meal size

and prediuresis duration. This effect was stronger with deltamethrin than permethrin. Finally, we discussed the potential consequences of the observed behavioural changes on the malaria vector fitness and the links with the *kdr* genotypes.

Keywords: *Anopheles gambiae*, feeding behaviour, *Kdr* mutation, sub-lethal effect, pyrethroid

Introduction

Malaria vector mosquitoes become infected by and then can transmit *Plasmodium spp.* parasites during blood meals. *Plasmodium spp.* transmission is strongly dependent on the mosquito biting rate, as formalized by the Ross-Macdonald model of malaria (Garrett-Jones & Shidrawi 1969). The behaviour and host preferences of blood-feeding mosquitoes are influenced by several factors, primarily their genetic background (Dana et al. 2005, Rund et al. 2011, Zwiebel & Takken 2004), but also environmental factors, such as host diversity and availability (Killeen et al. 2001, Lyimo & Ferguson 2009), and the presence/absence of physical and chemical barriers, such as Insecticide-Treated Nets (ITNs) (Gatton et al. 2013, Lefèvre et al. 2009, Mathenge et al. 2001).

ITNs should hamper the contacts between humans and nocturnal, anthropophilic and endophagic mosquitoes, such as *An. gambiae* (Pates & Curtis 2005). The widespread use of pyrethroid (PYR) insecticides for ITNs and other selective pressures (mainly PYR use in agriculture) drove adaptations in malaria vectors to counteract the insecticide lethal effect (Chandre et al. 1999, Hemingway et al. 2004, Ranson et al. 2011).

Physiological PYR resistance involves two main mechanisms: (i) metabolic resistance, due to quantitative or qualitative changes in detoxification enzymes (cytochrome P450 monooxygenases, esterases and glutathione S-transferases), and (ii) target site resistance, due to non-synonymous mutations in the voltage-gated sodium channels that are called knock-down resistance (*kdr*) mutations (Hemingway et al. 2004, Ranson et al. 2011).

Mosquitoes can counteract vector control tools also through behavioural modulation. For instance, in areas of sub-Saharan Africa where large-scale vector control programmes have been implemented, several observations suggest that malaria vectors have reduced their contacts with ITNs or insecticides on walls by modulating their host-feeding activity. Indeed, following the large scale distribution of ITNs in Benin and Senegal, some *An. funestus* populations started to feed predominantly at dawn/early in the morning or in broad daylight (Moiroux et al. 2012, 2014; Sougoufara et al. 2014), when most people are outside the nets (Moiroux et al. 2014). Behavioural modulation might also be influenced by physiological resistance mechanisms. Indeed, experimental hut trials showed that in *An. gambiae*, indirect behavioural indicators in response to ITN presence (deterrence and induced exophily) are related to the physiological tolerance to insecticide (Corbel et al. 2010). Moreover, a study demonstrated that *kdr* homozygous resistant mosquitoes have longer contacts with ITNs than *kdr* homozygous susceptible mosquitoes, which are more excited by PYR irritant effect (Chandre et al. 2000). Altogether, such findings indicate that insecticide treatments affect malaria vector behaviour. However, the effects of insecticide exposure and resistance genotypes on the biting activity of *An. gambiae* remain poorly investigated.

The last step of the mosquito host-seeking behaviour after reaching a host protected by an ITN is biting for taking a blood meal. During the host-seeking phase and the penetration through a hole in the net, mosquitoes can be exposed to sub-lethal doses of insecticide. Such doses do not cause death, but can have several physiological or behavioural effects on the surviving mosquitoes (Desneux et al. 2007). For instance, sub-lethal doses of insecticide can affect the feeding and reproductive behaviour of some blood-sucking insects (Haynes 1988). As the PYR insecticide on ITNs acts on specific sites in the mosquito nervous system, it might alter some physiological processes involved in the biting behaviour of malaria vectors. As far as we know, this hypothesis has never been tested.

In the present study, we investigated whether pre-exposure to an ITN modulates the mosquito ability to take a blood meal by using experimental conditions that mirror

the exposure to insecticide occurring when a mosquito passes through an ITN after having located a host. We also assessed whether the *kdr* genotype modifies the biting behaviour sequence of *An. gambiae*. To do this aim, we used mosquitoes in which leucine 1014 of the sodium channel was substituted by a phenylalanine (L1014F). This is the most common *kdr* mutation associated with PYR resistance in African malaria vectors (Martinez-Torres et al. 1998).

Methodology

Mosquito strains and rearing procedures

Two mosquito laboratory strains were used for this study. One is the insecticide-susceptible Kisumu strain (VectorBase, <http://www.vectorbase.org>, KISUMU1), isolated in Kenya in 1975. This strain is PYR-susceptible and homozygous (SS) for the L1014 codon. The second one is the Kdrkis strain that is PYR-resistant and homozygous (RR) for the L1014F *kdr* mutation. The Kdrkis strain was obtained by introgression into the Kisumu genome of the *kdr*-west allele (L1014F) (Martinez-Torres et al. 1998) that originated from a PYR-resistant population collected in Kou Valley, Burkina Faso and reared as the VKPer strain. Introgression was obtained through 19 successive back-crosses between Kisumu and VKPer (Djegbé 2013). VKPer strain used to obtain Kdrkis displayed the same expression level of metabolic resistance enzyme as Kisumu (N'Guessan et al. 2007). Heterozygous individuals for the L1014F *kdr* mutation (RS) were obtained by crossing once (F1 progeny) Kisumu SS females with Kdrkis RR males. Therefore, the three genotypes have a common genetic background for most of their genome.

Mosquitoes were reared at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% relative humidity under a 16h:8h (light:dark) photoperiod in the insectary. Gravid females were allowed to lay eggs on wet filter paper inside mesh-covered cages. Eggs were dispensed in plastic trays containing osmotic water. Larvae were kept in trays and fed TetraMin® fish food. Pupae were removed and allowed to emerge inside 30x30x30cm cages. After emergence, adults could feed *ad libitum* on 10% sucrose solution.

On each experimental day, a batch of ten adult (7 to 9-day-old) female mosquitoes without prior access to a blood meal were randomly collected from the rearing cages and placed in cups covered by gauze. Mosquitoes were starved the day before the experiment because sucrose inhibits blood avidity in mosquitoes (Jones & Madhukar 1976).

Insecticide exposure

To simulate the contact with an ITN that may occur before the vector finds a way to reach a host, starved females were individually exposed to PYR insecticide-treated netting using an experimental setup in which insects can only walk or stand on the net surface and that was initially designed to measure the median knock down time (Skovmand et al. 2008). We used three net types: an untreated net (negative control), an Olyset Net[®] (impregnated with 1000 mg/m² of permethrin, hereafter Olyset) and a PermaNet[®] 2.0 (coated with 55 mg/m² of deltamethrin, hereafter PermaNet). Based on previous experiments (Diop et al. 2015), each mosquito was exposed for 30 seconds. This is the median time of contact with permethrin-treated netting before PYR-susceptible anopheles (SS genotype) locate a hole to reach the host (Diop et al. 2015). After exposure, a 1-min latency period was observed before releasing the insect in the behavioural assay setup.

Behavioural assay

Experiments were conducted in a biting behavioural assay setup designed for video recording the biting behaviour of the tested mosquitoes (Figure 1). The setup is made of foam board and composed of an observation tunnel (OT) and an observation zone (OZ) separated by a transparent plastic (TP). The OZ is a triangular prism, closed on its base by a removable paper sheet with a 1-cm diameter hole. The hole allows mosquitoes to bite the ear of a rabbit (R) that is maintained immobile in a restraining cage (RC) to avoid any defensive behaviour during blood feeding. The experimental room was faintly illuminated with a compact fluorescent lamp bulb placed at 15 cm from the OZ to allow the acquisition of the biting behaviour sequence by the digital video system.

Mosquitoes were individually released inside the OZ through an opening located on its lateral face. The experimenter used latex gloves to avoid any contamination by human skin odours. The number of releases ranged from 43 to 86, depending on the treatment and the mosquito genotype. Each mosquito was filmed for 10 minutes using a Sony® Digital HD Video Camera (HDR-XR550) placed on the top of the observational tunnel (Figure 1). The video camera was connected to a computer screen in another room to allow real-time monitoring of each mosquito. The MPEG-2 recordings (PAL video: 720x576 pixels at 25 frames/s) were analysed using the behavioural event recording program EVENT01, version 1.2.4 (©R.D. Collins and M.K. Tourtellot, 1993-2002). The OZ was cleaned with ethanol and the removable paper was changed between trials to avoid any contamination by insecticide residues that might have been carried by the previous mosquito.

Behavioural parameters

A mosquito was scored as successful if it could feed at the end of the 10-min trial and unsuccessful if it did not. After the trial, successful mosquitoes were stored at -35°C for measuring the blood meal size (see below). As pre-exposure to insecticide can induce a knockdown (KD) effect during the trial, unsuccessful mosquitoes were recorded as KD, if they were lying on their side or their back with no tarsus in contact with the OZ base.

Analysis of the acquired images allowed quantifying the following variables in successful mosquitoes: (1) number of probing events, (2) **probing** duration (the time from the introduction of the stylet fascicule into the rabbit skin to blood appearance in the mosquito abdomen), (3) **feeding** duration (from the blood appearance in the abdomen to the beginning of the stylet fascicule withdrawal), and (4) **prediuresis** duration (the time during which excretion of rectal fluid is observed as red bright drops during feeding and after proboscis withdrawal).

Blood meal volume measurement

The blood intake was evaluated by quantifying the haemoglobin amount, as described by Briegel (Briegel et al. 1979). Each engorged mosquito was stored in one 1.5 ml Eppendorf tube at -35°C. Then, the whole abdomen was ground in the presence of 0.5

ml of Drabkin's reagent until it was completely disintegrated. Haemoglobin then reacted with the Drabkin's reagent and was converted into haemoglobin cyanide (HiCN). Samples were incubated at room temperature (25°C) for 20 min and then a chloroform solution was added in each tube. Samples were centrifuged at 5600 rpm for 5 min and the aqueous supernatant (containing HiCN) was placed in a new 1.5 ml Eppendorf tube. The absorbance was read at a wavelength of 550nm using a microplate spectrophotometer. Two replicates were done for each mosquito and their absorbance values were averaged. A sample of the rabbit blood was used as control for calibration curves.

As the blood meal volume is correlated with the mosquito size (Briegel 1990b), the blood meal volume of all mosquitoes from the same batch was divided by the average weight of five randomly selected mosquitoes from the same rearing cage. The resulting ratio was expressed in μL of blood per μg of weight and called weighted blood meal volume.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R software, version 3.0.2 (R Development Core Team). We analysed the biting success rate (i.e., the proportion of mosquitoes that took a blood meal relative to all tested mosquitoes) using a binomial logistic model that included the *kdr* genotypes (SS, RS or RR), type of pre-exposure (untreated, Olyset or PermaNet) and their interactions as explanatory variables. The model was written as follow:

$$\text{logit}(P(y = 1)) = \beta_0 + \beta_i^{Genotype} + \beta_k^{Treatment} + \beta_i^{Genotype} \times \beta_k^{Treatment}$$

where $\beta_i^{Genotype}$ denotes the effect on the logit of the classification in the category i (SS, RS or RR) of Genotype, and $\beta_k^{Treatment}$ denotes the effect of the classification in the category k (untreated, Olyset or PermaNet) of Treatment. Each combination of categories i and k of the explanatory variables was successively used as reference class to allow multiple comparisons among genotypes and treatments. Odds ratios and their 95% confidence interval were computed. We calculated the binomial confidence interval of the proportions of successful mosquitoes with the Wilson's

score method using the binconf command from the Hmisc package in R (Harrell 2014).

The number of probing events was compared among genotypes and treatments using a Poisson regression model (logit link). The probing duration, feeding duration, prediuresis duration and weighted blood meal volume were not normally distributed and therefore were compared among genotypes by using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post hoc test (Dunn 1964, Siegel & Castellan 1988) using the GraphPad Prism software for Windows, version 5.04 (GraphPad Software, Inc. 2010).

Results

In total, 511 *An. gambiae* females (SS=182, RS=156 and RR=173) were released for behavioural assays. The number of mosquitoes released for each genotype and treatment and the feeding success are shown in Table 1.

Impact of the *kdr* mutation on feeding success and behaviour

When female mosquitoes were not pre-exposed to UTN (i.e., untreated netting=), no difference in their feeding success rate was found among the three *kdr* genotypes ($OR_{RS-SS}=1.46$ [0.78 – 2.76]; $OR_{RR-SS}=1.46$ [0.78 – 2.76]; $OR_{RR-RS}=1.00$ [0.51 – 1.95]; Figure 2). This indicates carrying the *kdr* mutation did not influence the feeding success.

Analysis of the biting behaviour of successful mosquitoes in the in absence of insecticide exposure showed that feeding duration was shorter in RR than in SS and RS mosquitoes (Kruskal-Wallis rank sum test, $p=0.0001$; Dunn's post hoc test, $p<0.05$). Moreover, the weighted quantity of blood intake was larger in RS mosquitoes than in SS and RR mosquitoes (Kruskal-Wallis rank sum test, $p=0.0001$; Dunn's post hoc test, $p<0.05$), and prediuresis lasted longer in RS than in SS and RR mosquitoes (Kruskal-Wallis rank sum test, $p=0.019$; Dunn's post hoc test, $p<0.05$) (Figure 3).

The number of probing events and duration was not significant different among treatments (UTN and ITN) and genotypes (SS, RS and RR) (Kruskal-Wallis rank sum test, $p>0.05$).

Impact of insecticide exposure on feeding success and behaviour

First, we investigated the effect of insecticide exposure on the feeding success of each genotype. Compared to the UTN condition, pre-exposure to permethrin (Olyset) reduced significantly the feeding success rate of SS mosquitoes ($OR_{\text{Olyset-UTN}}=0.27$ [0.12 – 0.62, $p=0.001$]), but not of RS mosquitoes ($OR_{\text{Olyset-UTN}}=0.49$ [0.23 – 1.06], $p=0.070$). Conversely, it increased the feeding success rate of RR mosquitoes ($OR_{\text{Olyset-UTN}}=2.56$ [1.15 – 5.70], $p=0.020$). Pre-exposure to deltamethrin (PermaNet) reduced significantly the feeding success rate of RS and RR mosquitoes ($OR_{\text{PermaNet-UTN}}=0.23$ [0.10 – 0.53], $p=0.0006$; and $OR_{\text{PermaNet-UTN}}=0.35$ [0.17 – 0.75], $p=0.007$), but not of SS mosquitoes ($OR_{\text{PermaNet-UTN}}=0.59$ [0.28 – 1.23], $p=0.155$).

Then, we compared the feeding success rate of the three genotypes after insecticide exposure. The feeding success rate of RR mosquitoes was higher than that of SS and RS mosquitoes after permethrin pre-exposure ($OR_{\text{RR-SS}}=13.67$ [5.31 – 35.18], $p<0.0001$; $OR_{\text{RR-RS}}=5.23$ [2.15 – 12.69], $p<0.001$), whereas the feeding success rate of RS mosquitoes was higher than that of SS mosquitoes ($OR_{\text{RS-SS}}=2.62$ [1.04 – 6.59], $p=0.041$). In contrast, pre-exposure to deltamethrin did not induce any difference in the blood feeding success rate of the three genotypes (SS, RS, and RR) ($OR_{\text{RS-SS}}=0.57$ [0.22 – 1.44]; $OR_{\text{RR-SS}}=0.88$ [0.38 – 2.06]; $OR_{\text{RR-RS}}=1.55$ [0.62 – 3.91]; Figure 2).

Impact of insecticide exposure on biting behaviour

After exposure to deltamethrin (PermaNet), feeding duration, prediuresis duration and weighted blood meal volume were significantly reduced in SS mosquitoes compared with the UTN condition (Kruskal-Wallis rank sum test, $p<0.01$; Dunn's post-test, $p<0.05$; Figure 3 panels A, B, and C). A similar trend was observed after exposure to permethrin (Olyset), although it was not significant (Kruskal-Wallis rank sum tests, $p>0.05$).

In RS and RR mosquitoes, exposure to permethrin or deltamethrin significantly reduced feeding duration, prediuresis and the weighted blood meal volume compared with control treatment (UTN) (Kruskal-Wallis rank sum test, $p<0.001$; Dunn's post-test, $p<0.05$; Figures 3 panels D, E, F, G and I), except for prediuresis

duration in RR mosquitoes after permethrin exposure (Kruskal-Wallis rank sum test, $p > 0.05$; Figures 3 panels H).

Impact of insecticide exposure on knockdown rates

Pre-exposure to insecticide had a substantial lethal effect during the trial. Indeed, 82.5% [70.7-94.3] (33/40) and 60% [42.5-77.5] (18/30) of unfed SS mosquitoes were knocked down upon exposure to permethrin or deltamethrin, respectively. The KD phenotype was observed in 42.3% [23.3-61.3] (11/26) and 45.5% [28.5-62.5] (15/33) of unfed RS mosquitoes after permethrin and deltamethrin exposure, respectively. Among unfed RR mosquitoes, permethrin pre-exposure did not induce any KD effect, whereas deltamethrin pre-exposure led to 35.3% [19.2-51.4] (12/34) of KD mosquitoes.

Discussion

To investigate the influence of ITN exposure on the biting behaviour of *An. gambiae* mosquitoes, we used mosquitoes that share the same genetic background, but for the presence/absence of the *kdr* (L1014F) mutation, and then exposed them to ITN prior to blood feeding.

The blood-feeding rate did not differ between the three *kdr* genotypes in the absence of insecticide exposure. Therefore, the *kdr* mutation does not directly influence getting a blood meal. However, feeding duration and blood meal volume were different between genotypes. RR mosquitoes spent less time taking their blood meal than RS and SS mosquitoes. This might confer an advantage as fast feeding reduces the risk to be killed because of the host defensive behaviour (Lyimo et al. 2012). On the other hand, RS mosquitoes took higher blood volumes than RR and SS females. This could improve the completion of oogenesis in RS mosquitoes (Fernandes & Briegel 2005) and increase their fecundity. However, large blood meals reduce the flying ability, escape speed and agility required to avoid predators (Lyimo et al. 2012, Roitberg et al. 2003, Walker & Edman 1985). These different trades-offs between behavioural traits that might enhance fecundity or survival in the three genotypes are of great interest and deserve further investigations in relation with the ecological and vector control environment. Such trades-offs drive the fitness evolution of

mosquitoes with different resistance alleles and could also affect parasite transmission. Indeed, a decrease of blood meal duration and size might increase the frequency of multiple feedings and consequently the risk of *Plasmodium* transmission (Scott & Takken 2012). Similarly, a bigger blood meal size might increase the probability of mosquito infection by gametocytes (Vézilier et al. 2010).

Exposure to permethrin and deltamethrin induced opposite outcomes in term of blood feeding success (increase and reduction, respectively) in RR mosquitoes, whereas other feeding behaviour indicators did not seem to be affected. This opposite effect on the feeding success rate of RR females might be linked to the different chemical properties of permethrin and deltamethrin that induce two types of bursting activity of sodium channels (Sattelle & Yamamoto 1988, Wouters & van den Bercken 1978). Type II pyrethroids, such as deltamethrin, further delay the inactivation of the voltage-gated sodium channel and in a less reversible way than type I pyrethroids, such as permethrin (O'Reilly et al. 2006). Moreover, in *An. gambiae*, exposure of resistant strains to sub-lethal doses of permethrin alters the expression of several genes involved in metabolic synthesis, among which some are not directly related to resistance (Vontas et al. 2005). This gene expression modulation occurs gradually after insecticide exposure and generally reaches its maximum after six hours. Permethrin can also affect gene expression in the salivary glands. This could modify the saliva protein composition and may play an important role in blood intake. Indeed, a study on ticks has shown that exposure to permethrin increases the neuroendocrine and salivary gland activities (Mohamed et al. 2000) and that this effect can be observed several hours after exposure. In our study, the very short time (1 minute) between insecticide exposure and the behavioural assay was probably not long enough to detect effects caused by changes in salivary protein expression that could explain the feeding behaviour of the resistant strain. Nevertheless, the intrinsic sialome composition could be different in the three *kdr* genotypes and might contribute to the observed phenotypic differences (Cornelie et al. 2014, Djegbe et al. 2011). Alternatively, the lower PYR susceptibility of homozygous resistant mosquitoes could lead to their over-stimulation compared to susceptible and heterozygous

mosquitoes that are more affected by the toxic effect of such insecticides (Corbel et al. 2004).

Prediuresis duration was substantially reduced in RS females and RR after exposure to ITN. Prediuresis is an intestinal mechanism that plays a crucial role in protein concentration during feeding (Briegel & Rezzonico 1985) and contributes to thermoregulation (Lahondère & Lazzari 2012, 2013). This perturbation of the prediuresis phase by sub-lethal doses of PYR insecticides could lead to toxic accumulation of metabolic wastes and products of oxidative stress in the hemolymph that might affect the lifespan of mosquitoes. This results suggest that mosquitoes with the *kdr* mutation might be more susceptible to new chemicals that target the mosquito renal system and that are currently developed as an alternative to the currently used insecticides (Raphemot et al. 2013).

To conclude, our study demonstrates a complex interaction between insecticide exposure and the *kdr* genotype on the biting behaviour of mosquitoes. The behavioural modulation induced by PYR-treated nets also raises concerns about the consequences of the *kdr* resistance- insecticide interaction. Indeed, our results showing that permethrin exposure enhances the blood feeding success rate of RR mosquitoes and the recent evidence that RR mosquitoes prefer a human host protected by a permethrin-treated net rather than an untreated net (Porciani *et al.* submitted) suggest that ITN may increase the risk of *Plasmodium falciparum* transmission in areas where PYR resistance is well established. Insecticide resistance genes in malaria vectors could modify vector competence and the dynamics of infection by *P. falciparum*. For instance, recent studies have shown that parasite infection increases insecticide susceptibility in mosquitoes carrying the *kdr* mutation (Alout et al. 2014b) and that insecticide exposure reduces parasite development in resistant mosquitoes (Alout et al. 2014a). It is now urgent to decipher the links between insecticide exposure, resistance mechanisms and infection by *P. falciparum* on the host-seeking and biting behaviour of malaria vectors to better understand malaria transmission in insecticide-resistance areas.

Ethical Considerations

The IRD lab where the experiments were run received the approval from the animal care and use committee named “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale; Languedoc Roussillon” (CEEA-LR-1064 for guinea pigs and CEEA-LR-13002 for the rabbits).

Financial statement

This work has been funded by Institut de Recherche pour le Développement (IRD). MMD is supported by an IRD PhD fellowship. AP is supported by IRD through an international Voluntary fellowship and by François Lacoste (Inkermann fund fellowship). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Alout H, Djegbe I, Chandre F, Djogbenou LS, Dabire RK, et al. 2014a. Insecticide exposure impacts vector-parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 281(1786):
2. Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, Djégbe I, Chandre F, et al. 2013. Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae s.s* for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS ONE*. 8(5):e63849
3. Alout H, Yameogo B, Djogbenou LS, Chandre F, Dabire RK, et al. 2014 b. Interplay Between *Plasmodium* Infection and Resistance to Insecticides in Vector Mosquitoes. *The Journal of infectious diseases*
4. Briegel H. 1990. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*. 27(5):839–50
5. Briegel H, Lea AO, Klowden MJ. 1979. Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal sizes of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. 15(3):235–38

6. Briegel H, Rezzonico L. 1985. Concentration of host blood protein during feeding by anophe-line mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology. 22(6):612–18
7. Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, et al. 1999. Status of pyrethroid re-sistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bull World Health Organ. 77(3):230–34
8. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, et al. 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. Medical and Veterinary Entomology. 14(1):81–88
9. Corbel V, Chabi J, Dabiré RK, Etang J, Nwane P, et al. 2010. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. Malar J. 9(113):113
10. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, et al. 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the se-lection of pyrethroid resistance. Malaria journal. 3:22
11. Cornelie S, Rossignol M, Seveno M, Demettre E, Mouchet F, et al. 2014. Salivary Gland Pro-teome Analysis Reveals Modulation of Anopheline Unique Proteins in Insensitive Acetylcholinesterase Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. PLoS ONE. 9(8):e103816
12. Dana AN, Hong YS, Kern MK, Hillenmeyer ME, Harker BW, et al. 2005. Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. BMC Genomics. 6(1):5
13. Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M. 2007. The sublethal effects of pesticides on benefi-cial arthropods. Annu. Rev. Entomol. 52:81–106
14. Diop MM, Moiroux N, Chandre F, Martin-Herrou H, Milesi P, et al. 2015. Behavioral Cost & Overdominance in *Anopheles gambiae*. PLoS ONE. 10(4):e0121755
15. Djegbe I, Cornelie S, Rossignol M, Demettre E, Seveno M, et al. 2011. Differential expression of salivary proteins between susceptible and

- insecticide-resistant mosquitoes of *Culex quinquefasciatus*. PloS one. 6(3):e17496
16. Dunn OJ. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 6(3):241–52
 17. Fernandes L, Briegel H. 2005. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *Journal of vector ecology*. 30(1):11
 18. Garrett-Jones C, Shidrawi GR. 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bulletin of the World Health Organization*. 40(4):531
 19. Gatton ML, Chitnis N, Churcher T, Donnelly MJ, Ghani AC, et al. 2013. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution*. 67(4):1218–30
 20. Haynes KF. 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual review of entomology*. 33(1):149–68
 21. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*. 34(7):653–65
 22. Jones JC, Madhukar BV. 1976. Effects of sucrose in blood avidity in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 22(3):357–60
 23. Killeen GF, McKenzie FE, Foy BD, Bøgh C, Beier JC. 2001. The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95(5):469–76
 24. Lahondère C, Lazzari CR. 2012. Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid over-heating. *Current Biology*. 22(1):40–45
 25. Lahondère C, Lazzari CR. 2013. Thermal Stress and Thermoregulation During Feeding in Mosquitoes. In *New Insights into Malaria Vectors*, Vol. 16, p. 17. Sylvie Manguin
 26. Lefèvre T, Gouagna L-C, Dabiré KR, Elguero E, Fontenille D, et al. 2009. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of

- Anopheles gambiae* ss when humans are not readily accessible. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 81(6):1023
27. Lyimo IN, Ferguson HM. 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. Trends in parasitology. 25(4):189–96
28. Lyimo IN, Haydon DT, Mbina KF, Daraja AA, Mbehela EM, et al. 2012. The fitness of Afri-can malaria vectors in the presence and limitation of host behaviour. Malaria journal. 11(1):425
29. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge JB, et al. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. Insect molecular biology. 7(2):179–84
30. Mathenge EM, Gimnig JE, Kolczak M, Ombok M, Irungu LW, Hawley WA. 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. Journal of medical entomology. 38(4):531–36
31. Mohamed FSA, Abbassy MM, Darwish ZEA, Tetreault GE, Marzouk AS, et al. 2000. Effects of Permethrin on the Salivary Glands and Neuroendocrine Organs of Unfed Female Hyalomma (Hyalomma) dromedarii (Ixodoidea: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 37(3):393–400
32. Moiroux N, Damien GB, Egrot M, Djenontin A, Chandre F, et al. 2014. Human Exposure to Early Morning *Anopheles funestus* Biting Behavior and Personal Protection Provided by Long-Lasting Insecticidal Nets. PLoS ONE. 9(8):e104967
33. Moiroux N, Gomez MB, Pen-netier C, Elanga E, Djenontin A, et al. 2012. Changes in *Anopheles funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecti-cidal Nets in Benin. Journal of Infectious Diseases. 206(10):1622–29
34. O'Reilly AO, Khambay BPS, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, Davies TGE. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochemical Journal. 396(2):255
35. Pates H, Curtis C. 2005. Mosquito behavior and vector control. Annu. Rev. Entomol. 50:53–70

36. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in parasitology*. 27(2):91–98
37. Raphemot R, Rouhier MF, Hopkins CR, Gogliotti RD, Lovell KM, et al. 2013. Eliciting Renal Failure in Mosquitoes with a Small-Molecule Inhibitor of Inward-Rectifying Potassium Channels. *PLoS ONE*. 8(5):e64905
38. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.02. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing
39. Roitberg BD, Mondor EB, Tyerman JG. 2003. Pouncing spider, flying mosquito: blood acquisition increases predation risk in mosquitoes. *Behavioral Ecology*. 14(5):736–40
40. Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. 2011. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PNAS*. 108(32):E421–30
41. Sattelle DB, Yamamoto D. 1988. Molecular Targets of Pyrethroid Insecticides. In *Advances in Insect Physiology*, Vol. 20, ed. PDE and VB Wigglesworth, pp. 147–213. Academic Press
42. Scott TW, Takken W. 2012. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*. 28(3):114–21
43. Siegel S, Castellan N. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York. McGraw-Hill International Editions ed.
44. Skovmand O, Bonnet J, Pigeon O, Corbel V. 2008. Median knock-down time as a new method for evaluating insecticide-treated textiles for mosquito control. *Malaria Journal*. 7(1):114
45. Sougoufara S, Diédhiou SM, Doucouré S, Diagne N, Sembène PM, et al. 2014. Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. *Malaria journal*. 13(1):125

46. Vézilier J, Nicot A, Gandon S, Rivero A. 2010. Insecticide resistance and malaria transmission: infection rate and oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes infected with *Plasmodium relictum*. *Malaria J.* 9:379
47. Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David J-P, Kafatos FC, 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
48. Walker ED, Edman JD. 1985. The influence of host defensive behavior on mosquito (Diptera: Culicidae) biting persistence. *Journal of Medical Entomology.* 22(4):370–72
49. Wouters W, van den Bercken J. 1978. Action of pyrethroids. *General Pharmacology: The Vascular System.* 9(6):387–98
50. Zwiebel L, Takken W. 2004. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. *Insect biochemistry and molecular biology.* 34(7):645–52

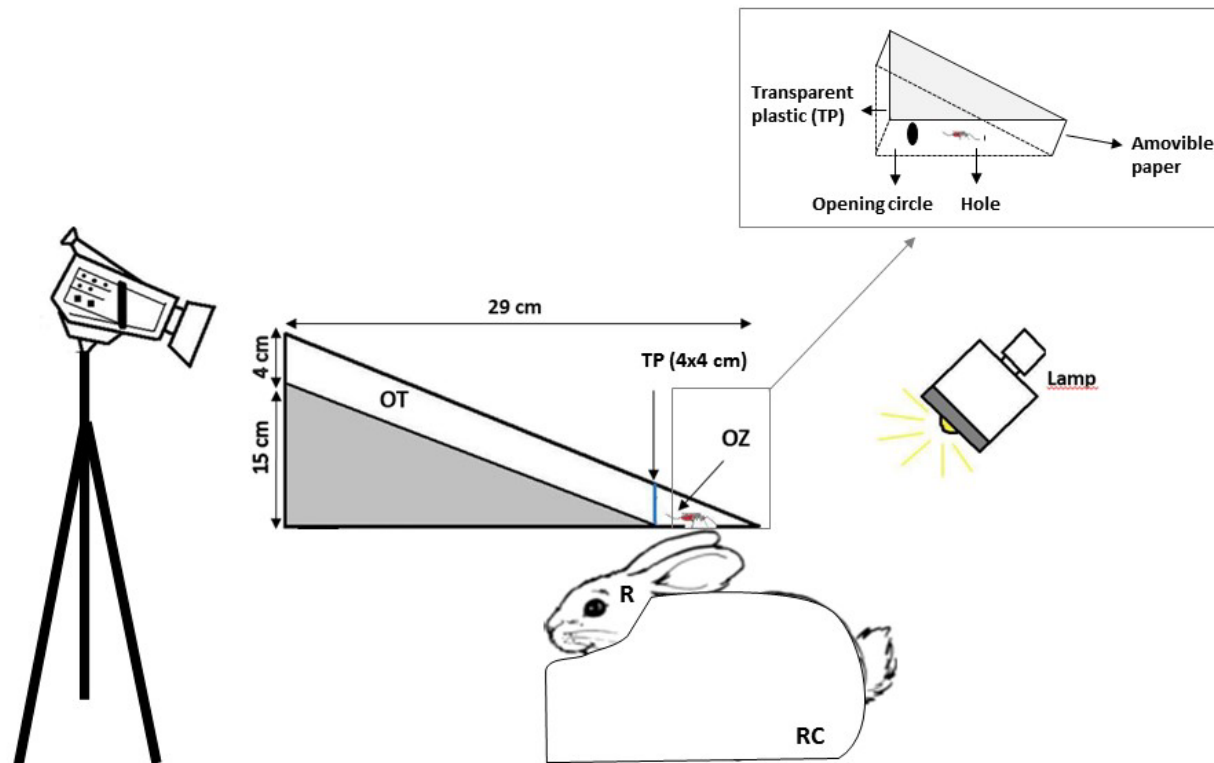
Tables
Table 1. Numbers of mosquito releases per genotype and treatment

Genotype	Treatment	N	fed	unfed
SS	Untreated	86	41	45
SS	Permethrin	50	10	40
SS	Deltamethrin	46	16	30
RS	Untreated	70	40	30
RS	Permethrin	43	17	26
RS	Deltamethrin	43	10	33
RR	Untreated	70	40	30
RR	Permethrin	53	41	12
RR	Deltamethrin	50	16	34

N=Number of females offered a blood meal.

Figures

Figure 1. Biting behavioural assay to monitor the biting behaviour. OT: Observational tunnel, TP: Transparent plastic, OZ: Observational zone (mosquito biting the rabbit ear), R: Rabbit RC: Restraining cage



Comportement de piqûre après exposition à des pyréthrinoïdes

Figure 2. Proportion of *Anopheles* females of each *kdr* genotype that had a blood meal after exposure for 30 seconds to (i) untreated net (ii) permethrin-treatment Olyset® Net, and (iii) deltamethrin-treatment PermaNet 2.0. Error bars represent the 95% binomial confidence intervals of the proportions. Significance of the different tests is indicated (^{ns} p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

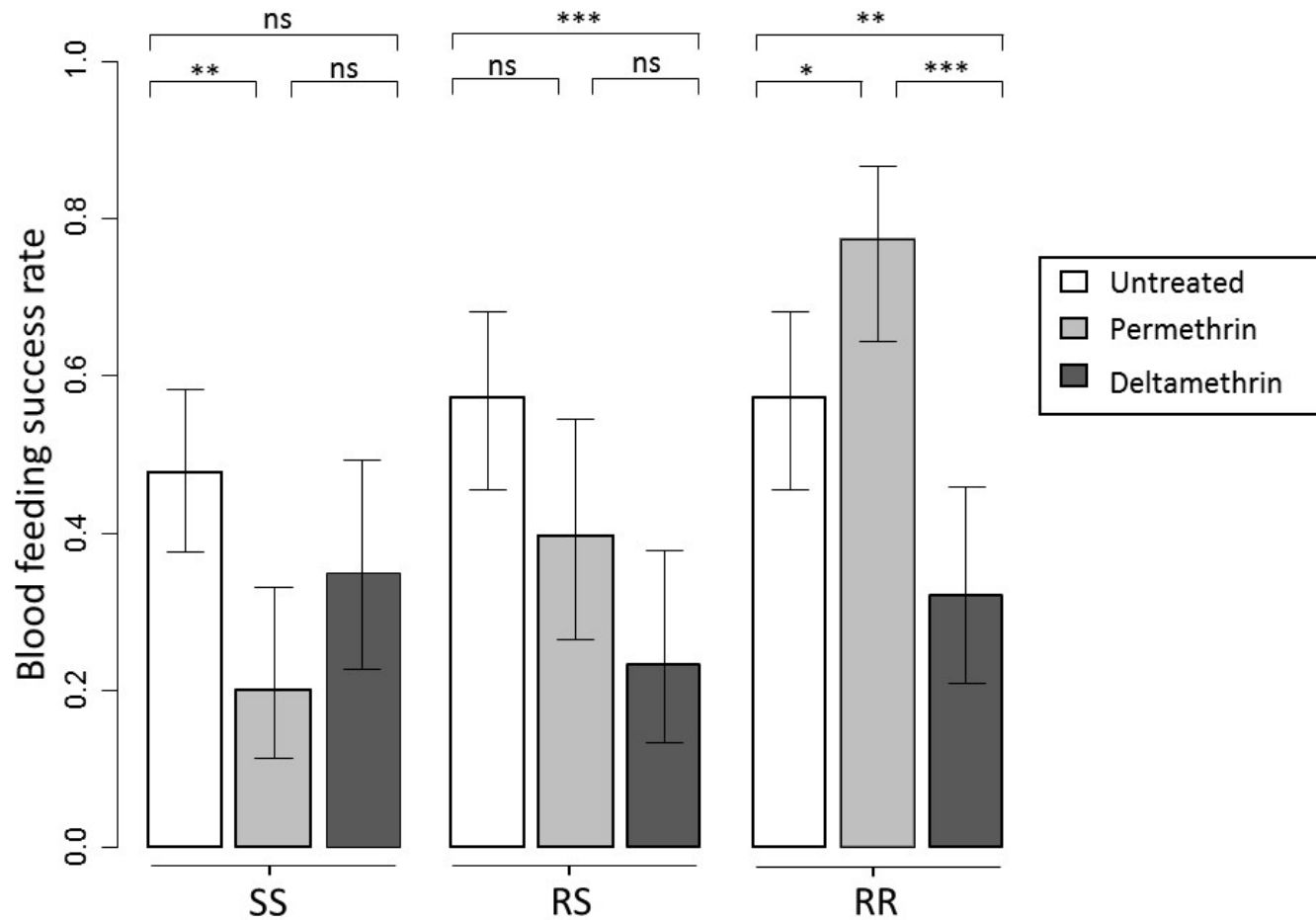
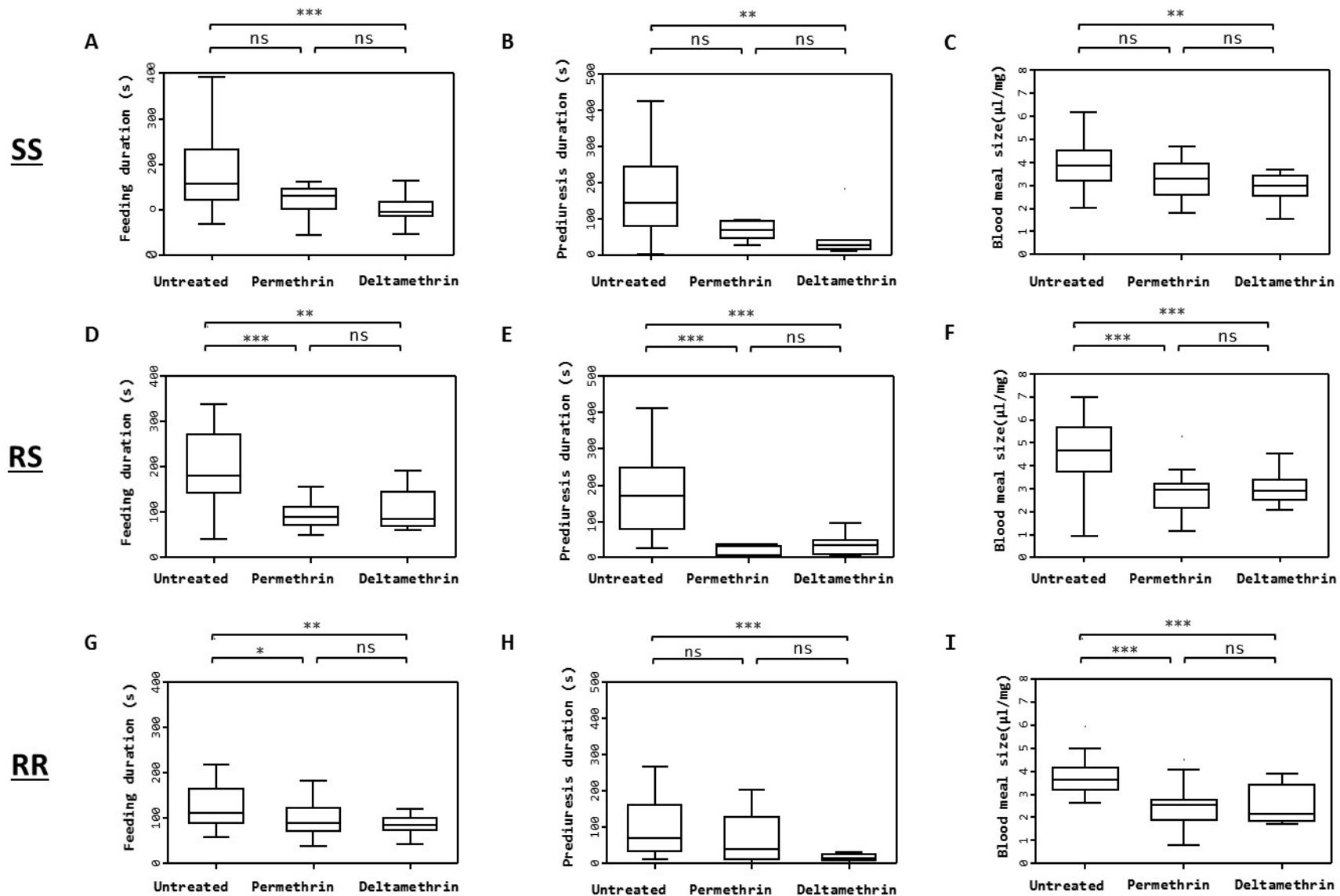


Figure 3. Biting behavioural parameters of *An. gambiae* exposed to untreated, permethrin-treated and deltamethrin-treated nettings relative to the *kdr* genotypes (SS, RS and RR)



Chapitre V : Conclusion & Perspectives

L'utilisation massive d'insecticides pour lutter à la fois contre les ravageurs des cultures, les vecteurs de maladies et les nuisibles a entraîné la sélection de mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations d'insectes (Georghiou 1972). Ces mécanismes de résistance peuvent être des adaptations physiologiques (mutation de cible, surexpression ou mutation d'enzymes de détoxification) (Brogdon & McAllister 1998; Hemingway *et al.* 2004; Ranson *et al.* 2011) ou comportementales (Pates & Curtis 2005; Chareonviriyaphap *et al.* 2013; Gatton *et al.* 2013). Ces dernières ont pour conséquence de limiter voire empêcher les contacts entre l'insecticide et l'insecte cible.

La réponse comportementale des vecteurs aux outils de LAV, jusqu'à présent peu étudiée, fait l'objet d'une attention particulière, car des études récentes ont montré des changements comportementaux préoccupants (Gatton *et al.* 2013; Russell *et al.* 2013; Moiroux *et al.* 2014). Le comportement des moustiques vecteurs est, en effet, un paramètre crucial de la capacité vectorielle d'une espèce anophélienne à transmettre des plasmodies humaines (Elliott 1972), et sur lequel se sont appuyés les scientifiques pour développer les outils de lutte antivectorielle (en particulier les moustiquaires imprégnées d'insecticide). Néanmoins les conséquences de la mise en place de ces outils sur la séquence comportementale de recherche de l'hôte jusqu'à la prise du repas sanguin restent encore largement inexplorées. Ce travail de thèse s'est focalisé sur l'influence de la présence d'une moustiquaire imprégnée d'insecticide sur le comportement de recherche de l'hôte précédant la piqûre et la piqûre après un contact non léthal en relation avec le génotype pour le locus de la mutation *kdr*.

Nous avons développé une approche phénotypique focalisant sur 3 étapes différentes du comportement de recherche du repas sanguin (le choix de l'hôte, le passage à travers la moustiquaire et la piqûre) en introduisant deux variables explicatives : 1) la présence ou non d'insecticide sur la moustiquaire et 2) le génotype *kdr*L1014F. Les résultats des expériences de chaque séquence comportementale ont

été discutés individuellement dans chaque chapitre. Dans le présent chapitre, nous discuterons nos résultats de façon transversale et leurs implications dans le contexte global de la recherche de repas sanguin en conditions naturelles. Ce travail original et préliminaire ouvre la voie à de nombreuses pistes de recherches. Nous développerons certaines de ces perspectives notamment celles déjà en cours d'exploration.

Modifications comportementales dues aux insecticides

L'évaluation sur le terrain des MILDs suggère que des modifications comportementales semblent être associées à la présence d'insecticide PYR sur les MILDs (Pates & Curtis 2005; Gatton *et al.* 2013) mais aussi qu'elles peuvent être modulées par les mécanismes de résistance (Corbel *et al.* 2010). Afin d'évaluer directement l'action des PYRs sur le comportement de recherche d'un repas de sang en relation avec la mutation *kdr*, nous avons analysé différents paramètres comportementaux avant et après le contact avec une moustiquaire traitée.

A l'aide d'un olfactomètre, nous avons montré que les moustiques homozygotes résistants (RR) pour cette mutation sont préférentiellement attirés que les homozygotes sensibles et hétérozygotes par l'hôte protégé par la moustiquaire traitée d'insecticide (chapitre 2). Au-delà de cette préférence pour la moustiquaire traitée, nous avons montré que la barrière physique de la moustiquaire (non traitée) modifie la réponse comportementale des moustiques aux odeurs de l'hôte et qu'il existe une variation de la réponse aux odeurs de l'hôte en présence de perméthrine entre les génotypes (chapitre 2). Au contact du support traité, nous avons observé une variabilité de l'activité comportementale de ces trois génotypes en termes d'exposition aux deux insecticides pyréthrinoïde (chapitre 3). L'exposition à la perméthrine entraîne une hyperactivité des homozygotes sensibles et des hétérozygotes en augmentant le temps et la vitesse de vol au contact du support traité comparé au support non traité, toutefois aucune différence de comportement n'est observée entre les trois génotypes au contact du support traité à la deltaméthrine comparé au support non traité.

Après un court contact (30 sec) avec une moustiquaire imprégnée de perméthrine, les moustiques homozygotes résistants ont montré un meilleur taux de gorgement sur l'hôte (chapitre 4). Nous avons également montré que la préexposition aux pyréthriinoïdes réduit le temps de gorgement, de prédiurèse ainsi que le volume de repas de sang des trois génotypes (chapitre 4).

La modulation de la réponse comportementale aux odeurs de l'hôte des *An. gambiae kdr*-résistants en présence d'insecticide (sans contact avec le support traité) suggère que ces moustiques sont capables de percevoir à distance la présence du support et du traitement. Pour tester cette hypothèse, un travail d'écologie chimique est en cours afin de déterminer si des composés volatils se dégagent des moustiquaires et s'ils induisent une réponse du système olfactif des moustiques. Dans le cas où rien ne serait dégagé ou si les composés présents sur la moustiquaire n'induisent pas de réponse électrophysiologique, nous nous intéresserons à l'analyse de la structure du panache d'odeurs attractives de l'hôte en présence d'un morceau de moustiquaire en modifiant l'approche développée par Geier et collaborateurs (1999) en utilisant des filets de moustiquaire et le tétrachlorure de titane pour analyser la distribution de la fumée dans un olfactomètre.

Si l'effet irritant par contact des pyréthriinoïdes sur les moustiques a été largement démontré au laboratoire (Chareonviriyaphap *et al.* 1997; Chandre *et al.* 2000; Cooperband & Allan 2009; Siegert *et al.* 2009), ses conséquences opérationnelles ne sont pas forcément intuitives. Il tend à réduire le contact des insectes avec les surfaces traitées et par la même leur exposition à l'effet toxique de l'insecticide. Cet effet protège le dormeur lorsque sa moustiquaire est trouée, mais la mortalité des moustiques est plus faible qu'avec des insecticides non irritants. L'autre effet difficile à apprécier est la répulsion à distance qui se manifeste par la réduction du taux d'entrée des moustiques (effet déterrent) dans les chambres équipées de moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïdes (Darriet 2007). Or ces insecticides ayant une très faible pression de vapeur saturante, ils sont considérés comme très peu volatils. Les méthodologies que nous avons utilisées dans les chapitres 2 et 3 (l'olfactomètre et le tunnel) sont moins contraignantes pour le moustique que les tests

classiques par contact forcé et laissent ainsi apparaître la variabilité de ses séquences comportementales. Nos résultats en olfactomètre n'ont pas mis en évidence d'effet répulsif à distance de la perméthrine. Ceci conforte des observations précédentes également réalisées en laboratoire (Cooperband & Allan 2009; Spitzen *et al.* 2014) mais ne correspond pas à certaines observations indirectes faites sur le terrain qui suggèrent un changement comportemental limitant le contact avec les PYRs (Pates & Curtis 2005; Gatton *et al.* 2013; Ndiath *et al.* 2014). Les expérimentations faites au laboratoire concernent des populations généralement sensibles aux insecticides ou dont les mécanismes de résistance sont bien caractérisés alors que les observations de terrain concernent des populations sauvages souvent porteuses de plusieurs mécanismes (comme décrit dans la synthèse bibliographique chapitre 1 p 20-21). Il est par conséquent très difficile d'émettre des hypothèses simples à tester pour expliquer ces différences. La seule certitude est le besoin urgent d'étudier les interactions entre les mécanismes de résistance et le comportement des populations sauvages.

En conditions semi-naturelles et naturelles, une seconde source de variabilité est liée directement au comportement des moustiques qui permet des contacts sublétaux suivis de temps de repos (qui peut permettre la dégradation de l'insecticide par le métabolisme). Dans ce contexte, le moustique reprend sa recherche de l'hôte après avoir été en contact avec un support traité d'insecticide et nous pouvons émettre l'hypothèse de l'apprentissage comme suggéré par (McCall & Kelly 2002; Alonso & Schuck-paim 2006). Des études récentes concernant la prise de repas sanguin d'*An. gambiae* ont montré un effet de l'expérience passée (visuelle ou olfactive) sur le choix de l'hôte suivant (Chilaka *et al.* 2012; Vantaux *et al.* 2014). En revanche, il n'existe à notre connaissance aucune étude testant l'hypothèse de l'apprentissage pour le comportement face à une molécule toxique (insecticide) chez les moustiques. Néanmoins, la réponse comportementale d'autres insectes aux toxines de plantes est modulée par l'expérience (Bernays 1995; Renwick 2001). Toutes ces études renforcent l'intérêt à tester l'hypothèse de l'apprentissage qui modifierait le comportement face au support traité d'insecticide pour limiter le contact.

Dans le chapitre 4, le résultat le plus marquant est l'augmentation du taux de piqûre (proportion de moustiques gorgés) des moustiques résistants après une exposition à la perméthrine. Chez *An gambiae*, l'exposition de souches résistantes à des doses sublétales de perméthrine modifie l'expression de nombreux gènes impliqués dans les synthèses métaboliques dont certains ne sont pas directement liés à la résistance (Vontas *et al.* 2005). Ces modifications d'expression se produisent progressivement après l'exposition à l'insecticide et généralement atteignent leur maximum après 6 heures (Vontas *et al.* 2005). La perméthrine peut aussi avoir un impact sur l'expression des gènes des glandes salivaires qui jouent un rôle potentiel dans la prise de repas de sang. Par exemple, une étude sur les tiques a montré que l'exposition à la perméthrine augmente l'activité des glandes salivaires et des cellules neuro-sécrétrices (Mohamed *et al.* 2000) mais là aussi compte tenu de leur comportement alimentaire les effets sont observables plusieurs heures après l'exposition. Le délai très court (1 mn) entre exposition à l'insecticide et contact avec le lapin dans notre étude n'était donc pas suffisant pour avoir un impact significatif sur la composition salivaire et expliquer le phénomène observé chez les résistants. Il s'agit plus probablement d'un effet de sur-stimulation "secondaire" lié à la sensibilité différente des homozygotes résistants et masqué chez les sensibles et les hétérozygotes par leur plus grande sensibilité à l'effet toxique des pyréthriinoïdes. Il est enfin possible que la composition salivaire constitutive des homozygotes résistants soit en partie intervenue dans nos résultats. Des différences d'expression des protéines salivaires, dont certaines liées au comportement trophique des femelles, ont été observées en association avec une autre mutation de cible, l'acétylcholinestérase insensible chez *Cx quinquefasciatus* et *An gambiae* (Djegbe *et al.* 2011; Cornélie *et al.* 2014). Le phénomène n'a pas été observé avec la deltaméthrine qui a provoqué un effet KD sur une partie des homozygotes résistants masquant également un éventuel effet excitateur de l'insecticide.

Au-delà de l'impact sur le taux de piqûre, la préexposition des trois génotypes aux pyréthriinoïdes a modifié le comportement de piqûre en réduisant le temps de gorgement, de prédiurèse ainsi que le volume de repas de sang. Pour les moustiques

qui ont réussi à prendre un repas sanguin, ces modifications peuvent avoir des conséquences sur la valeur sélective. Par exemple, la baisse du volume de repas peut réduire la fécondité des moustiques femelles, car la quantité de sang ingéré et le nombre d'œufs produit par une femelle anophèle sont corrélés positivement (Chadee *et al.* 2002). Le blocage de la prédiurèse chez la femelle anophèle pourrait perturber l'équilibre homéostatique et le processus de thermorégulation (Lahondère & Lazzari 2012) durant le gorgement mais aussi altérer son comportement de vol la rendant plus vulnérable à la prédation (Roitberg *et al.* 2003). Ces résultats obtenus sur les effets comportementaux d'un contact sublétal avec des PYRs méritent d'être renforcés et étendus à des populations de moustiques qui portent différents mécanismes de résistance et à des populations sauvages. Un point important à étudier sera l'impact de ces contacts sublétaux sur la valeur sélective des moustiques.

Le dernier point important que nos résultats ont révélé est la variabilité d'effet entre la perméthrine et la deltaméthrine dans les expériences des chapitres 3 et 4. L'exemple le plus marquant est l'effet inverse sur le taux de gorgement après un contact forcé avec une moustiquaire imprégnée de perméthrine ou de deltaméthrine (Chapitre 4). Leurs structures chimiques type I non α -cyanés (perméthrine) et type II α -cyanés (deltaméthrine) induisent des effets différents sur le système nerveux des moustiques notamment sur la cinétique d'ouverture des canaux sodiques (Davies *et al.* 2007). Ceci peut induire des différences dans l'expression de la résistance phénotypique (à la perméthrine et à la deltaméthrine) conférée par la mutation *kdr* (Burton *et al.* 2011). L'insecticide présent sur la moustiquaire et la technologie d'application sur la fibre sont donc des éléments extrêmement importants lorsqu'on s'intéresse au comportement des moustiques vecteurs face aux matériaux traités d'insecticides.

Valeur sélective, mutation *kdr* et traits comportementaux

La valeur sélective d'un génotype décrit sa capacité à se reproduire. Les traits d'histoire de vie sur lesquels repose cette valeur sélective sont la survie et la fécondité. Les moustiques femelles ont absolument besoin d'un repas sanguin pour la

maturation de leurs œufs. La présence d'outils de lutte tels que les moustiquaires imprégnées a pour but d'empêcher le contact avec l'individu (donc le repas sanguin) et de tuer les moustiques agressifs. Le comportement de recherche du repas sanguin en présence/absence des moustiquaires imprégnées a un impact certes indirect, mais important sur la valeur sélective des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes.

En l'absence d'insecticide, on note que l'activité spontanée des hétérozygotes est plus importante que les homozygotes sensibles et résistants (Chapitre 2) ; que tous les génotypes sont activés par les odeurs de lapins (Chapitre 2). D'autre part, on observe que les homozygotes sensibles et les hétérozygotes ont une capacité plus importante à trouver un trou dans une moustiquaire (Chapitre 3) et qu'il n'y a pas de différence entre les génotypes en ce qui concerne la capacité à prendre un repas sanguin sur le lapin (Chapitre 4). Parmi les moustiques ayant pris un repas sanguin, on note que 1) la piqûre et la prédiurèse ont été plus courtes pour les homozygotes résistants que pour les homozygotes sensibles et les hétérozygotes et 2) que le volume du repas a été plus important pour les hétérozygotes (Chapitre 4).

Chacun de ces phénotypes peut influencer positivement ou négativement sur la valeur sélective des différents génotypes. Dans la littérature, les mutations conférant la résistance aux insecticides (*Ace.1^R*, *Ester*) sont souvent associées à des coûts adaptatifs sur des traits d'histoire de vie (développement larvaire, reproduction, survie...) dans un environnement en absence de pression insecticide (Raymond *et al.* 2001; Kliot & Ghanim 2012). Le seul phénotype pour lequel nous avons identifié un coût de la mutation *kdr* est la performance à trouver un trou dans une moustiquaire non traitée (Chapitre 3).

Cette différence de performance était associée à une différence importante en termes de déplacement des différents génotypes. En effet, l'analyse des paramètres comportementaux montre que l'activité comportementale des moustiques résistants était réduite par rapport aux hétérozygotes et homozygotes sensibles. On note une baisse du temps de vol, du nombre et temps de contact avec la moustiquaire qui les sépare de l'hôte vertébré.

La mutation *kdr* semble modifier plus particulièrement l'activité comportementale des moustiques. D'autres études comportementales antérieures avaient mis en évidence que le gène de résistance *kdr* et la résistance métabolique associée à la résistance aux PYRs entraînaient une baisse de la réponse comportementale aux phéromones d'alarme chez le puceron et une absence de modification du comportement vol en fonction du gradient de température chez la mouche domestique (Foster *et al.* 2003). On peut donc émettre l'hypothèse que la mutation *kdr* modifie la perception des odeurs de notre cobaye et/ou la transduction du signal nerveux qui en découle. Ceci ouvre de nombreuses perspectives de recherche sur l'impact des mécanismes de résistance sur l'olfaction des moustiques vecteurs et les conséquences comportementales.

En plus d'un coût comportemental associé à la mutation *kdr*, une autre étude avait déjà mis en évidence récemment un coût de la mutation *kdr* sur les traits d'histoire de vie (développement larvaire et fécondité) avec un autre moustique d'intérêt médical, *Aedes aegypti* (Brito *et al.* 2013). La connaissance des coûts adaptatifs sur les traits comportementaux ou d'histoire de vie peut contribuer à la mise en place des stratégies de gestion de la résistance (voir la revue (Denholm & Rowland 1992). Une stratégie de gestion de résistance aux insecticides peut être envisagée dans les zones de résistance aux PYRs pour diminuer la fitness des moustiques *kdr* résistants par rotation dans le temps des classes insecticides avec différents modes d'action (WHO 2012).

Cette baisse de l'activité comportementale des homozygotes résistants dans le chapitre 3 soulève des questions sur les perturbations du système nerveux central occasionnées par la mutation *kdr*. La mutation *kdr* se situe sur le canal sodium voltage dépendant qui joue un rôle dans la transmission nerveuse. Il est possible que les mutations de cible au niveau du système nerveux central modifient la cinétique des neurotransmetteurs impliqués sur l'activité comportementale des moustiques. La présence de la mutation *kdr* réduit le coût génétique associé à l'acétylcholinestérase insensible chez *Cx quinquefasciatus*, démontrant qu'il existe des interactions étroites entre les différentes protéines impliquées dans le fonctionnement du système

nerveux (Berticat *et al.* 2008). D'autres neurotransmetteurs sont impliqués dans l'activité comportementale de recherche de l'hôte comme la dopamine (Fukumitsu *et al.* 2012). Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe une relation entre les moustiques portant des mutations affectant le système nerveux central et les différents neurotransmetteurs qui modulent leur comportement (Nässel & Winther 2010).

Face à une moustiquaire traitée d'insecticide PYR, les hétérozygotes ont montré une capacité plus importante à trouver un trou pour passer à travers que les homozygotes sensibles et résistants. Cette performance des individus hétérozygotes semble être associée à 2 effets antagonistes : d'une part le coût de la mutation *kdr* sur le comportement de recherche de l'hôte à l'état homozygote, et d'autre part l'avantage de l'allèle *kdr* pour résister à l'effet *knockdown*, fournissant des preuves d'un cas d'une superdominance au locus *kdr* pour un trait comportemental. Par ailleurs, cette tendance des hétérozygotes avec un comportement plus vigoureux (proportion plus importante ayant quitté la zone de lâcher) a été observée dans l'expérience de l'attractivité de l'hôte (chapitre 2). Ces résultats originaux apportent des informations cruciales pour la compréhension de l'évolution de la fréquence de la mutation *kdr* dans les populations naturelles. Ils peuvent notamment constituer un élément d'explication du fait que cette mutation ne se retrouve que très rarement fixée dans les populations naturelles (Lynd *et al.* 2010).

Limites méthodologiques

Les expérimentations sur l'analyse fine des séquences comportementales chez les moustiques au laboratoire sont encore très limitées. Nous avons concentré nos efforts sur le développement de nouveaux protocoles originaux, mais qui se sont parfois heurtés à des contraintes méthodologiques liées à notre matériel technique et/ou biologique. Dans cette section, nous allons suggérer de nouvelles approches expérimentales qui permettraient de compléter et surmonter certaines des limites de nos résultats.

Structure du flux d'air

Il existe un nombre important de dispositifs expérimentaux pour étudier le comportement des insectes et les techniques n'ont pas été standardisées. Pour évaluer l'effet de l'insecticide présent sur un support en présence des odeurs de l'hôte sur le choix de l'hôte, nous avons utilisé un olfactomètre en Y. Malgré une vitesse de flux d'air constant et stable, il était difficile de contrôler la structure du flux d'air dans notre dispositif où l'olfactomètre est relié à la source d'odeur externe. Cette variabilité du flux d'air, ainsi que la structure du panache d'odeur dans le dispositif peuvent moduler la réponse comportementale des moustiques. En effet Geier et collaborateurs (1999) ont montré que les moustiques *Ae. aegypti* répondent plus à un panache d'odeurs homogène qu'à un panache d'odeurs turbulent ou filamenteux. Il serait donc intéressant pour compléter nos résultats d'utiliser des tunnels de vol proposant un flux laminaire pour contrôler la structure du flux d'air et analyser les stratégies de vol des *Anopheles* (Smallegange *et al.* 2005; Cardé & Gibson 2010).

Rythme circadien des souches de laboratoires

L'élevage en insectarium de plusieurs souches d'*An. gambiae* impose des rythmes aux moustiques qui ne sont pas naturels. En effet, les repas de sang sont donnés en journée alors qu'*An. gambiae* est un moustique nocturne. Dans nos travaux, les moustiques ont bien répondu aux stimuli avec des taux d'activation et de gorgement autour de 50%. Néanmoins le rythme circadien peut influencer sur le comportement (Jones *et al.* 1974; Das & Dimopoulos 2008; Rund *et al.* 2011) mais aussi sur la résistance métabolique aux insecticides (Yang *et al.* 2010; Balmert *et al.* 2014). Nous ignorons toutefois quel rôle aurait pu jouer ce paramètre sur le comportement de ces souches de laboratoire.

Préférences trophiques

L'utilisation des animaux de laboratoire comme source d'odeurs peut constituer un biais. Une étude récente a montré qu'une population sauvage d'*An. coluzzi* avait une préférence pour le lapin par rapport au cochon d'Inde et que l'origine du repas de sang prélevé par les parents n'influence pas le choix du repas de sang de leur progéniture (Vantaux *et al.* 2014). Dans nos expériences, nous avons

utilisé deux types hôtes : un lapin (Chapitres 2 et 4) et un cochon d'Inde (Chapitre 3). Nos souches de moustiques sont maintenues au laboratoire sur un lapin. Il est possible que la réponse comportementale de nos souches de laboratoire varie en fonction de l'appât choisi. Ceci nous invite donc à la prudence dans l'interprétation des résultats entre les différents chapitres. Pour éviter tout facteur confondant lié aux odeurs de l'hôte dans l'étude d'une séquence comportementale, il conviendrait donc à l'avenir de choisir un hôte vertébré commun comme appât pour l'ensemble des expérimentations réalisées sachant que l'hôte préféré d'*An. gambiae*, l'humain, n'est pas envisageable pour des raisons éthiques et logistiques.

La lumière

Les insectes ont des yeux photosensibles et certaines longueurs d'onde peuvent influencer sur la réponse comportementale des moustiques. Une étude au laboratoire a montré que l'intensité de la lumière blanche et rouge pouvait modifier la vitesse de vol d'*An. gambiae* (Gibson 1995). Dans nos expériences, nous n'avons pas pu analyser le comportement des moustiques avec l'infrarouge. Le matériau utilisé pour construire nos tunnels réfléchissait la lumière infrarouge et rendait impossible la différenciation entre le moustique et les parois des tunnels. Dans le chapitre 3, nous avons utilisé une lumière bleue avec une longueur d'onde de 450 nm, dont l'intensité lumineuse a permis d'avoir un meilleur fond pour filmer et traquer le déplacement des moustiques avec le logiciel Ethovision XT. Mais nous ne pouvons écarter l'éventualité que cette source de lumière ait modifié le comportement des moustiques. Une amélioration à tester pour les prochaines expériences serait l'utilisation de l'infrarouge combiné à un fond bleu pour améliorer le « *tracking object* » avec Ethovision XT de Noldus.

Conditions contraignantes avant expérimentation

Les moustiques utilisés dans nos expériences n'ont jamais eu accès à un premier repas de sang. Des études montrent que ce premier repas jouerait un rôle dans la fabrication des réserves énergétiques (Takken *et al.* 1998). Ces réserves énergétiques sont utilisées par *An. gambiae* pendant le vol (Kaufmann & Briegel

2004). Nous ignorons à l'heure actuelle, l'effet direct de la première prise de sang sur l'intensité de la réponse comportementale aux odeurs de l'hôte au second cycle gonotrophique. Il se peut aussi que ce premier repas de sang puisse avoir un impact sur d'autres éléments de la physiologie du moustique (développement des ovaires et l'activité biosynthétique) (Briegel 1990a). Il serait intéressant de pouvoir comparer l'activité de recherche de l'hôte des moustiques avant et après ce premier repas de sang.

Perspectives

Modulation comportementale vis-à-vis des insecticides : les mécanismes sous-jacents impliqués

Au vu de nos travaux, la modulation de la réponse comportementale aux odeurs de l'hôte en présence de support traité d'insecticide semble être associée à la perception sensorielle entre les trois génotypes. La perception sensorielle passe par la détection des substances chimiques par les chémorécepteurs tarsaux (Hayes & Liu 1947; Feir *et al.* 1961; Nayak & Singh 1983) ou olfactives (Qiu *et al.* 2006; Su *et al.* 2009; Qiu & van Loon 2010). Après perception de ces stimuli par les récepteurs sensoriels, le système nerveux central doit intégrer l'information et l'associer à une réponse biologique appropriée (Ignell R 2010) (Figure 1).

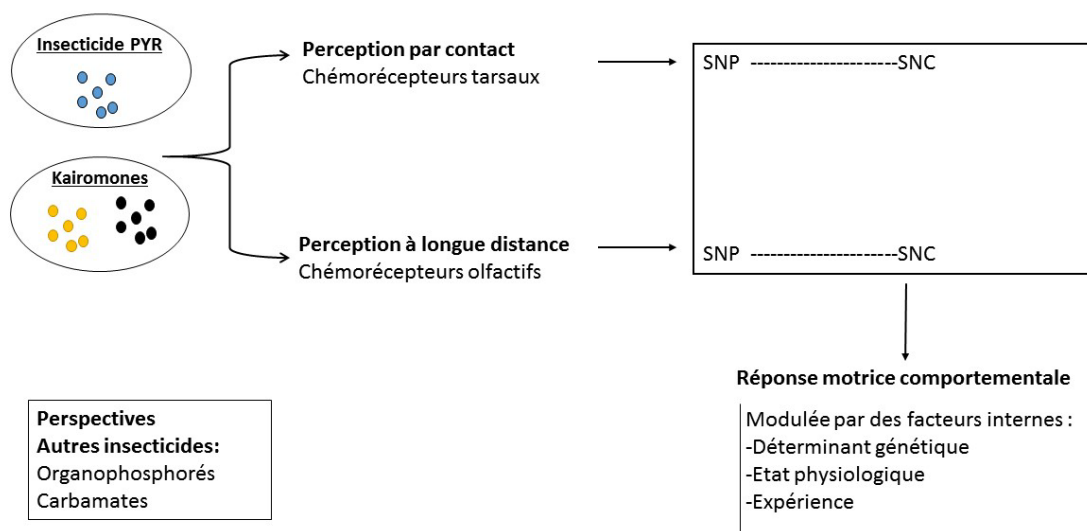


Figure 1. Perception et intégration du signal chimique

Au cours de nos travaux, nous avons testé l'influence de l'insecticide d'une moustiquaire sur l'attractivité d'un hôte. Dans la limite de cette approche phénotypique, nous n'avons pas pu étudier la réponse olfactive aux panaches d'odeur présente dans notre olfactomètre. La première perspective qui s'impose à nous est la recherche des composés volatils libérés par une moustiquaire traitée et perceptible par le moustique et l'étude de leurs effets sur la réponse nerveuse et comportementale des moustiques vecteurs. Dans la continuité de mes travaux, des captures d'odeurs émises par la moustiquaire traitée sont actuellement réalisées et leur perception par le système olfactif des moustiques étudiée sur un système expérimental couplant la chromatographie en phase gazeuse et la détection électro-antennographique (GC-EAD) (Christensen 2004).

Lorsqu'une molécule volatile arrive au niveau de l'antenne, elle doit d'abord traverser généralement la cuticule des sensilles *via* des pores. Une fois passée au travers de ces pores, la molécule se retrouve dans un compartiment rempli de lymphe et va être transportée par des protéines liant les odeurs (Odorant Binding Proteins ou OBPs) vers les récepteurs olfactifs spécifiques situés sur la membrane des neurones. Une fois la molécule odorante fixée sur le récepteur olfactif transmembranaire, une cascade de transduction va avoir lieu et engendrer l'émission de potentiels d'actions qui parcourront le nerf antennaire en direction du lobe antennaire. Ces messages nerveux sont ensuite intégrés dans le cerveau et donnent lieu à une réponse motrice. Les moustiques résistants aux PYRs possèdent une mutation sur le canal sodium voltage dépendant qui diminue la capacité des PYRs à modifier le fonctionnement du canal et l'excitabilité neuronale (Soderlund & Knipple 2003). On peut donc émettre l'hypothèse que cette modification du fonctionnement du canal sodium peut avoir des impacts à toutes les étapes neurologiques de la perception d'une odeur jusqu'à la réponse motrice. Il serait donc intéressant de pouvoir approfondir cette composante fonctionnelle neurologique des moustiques résistants par des analyses rigoureuses des profils de réponse des olfactory receptor neurons (ORNs) à travers des enregistrements individualisés de sensilles (Single Sensillum Recording) couplés à une chromatographie en phase gazeuse (GC) (Ignell R 2010) et des mesures de

l'activité électrique des neurones par la technique du patch-clamp et des microélectrodes (Meyer *et al.* 2008).

Phénotypes comportementaux et infection parasitaire

Nos travaux concernent une étape clé de la transmission du parasite responsable du paludisme. L'interaction parasite/vecteur sur le comportement de recherche d'un repas est donc une composante majeure de système vectoriel. Une revue de littérature sur les manipulations parasitaires a montré que l'infection parasitaire modifie le comportement des insectes. Cette modification se traduit par l'augmentation du nombre de repas de sang et une augmentation de la durée de piqûre (Hurd 2003). De plus, il a été montré que les moustiques femelles infectés sont significativement plus attirés par l'odeur de l'hôte que les moustiques non infectés (Smallegange *et al.* 2013). Récemment, les travaux étudiant la relation entre *Plasmodium*/vecteur, gènes de résistance et exposition aux insecticides ont montré que dans un premier temps les gènes de résistance modifient la compétence vectorielle d'*An gambiae* (Alout *et al.* 2013) et que l'infection parasitaire augmente la sensibilité aux insecticides pour les moustiques *kdr* résistants (Alout *et al.* 2014 b). Enfin l'exposition aux insecticides réduit la prévalence de l'infection à *P. falciparum* des moustiques résistants (Alout *et al.* 2014a). Dans nos travaux, nous avons travaillé avec des moustiques non infectés. Dans la continuité de mes travaux de thèse, il sera nécessaire d'étudier l'interaction parasite/vecteur, gène de résistance sur l'attractivité de l'hôte, et d'étudier son impact sur le comportement des moustiques face aux matériaux imprégnés.

Mécanismes de résistance et réponse comportementale aux insecticides

Dans cette thèse, nous avons développé des dispositifs expérimentaux pour étudier la séquence comportementale allant de l'attractivité de l'hôte, en passant par la capacité à passer à travers une moustiquaire trouée, jusqu'à la piqûre après l'exposition à un support traité d'insecticide (Figure 2).

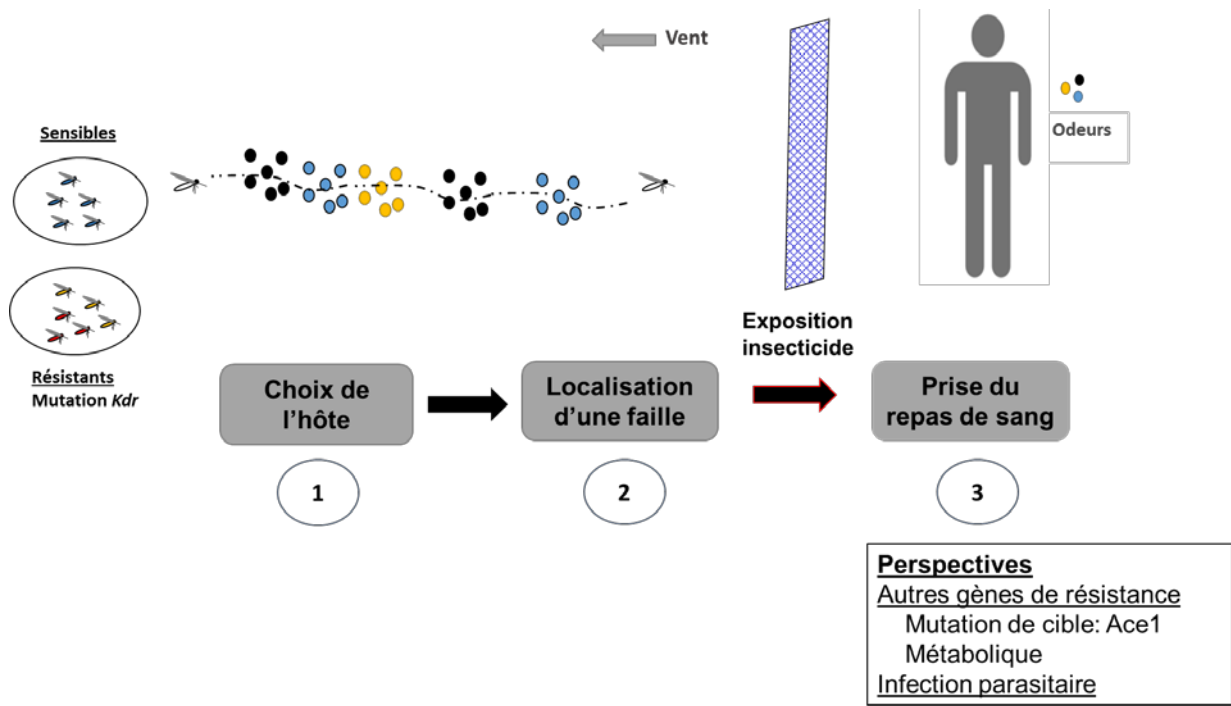


Figure 2. Différentes étapes de la séquence comportementale étudiée

Nous avons pu analyser l'influence du gène *kdr* sur la réponse comportementale aux insecticides PYRs. Néanmoins, la résistance aux pyréthrinoïdes n'est pas due uniquement à la mutation *kdr*, mais à différents mécanismes décrits brièvement en introduction (cf. chapitre I p20-21). La résistance métabolique aux PYRs dont plusieurs gènes ont été identifiés (Cytochrome P450, CYP6P3, CPY6M2) chez *An. gambiae* (Djouaka *et al.* 2008; Müller *et al.* 2008; Edi *et al.* 2014) est notamment présente dans de nombreuses populations contre lesquelles ont été détectées des baisses d'efficacité des outils de lutte classique (Corbel *et al.* 2007; N'Guessan *et al.* 2007; David *et al.* 2013; Toé *et al.* 2014). L'interaction entre ces mécanismes métaboliques et le comportement face aux outils de lutte est donc d'une importance capitale et constitue une perspective majeure dans la continuité de mes travaux de thèse. Au-delà de l'interaction des mécanismes physiologiques et du comportement de recherche de l'hôte, des adaptations comportementales en réponse à la pression insecticide ont été récemment décrites (Moiroux *et al.* 2012 b; Gatton *et*

al. 2013; Ndiath *et al.* 2014). Face à ce nouveau constat, il est nécessaire de s'intéresser plus finement au comportement des moustiques sauvages par une approche expérimentale afin de mieux caractériser les modifications comportementales en présence de matériaux imprégnés d'insecticide qui limitent l'efficacité et de s'interroger sur les mécanismes sous-jacents et leur évolution.

Conclusion

L'efficacité de lutte antivectorielle repose sur une meilleure connaissance de l'évolution de la réponse adaptative des moustiques aux insecticides. Les approches méthodologiques et les dispositifs expérimentaux développés durant ce travail de recherche constituent une première étape pour étudier la relation existante entre la résistance physiologique et la réponse comportementale aux outils de lutte antivectorielle. Notre approche phénotypique a permis de montrer que le gène *kdr* modifie la réponse comportementale vers un hôte protégé par un support traité d'insecticide pyréthrianoïde. En plus, nous avons observé que le génotype *kdr* pouvait modifier l'activité comportementale au contact d'un support traité. Une analyse du comportement des trois génotypes montre pour la première fois une meilleure performance des hétérozygotes pour le gène *kdr* à trouver une faille sur une moustiquaire traitée d'insecticide afin d'atteindre son hôte, ainsi qu'un coût comportemental associé à cette mutation pour les homozygotes résistants. En dernier lieu, ce travail de recherche montre qu'une exposition sub létale à des insecticides PYRs peut modifier les différentes étapes de la séquence de piqûre en réduisant la durée de la piqûre, de la prédiurèse et la quantité de sang ingérée.

Ces résultats montrent clairement la relation existante entre un mécanisme de résistance et la réponse comportementale à un environnement modifié par la présence d'un outil de lutte (la moustiquaire). Néanmoins, ces résultats restent difficiles à extrapoler sur des populations de terrain. Notre étude s'est basée sur une mutation conférant la résistance à une famille d'insecticide (pyréthrianoïde). Sur le terrain, les populations anophéliennes sont porteuses de plusieurs mécanismes de résistance permettant de contrecarrer l'arsenal chimique utilisé en lutte antivectorielle. Les coûts associés à ces mutations et l'interaction entre ces

mécanismes de résistance rendent difficile l'analyse du comportement des vecteurs. Ce travail de recherche original et préliminaire réalisé en condition contrôlée au laboratoire ouvre des perspectives de recherche pour approfondir l'étude du comportement des vecteurs portant sur d'autres mécanismes de résistance ainsi que le rôle joué par l'exposition à doses sublétales sur les mécanismes d'adaptation aux outils de lutte antivectorielle..

Ces travaux doivent être poursuivis sur une autre mutation (*Ace1^R*) répandue en Afrique due à l'introduction des organophosphorés et des carbamates en PIDs et en agriculture. Ces classes d'insecticide sont actuellement en cours d'évaluation à l'échelle communautaire grâce au projet President's Malaria Initiative (PMI) (Corbel *et al.* 2012; Osse *et al.* 2012; Agossa *et al.* 2014). Pour étudier l'évolution de la réponse comportementale des vecteurs aux PIDs, des approches expérimentales comme celles décrites dans cette thèse pourront contribuer à étudier l'influence des autres classes d'insecticides sur le comportement de recherche d'un hôte protégé.

Dans le contexte actuel d'élimination du paludisme, la résistance aux insecticides occupe une place centrale dans la mise en place des stratégies de lutte contre les vecteurs. Elle peut constituer un obstacle à l'efficacité des outils de lutte antivectorielle. Dans le passé, les études de lutte antivectorielle se sont plus intéressées à la mortalité induite par l'insecticide qu'à leur effet sur la séquence comportementale de recherche d'un hôte. IL ressort de nos travaux l'importance d'inclure les études comportementales des vecteurs dans les stratégies de gestion de la résistance aux insecticides afin de mieux comprendre les coûts adaptatifs et ainsi que les avantages sélectifs associés aux gènes de résistance. La poursuite d'études comportementales approfondies contribuera au développement de méthode de lutte pour cibler certains traits comportementaux et paramètres physiologiques cruciaux à la survie des vecteurs. D'autres travaux devront être menés pour analyser les mécanismes fonctionnels sous-jacents à ces phénotypes comportementaux. Enfin dans une optique de lutte intégrée contre les vecteurs, la recherche sur le comportement des populations naturelles d'*An. gambiae* devra inclure la composante

parasitaire, qui est essentielle pour comprendre la complexité du système parasite/vecteur/hôte humain dans l'évolution de la transmission du paludisme.

Références bibliographiques

1.
Achee, N.L., Sardelis, M.R., Dusfour, I., Chauhan, K.R. & Grieco, J.P. (2009). Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds ¹. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25, 156–167
2.
Agossa, F.R., Aïkpon, R., Azondékon, R., Govoetchan, R., Padonou, G.G., Oussou, O., *et al.* (2014). Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108, 84–91
3.
Alonso, W.J. & Schuck-paim, C. (2006). The “ghosts” that pester studies on learning in mosquitoes: guidelines to chase them off. *Medical and veterinary entomology*, 20, 157–165
4.
Alout, H., Djegbe, I., Chandre, F., Djogbenou, L.S., Dabire, R.K., Corbel, V., *et al.* (2014a). Insecticide exposure impacts vector-parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281
5.
Alout, H., Ndam, N.T., Sandeu, M.M., Djegbe, I., Chandre, F., Dabire, R.K., *et al.* (2013). Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PloS one*, 8, e63849
6.
Alout, H., Yameogo, B., Djogbenou, L.S., Chandre, F., Dabire, R.K., Corbel, V., *et al.* (2014b). Interplay Between *Plasmodium* Infection and Resistance to Insecticides in Vector Mosquitoes. *The Journal of infectious diseases*
7.
Apperson, C.S. & Georghiou, G.P. (1975). Mechanisms of Resistance to Organophosphorus Insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of Economic Entomology*, 68, 153–157
8.
Arama, C. & Troye-Blomberg, M. (2014). The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med*, 275, 456–466
- 9.

Arredondo-Jiménez, J.I., Rodríguez, M.H., Loyola, E.G. & Bown, D.N. (1997). Behaviour of *Anopheles albimanus* in relation to pyrethroid-treated bednets. *Medical and Veterinary Entomology*, 11, 87–94

10.

Balmert, N.J., Rund, S.S.C., Ghazi, J.P., Zhou, P. & Duffield, G.E. (2014). Time-of-day specific changes in metabolic detoxification and insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology*, 64, 30–39

11.

Beck, S.D. (2012). *Insect Photoperiodism*. Elsevier

12.

Beklemishev, W.N. & Detinova, T.S. (1940). The physiological cycle of Malpighian tubes in female *A. superpictus* Grassi. *Vop. Fiziol. Ekol. Malar. Komara*, 1, 65

13.

Bernays, E. (1995). Effects of experience on host-plant selection. *Chemical ecology of insects*, 2, 47–64

14.

Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M. & Corbel, V. (2008). Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC evolutionary biology*, 8, 104

15.

Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. & Chevillon, C. (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical research*, 79, 41–47

16.

Bevenue, A. (1976). The “bioconcentration” aspects of DDT in the environment. In: *Residue Reviews*, Residue Reviews (eds. Gunther, F.A. & Gunther, J.D.). Springer New York, pp. 37–112

17.

Beyenbach, K.W. & Piermarini, P.M. (2009). Osmotic and ionic regulation in insects. *Osmotic and ionic regulation: cells and animals*, 231–293

18.

Bøgh, C., Pedersen, E.M., Mukoko, D.A. & Ouma, J.H. (1998). Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 52–59

19.

Bohbot, J.D., Lu, T. & Zwiebel, L.J. (2010). Molecular regulation of olfaction in

mosquitoes. *Olfaction in vector-host interactions. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers*, 17–38

20.

Bongfen, S.E., Laroque, A., Berghout, J. & Gros, P. (2009). Genetic and genomic analyses of host-pathogen interactions in malaria. *Trends in Parasitology*, 25, 417–422

21.

Briegel, H. (1990a). Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*, 27, 839–850

22.

Briegel, H. (1990b). Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*, 27, 839–850

23.

Briegel, H. & Lea, A.O. (1975). Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 21, 1597–1604

24.

Briegel, H. & Rezzonico, L. (1985). Concentration of host blood protein during feeding by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 22, 612–618

25.

Brito, L.P., Linss, J.G.B., Lima-Camara, T.N., Belinato, T.A., Peixoto, A.A., Lima, J.B.P., *et al.* (2013). Assessing the Effects of Aedes aegypti kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS ONE*, 8, e60878

26.

Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerging infectious diseases*, 4, 605

27.

Brown, M.R., Klowden, M.J., Crim, J.W., Young, L., Shrouder, L.A. & Lea, A.O. (1994). Endogenous regulation of mosquito host-seeking behavior by a neuropeptide. *Journal of Insect Physiology*, 40, 399–406

28.

Bruce-Chwatt, L.J. (1984). Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication era. *Bull World Health Organ*, 62, 19–29

29.

Burton, M.J., Mellor, I.R., Duce, I.R., Davies, T., Field, L.M. & Williamson, M.S. (2011). Differential resistance of insect sodium channels with kdr mutations to

deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41, 723–732

30.

Campo, J.J., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Aide, P., Nhabomba, A.J., Dobaño, C., *et al.* (2014). Duration of vaccine efficacy against malaria: 5th year of follow-up in children vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique. *Vaccine*, 32, 2209–2216

31.

Cardé, R.T. & Gibson, G. (2010). Host finding by female mosquitoes: mechanisms of orientation to host odours and other cues. *Olfaction in vector-host interactions*, 115–142

32.

Carnevale, P., Robert, V., Manguin, S., Corbel, V., Fontenille, D., Garros, C., *et al.* (2009). *Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. Didactiques. IRD, Marseille

33.

Casida, J.E. (1963). Mode of Action of Carbamates. *Annual Review of Entomology*, 8, 39–58

34.

Casida, J.E. & Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 58, 99–117

35.

Chadee, D.D., Beier, J.C. & Mohammed, R.T. (2002). Fast and slow blood-feeding durations of *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad. *Journal of vector ecology*, 27, 172–177

36.

Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J., *et al.* (1999). Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*, 77, 230–234

37.

Chandre, F., Darriet, F., Duchon, S., Finot, L., Manguin, S., Carnevale, P., *et al.* (2000). Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 81–88

38.

Chareonviriyaphap, T., Bangs, M.J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V. & Ngoen-Klan, R. (2013). Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors*, 6, 280

39.

Chareonviriyaphap, T., Prabaripai, A. & Sungvornyothin, S. (2002). An improved excito-repellency test chamber for mosquito behavioral tests. *Journal of vector ecology*, 27, 250–252

40.

Chareonviriyaphap, T., Roberts, D.R., Andre, R.G., Harlan, H.J., Manguin, S. & Bangs, M.J. (1997). Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 13, 171–183

41.

Chavasse, D.C. & Yap, H.H. (1997). Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance*.

42.

Chilaka, N., Perkins, E. & Tripet, F. (2012). Visual and olfactory associative learning in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*

43.

Christensen, T.A. (2004). *Methods in Insect Sensory Neuroscience*. CRC Press

44.

Clements, A.N. (1992). *The Biology of Mosquitoes: Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction*. First edition. CABI, Wallingford

45.

Clements, A.N. (1999). *The Biology of Mosquitoes, Volume 2: Sensory, Reception, and Behaviour*. First edition. CABI, Wallingford u.a.

46.

Coats, J.R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 255

47.

Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, M.B. & Besansky, N.J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619, 246–274

48.

Cohuet, A., Harris, C., Robert, V. & Fontenille, D. (2010). Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends in parasitology*, 26, 130–136

49.

Coluzzi, M., Sabatini, A., della Torre, A., Di Deco, M.A. & Petrarca, V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298, 1415–1418

50.

Cooperband, M.F. & Allan, S.A. (2009). Effects of Different Pyrethroids on Landing Behavior of Female *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 46, 292–306

51.

Coosemans, M. & Carnevale, P. (1995). Malaria vector control: a critical review of chemical methods and insecticides. In: *ANNALES-SOCIETE BELGE DE MEDECINE TROPICALE*. INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE, pp. 13–13

52.

Corbel, V., Akogbeto, M., Damien, G.B., Djenontin, A., Chandre, F. & Rogier, C. (2012). Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.*, 12

53.

Corbel, V., Chabi, J., Dabiré, R.K., Etang, J., Nwane, P., Pigeon, O., *et al.* (2010). Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malar J*, 9, 113

54.

Corbel, V. & N’Guessan, R. (2013). Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review

55.

Corbel, V., N’Guessan, R., Brengues, C., Chandre, F., Djogbenou, L., Martin, T., *et al.* (2007). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta tropica*, 101, 207–16

56.

Cornelie, S., Rossignol, M., Seveno, M., Demetere, E., Mouchet, F., Djègbè, I., *et al.* (2014). Salivary Gland Proteome Analysis Reveals Modulation of Anopheline Unique Proteins in Insensitive Acetylcholinesterase Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *PLoS ONE*, 9, e103816

57.

Costantini, C., Gibson, G., Sagnon, N.F., Torre, A.D., Brady, J. & Coluzzi, M. (1996). Mosquito responses to carbon dioxide in B West African Sudan savanna village. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, 220–227

58.

Darriet, F. (1991). Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyréthrinoïdes dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme. *Parassitologia*, 33, 111–111

59.

Darriet, F. (2007). *Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides*. IRD éditions

60.

Darriet, F., Robert, V., Vien, N.T., Carnevale, P., Organization, W.H. & others. (1984). Evaluation of the efficacy of Permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria/by F. Darriet...[et al.]

61.

Das, S. & Dimopoulos, G. (2008). Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC Physiology*, 8, 23

62.

David, J.-P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A. & Paine, M.J.I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368, 20120429

63.

Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R. & Williamson, M.S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59, 151–162

64.

Davis, P.W. & Wedemeyer, G.A. (1971). Na⁺, K⁺-activated-ATPase inhibition in rainbow trout: a site for organochlorine pesticide toxicity? *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 40, 823–827

65.

Deletre, E., Martin, T., Campagne, P., Bourguet, D., Cadin, A., Menut, C., *et al.* (2013). Repellent, Irritant and Toxic Effects of 20 Plant Extracts on Adults of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Mosquito. *PLoS ONE*, 8, e82103

66.

Denholm, I. & Rowland, M.W. (1992). Tactics for Managing Pesticide Resistance in Arthropods: Theory and Practice. *Annual Review of Entomology*, 37, 91–112

67.

Djègbè, I., Boussari, O., Sidick, A., Martin, T., Ranson, H., Chandre, F., *et al.* (2011). Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J*, 10, 10–1186

68.

Djegbe, I., Cornelie, S., Rossignol, M., Demetere, E., Seveno, M., Remoue, F., *et al.* (2011). Differential expression of salivary proteins between susceptible and insecticide-resistant mosquitoes of *Culex quinquefasciatus*. *PLoS one*, 6, e17496

69.

Djouaka, R., Bakare, A., Coulibaly, O., Akogbeto, M., Ranson, H., Hemingway, J., *et al.* (2008). Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* ss from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics*, 9, 538

70.

Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*, 7, 17–30

71.

Du, W., Awolola, T.S., Howell, P., Koekemoer, L.L., Brooke, B.D., Benedict, M.Q., *et al.* (2005). Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology*, 14, 179–183

72.

Edi, C.V., Djogbénou, L., Jenkins, A.M., Regna, K., Muskavitch, M.A.T., Poupardin, R., *et al.* (2014). CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*, 10, e1004236

73.

Elliott, R. (1972). The Influence of Vector Behavior on Malaria Transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 21, 755–763

74.

Enayati, A.A., Ranson, H. & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14, 3–8

75.

Enayati, A. & Hemingway, J. (2010). Malaria management: past, present, and future. *Annual review of entomology*, 55, 569–591

76.

Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P., *et al.* (2006). First Report of Knockdown Mutations in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* from Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 74, 795–797

77.

Feir, D., Lengy, J.I. & Owen, W.B. (1961). Contact chemoreception in the mosquito,

Culiseta inornata (Williston); Sensitivity of the tarsi and labella to sucrose and glucose. *Journal of Insect Physiology*, 6, 13–20

78.

Foster, S., Young, S., Williamson, M., Duce, I., Denholm, I. & Devine, G. (2003). Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity*, 91, 98–106

79.

Foster, W.A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology*, 40, 443–474

80.

Fukumitsu, Y., Irie, K., Satho, T., Aonuma, H., Dieng, H., Ahmad, A.H., *et al.* (2012). Elevation of dopamine level reduces host-seeking activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*, 5, 92

81.

Fulton, M.H. & Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 37–45

82.

Garrett-Jones, C. (1964). Prognosis for Interruption of Malaria Transmission Through Assessment of the Mosquito's Vectorial Capacity. *Nature*, 204, 1173–1175

83.

Gatton, M.L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M.J., Ghani, A.C., Godfray, H.C.J., *et al.* (2013). The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution*, 67, 1218–1230

84.

Geier, M., Bosch, O.J. & Boeckh, J. (1999). Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. *Journal of Experimental Biology*, 202, 1639–1648

85.

Geissbühler, Y., Chaki, P., Emidi, B., Govella, N.J., Shirima, R., Mayagaya, V., *et al.* (2007). Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malaria journal*, 6, 126

86.

Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J.R. & Caccone, A. (2002). Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* ss, and the problem of taxonomic status. *Genetics*, 161, 1561–1578

87.

Georghiou, G.P. (1972). The evolution of resistance to pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3, 133–168

88.

Gibson, G. (1995). A behavioural test of the sensitivity of a nocturnal mosquito, *Anopheles gambiae*, to dim white, red and infra-red light. *Physiological Entomology*, 20, 224–228

89.

Gibson, G. & Torr, S.J. (1999). Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and veterinary entomology*, 13, 2–23

90.

Gillies, M.T. & Wilkes, T.J. (1965). A study of the age-composition of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *A. funestus* Giles in North-Eastern Tanzania. *Bulletin of entomological research*, 56, 237–262

91.

Grieco, J.P., Achee, N.L., Andre, R.G. & Roberts, D.R. (2000). A comparison study of house entering and exiting behavior of *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae) using experimental huts sprayed with DDT or deltamethrin in the southern district of Toledo, Belize, CA. *Journal of Vector Ecology*, 25, 62–73

92.

Grieco, J.P., Achee, N.L., Chareonviriyaphap, T., Suwonkerd, W., Chauhan, K., Sardelis, M.R., *et al.* (2007). A New Classification System for the Actions of IRS Chemicals Traditionally Used For Malaria Control. *PLoS ONE*, 2, e716

93.

Harbach, R. (2013). The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In: *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors* (ed. Manguin, S.). InTech

94.

Hayes, W.P. & Liu, Y.-S. (1947). Tarsal chemoreceptors of the housefly and their possible relation to DDT toxicity. *Annals of the Entomological Society of America*, 40, 401–416

95.

Hemingway, J. (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 1009–1015

96.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. & Ranson, H. (2004). The molecular basis

of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34, 653–665

97.

Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 45, 371–391

98.

Homyk, T. & Sheppard, D.E. (1977). Behavioral mutants of *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and mapping of mutations which decrease flight ability. *Genetics*, 87, 95–104

99.

Howard, A.F., Zhou, G. & Omlin, F.X. (2007). Malaria mosquito control using edible fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. *BMC Public Health*, 7, 199

100.

Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology*, 48, 141–161

101.

Ignell R, S.M., Hill SR and Hansson BS,. (2010). Odour coding and neural connections. In: *Olfaction in vector-host interactions* (eds. Takken, W. & Knols, B.). Wageningen Academic Publisher, Wageningen, pp. 63–90

102.

Jones, M.D.R., Cubbin, C.M. & Marsh, D. (1972). The Circadian Rhythm of Flight Activity of the Mosquito *Anopheles Gambiae*: The Light-Response Rhythm. *J Exp Biol*, 57, 337–346

103.

Jones, M.D.R. & Gubbins, S.J. (1977). Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* after insemination. *Nature*, 268, 731–732

104.

Jones, M.D.R. & Gubbins, S.J. (1978). Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiological Entomology*, 3, 213–220

105.

Jones, M.D.R., Gubbins, S.J. & Cubbin, C.M. (1974). Circadian flight activity in four sibling species of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 64, 241–246

106.

Kaufmann, C. & Briegel, H. (2004). Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *Journal of vector ecology*, 29, 140–153

107.

Kilpatrick, J.W. & Schoof, H.F. (1958). A Field Strain of Malathion-Resistant House Flies. *Journal of Economic Entomology*, 51, 18–19

108.

Kliot, A. & Ghanim, M. (2012). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68, 1431–1437

109.

Klowden, M.J. & Briegel, H. (1994). Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 31, 618–622

110.

Kongmee, M., Boonyuan, W., Achee, N.L., Prabaripai, A., Lerdthusnee, K. & Chareonviriyaphap, T. (2012). Irritant and repellent responses of *Anopheles harrisoni* and *Anopheles minimus* upon exposure to bifenthrin or deltamethrin using an excito-repellency system and a live host. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28, 20–29

111.

Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E. & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 313–319

112.

Lahondère, C. & Lazzari, C.R. (2012). Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid overheating. *Current Biology*, 22, 40–45

113.

Lazzari, C.R. & Insausti, T.C. (2008). Circadian rhythms in insects

114.

Lefevre, T., Gouagna, L.-C., Dabire, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., *et al.* (2009). Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s.s. when humans are not readily accessible. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 1023–1029

115.

Lefèvre, T., Vantaux, A., Dabiré, K.R., Mouline, K. & Cohuet, A. (2013). Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS pathogens*, 9, e1003365

116.

Lehane, M.J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge University Press

117.

Lengeler, C. & others. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, 2

118.

Lindsay, S.W., Adiamah, J.H., Miller, J.E. & Armstrong, J.R.M. (1991). Pyrethroid-treated bednet effects on mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex in The Gambia. *Medical and veterinary entomology*, 5, 477–483

119.

Lindsay, S.W., Parson, L. & Thomas, C.J. (1998). Mapping the range and relative abundance of the two principal African malaria vectors, *Anopheles gambiae sensu stricto* and *An. arabiensis*, using climate data. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265, 847–854

120.

Lockwood, J.A., Sparks, T.C. & Story, R.N. (1984). Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 30, 41–51

121.

Lynd, A., Weetman, D., Barbosa, S., Yawson, A.E., Mitchell, S., Pinto, J., *et al.* (2010). Field, Genetic, and Modeling Approaches Show Strong Positive Selection Acting upon an Insecticide Resistance Mutation in *Anopheles gambiae* s.s. *Mol Biol Evol*, 27, 1117–1125

122.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., *et al.* (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.*, 7, 179–184

123.

Mboera, L.E.G. & Takken, W. (1997). Carbon dioxide chemotropism in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and its potential in vector surveillance and management programmes. *Rev Med Vet Entomol*, 85, 355–368

124.

McCall, P.J. & Kelly, D.W. (2002). Learning and memory in disease vectors. *Trends in parasitology*, 18, 429–433

125.

Meyer, D.A., Carter, J.M., Johnstone, A.F.M. & Shafer, T.J. (2008). Pyrethroid modulation of spontaneous neuronal excitability and neurotransmission in hippocampal neurons in culture. *NeuroToxicology*, 29, 213–225

126.

Miller, J.R., Siegert, P.Y., Amimo, F.A. & Walker, E.D. (2009). Designation of Chemicals in Terms of the Locomotor Responses They Elicit From Insects: An Update of Dethier et al. (1960). *Journal of Economic Entomology*, 102, 2056–2060

127.

Mohamed, F.S.A., Abbassy, M.M., Darwish, Z.E.A., Tetreault, G.E., Marzouk, A.S., Shoukry, M.A., *et al.* (2000). Effects of Permethrin on the Salivary Glands and Neuroendocrine Organs of Unfed Female *Hyalomma (Hyalomma) dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 37, 393–400

128.

Moiroux, N., Boussari, O., Djènontin, A., Damien, G., Cottrell, G., Henry, M.-C., *et al.* (2012a). Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, West Africa. *PLoS One*, 7, e30558

129.

Moiroux, N., Damien, G.B., Egrot, M., Djenontin, A., Chandre, F., Corbel, V., *et al.* (2014). Human Exposure to Early Morning *Anopheles funestus* Biting Behavior and Personal Protection Provided by Long-Lasting Insecticidal Nets. *PLoS ONE*, 9, e104967

130.

Moiroux, N., Gomez, M.B., Pennetier, C., Elanga, E., Djenontin, A., Chandre, F., *et al.* (2012b). Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *Journal of Infectious Diseases*, 206, 1622–1629

131.

Mouchet, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext

132.

Muirhead-Thomson, R.C. (1960). The significance of irritability, behavioural avoidance and allied phenomena in malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization*, 22, 721

133.

Müller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., *et al.* (2008). Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS genetics*, 4, e1000286

134.

Mutero, C.M. & Birley, M.H. (1987). Estimation of the survival rate and oviposition cycle of field populations of malaria vectors in Kenya. *Journal of applied ecology*, 853–863

135.

Mwangangi, J.M., Mbogo, C.M., Orindi, B.O., Muturi, E.J., Midega, J.T., Nzovu, J., *et al.* (2013). Shifts in malaria vector species composition and transmission dynamics along the Kenyan coast over the past 20 years. *Malar J*, 12, 13

136.

Nässel, D.R. & Winther, A.A. (2010). Drosophila neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in neurobiology*, 92, 42–104

137.

Nayak, S.V. & Singh, R.N. (1983). Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster meigen* (Diptera: Drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 12, 273–291

138.

Ndiath, M.O., Mazonot, C., Sokhna, C. & Trape, J.F. (2014). How the malaria vector *Anopheles gambiae* adapts to the use of insecticide-treated nets by African populations. *PLoS One*, 9

139.

N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbéto, M. & Rowland, M. (2007). Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging infectious diseases*, 13, 199

140.

Nijhout, H.F. & Carrow, G.M. (1978). Diuresis after a bloodmeal in female *Anopheles freeborni*. *Journal of Insect Physiology*, 24, 293–298

141.

Osse, R., Aikpon, R., Padonou, G.G., Oussou, O., Yadouleton, A. & Akogbeton, M. (2012). Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasites & vectors*, 5, 163

142.

Pates, H. & Curtis, C. (2005). Mosquito behavior and vector control. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 53–70

143.

Pfeil, J., Sepp, K.J., Heiss, K., Meister, M., Mueller, A.-K. & Borrmann, S. (2014).

Protection against malaria by immunization with non-attenuated sporozoites under single-dose piperazine-tetraphosphate chemoprophylaxis. *Vaccine*, 32, 6005–6011

144.

Pinto, J., Lynd, A., Elissa, N., Donnelly, M.J., Costa, C., Gentile, G., *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, 27–32

145.

Pinto, J., Lynd, A., Vicente, J.L., Santolamazza, F., Randle, N.P., Gentile, G., *et al.* (2007). Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, 2, e1243

146.

Plowe, C.V. (2009). The evolution of drug-resistant malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103 Suppl 1, S11-4

147.

Pluthero, F.G. & Singh, R.S. (1984). Insect behavioural responses to toxins: Practical and evolutionary considerations. *The Canadian Entomologist*, 116, 57–68

148.

Prasad, R.S. (1985). Behavioural analysis of feeding and reproduction in haematophagous insects. *Proc Ani Sci*, 94, 225–238

149.

Qiu, Y.T., van Loon, J.J., Takken, W., Meijerink, J. & Smid, H.M. (2006). Olfactory coding in antennal neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chemical Senses*, 31, 845–863

150.

Qiu, Y.T. & van Loon, J.J. (2010). Olfactory physiology of blood-feeding vector mosquitoes. *Olfaction in vector-host interactions*, 39–61

151.

Ranson, H. & Hemingway, J. (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 226–241

152.

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. & Collins, F.H. (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9, 491–497

153.

Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z. & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol*, 27

154.

Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., *et al.* (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical journal*, 359, 295–304

155.

Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. & Chevillon, C. (2001). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: What have we learned about adaptation? In: *Microevolution Rate, Pattern, Process, Contemporary Issues in Genetics and Evolution* (eds. Hendry, A.P. & Kinnison, M.T.). Springer Netherlands, pp. 287–296

156.

RBM. (2011). *Refined/updated GMAP objectives, targets, milestones and priorities beyond 2011*. Roll Back Malaria Partnership, Geneva

157.

Renwick, J.A.A. (2001). Variable Diets and Changing Taste in Plant–Insect Relationships. *J Chem Ecol*, 27, 1063–1076

158.

Rivero, A., Vezilier, J., Weill, M., Read, A.F. & Gandon, S. (2010). Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog*, 6, e1001000

159.

Robert, V. & Brey, P.T. (1998). Biting physiology of *Anopheles* affecting *Plasmodium* transmission. *Research and Reviews in Parasitology*, 58, 203–208

160.

Roberts, D.R., Chareonviriyaphap, T., Harlan, H.H. & Hshieh, P. (1997). Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13, 13–17

161.

Roestenberg, M., Teirlinck, A.C., McCall, M.B., Teelen, K., Makamdop, K.N., Wiersma, J., *et al.* (2011). Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *The Lancet*, 377, 1770–1776

162.

Rogan, W.J. & Chen, A. (2005). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet*, 366, 763–773

163.

Roitberg, B.D., Mondor, E.B. & Tyerman, J.G. (2003). Pouncing spider, flying mosquito: blood acquisition increases predation risk in mosquitoes. *Behavioral Ecology*, 14, 736–740

164.

Rowland, M. (1989). Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiological entomology*, 14, 77–84

165.

Rowland, M. (1991a). Activity and mating competitiveness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Medical and Veterinary Entomology*, 5, 207–222

166.

Rowland, M. (1991b). Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology*, 5, 193–206

167.

Rund, S.S., Gentile, J.E. & Duffield, G.E. (2013). Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC genomics*, 14, 218

168.

Rund, S.S.C., Hou, T.Y., Ward, S.M., Collins, F.H. & Duffield, G.E. (2011). Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PNAS*, 108, E421–E430

169.

Russell, T.L., Beebe, N.W., Cooper, R.D., Lobo, N.F. & Burkot, T.R. (2013). Successful malaria elimination strategies require interventions that target changing vector behaviours. *Malar J*, 12, 56

170.

Russell, T.L., Govella, N.J., Azizi, S., Drakeley, C.J., Kachur, S.P. & Killeen, G.F. (2011). Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*, 10, 80

171.

Sattenspiel, L. (2000). Tropical environments, human activities, and the transmission of infectious diseases. *American journal of physical anthropology*, 113, 3–31

172.

Saunders, D.S. (2002). *Insect clocks*. Third Edition. Elsevier, Amsterdam

173.

Service, M.W. (1980). Effects of wind on the behaviour and distribution of mosquitoes and blackflies. *International Journal of Biometeorology*, 24, 347–353

174.

Siegert, P.Y., Walker, E. & Miller, J.R. (2009). Differential behavioral responses of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) modulate mortality caused by pyrethroid-treated bednets. *Journal of Economic Entomology*, 102, 2061–2071

175.

Singh, B., Sung, L.K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., *et al.* (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363, 1017–1024

176.

Sk, B. & Kv, S. (2004). Efficacy of different organophosphate and synthetic pyrethroid insecticides to the larvae of malaria vector *Anopheles stephensi*, Liston. *J Environ Biol*, 25, 485–488

177.

Smallegange, R.C., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., Gezan, S., Takken, W., Sauerwein, R.W., *et al.* (2013). Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PloS one*, 8, e63602

178.

Smallegange, R.C., Qiu, Y.T., van Loon, J.J. & Takken, W. (2005). Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Chemical senses*, 30, 145–52

179.

Smith, A. & Webley, D.J. (1969). A veranda-trap hut for studying the house-frequenting habits of mosquitoes and for assessing insecticides. III. The effect of DDT on behaviour and mortality. *Bulletin of Entomological Research*, 59, 33–46

180.

Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y. & Hay, S.I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434, 214–217

181.

Soderlund, D. & Knipple, D. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33, 563–577

182.

Sparks, T.C., Lockwood, J.A., Byford, R.L., Graves, J.B. & Leonard, B.R. (1989). The role of behavior in insecticide resistance. *Pesticide science*, 26, 383–399

183.

Spitzen, J., Ponzio, C., Koenraadt, C.J.M., Jamet, H.V.P. & Takken, W. (2014). Absence of Close-Range Excitorepellent Effects in Malaria Mosquitoes Exposed to Deltamethrin-Treated Bed Nets. *Am J Trop Med Hyg*, 90, 1124–1132

184.

Stone, B.F. & Brown, A.W.A. (1969). Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. *Bull World Health Organ*, 40, 401–408

185.

Su, C.-Y., Menuz, K. & Carlson, J.R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell*, 139, 45–59

186.

Sutcliffe, J.F. (1987). Distance orientation of biting flies to their hosts. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8, 611–616

187.

Sutcliffe, J.F. & Yin, S. (2014). Behavioural responses of females of two anopheline mosquito species to human-occupied, insecticide-treated and untreated bed nets. *Malar J*, 13, 294

188.

Takken, W. (2002). Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 7, 1022–30

189.

Takken, W., Dekker, T. & Wijnholds, Y.G. (1997). Odor-mediated flight behavior of *Anopheles gambiae* gilesSensu Stricto and *An. stephensi* liston in response to CO₂, acetone, and 1-octen-3-ol (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Behavior*, 10, 395–407

190.

Takken, W., Klowden, M.J. & Chambers, G.M. (1998). Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. *J. Med. Entomol.*, 35, 639–645

191.

Takken, W. & Knols, B.G.J. (1999). Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual review of entomology*, 44, 131–157

192.

Takken, W. & Verhulst, N.O. (2013). Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology*, 58, 433–453

193.

Thompson, M., Steichen, J.C. & Ffrench-Constant, R.H. (1993). Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Molecular Biology*, 2, 149–154

194.

Toé, K.H., Jones, C.M., N’Fale, S., Ismail, H.M., Dabiré, R.K. & Ranson, H. (2014). Increased Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors and Decreased Bed Net Effectiveness, Burkina Faso. *Emerging Infectious Diseases*, 20

195.

Trape, J.-F., Tall, A., Diagne, N., Ndiath, O., Ly, A.B., Faye, J., *et al.* (2011). Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet infectious diseases*, 11, 925–932

196.

Van Handel, E. & Klowden, M.J. (1996). Defecation by the mosquito, *Aedes aegypti*, is controlled by the terminal abdominal ganglion. *Journal of Insect Physiology*, 42, 139–142

197.

Vantaux, A., Lefevre, T., Dabire, K. & Cohuet, A. (2014). Individual experience affects host choice in malaria vector mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 7, 249

198.

Verhaeghen, K., Bortel, W.V., Roelants, P., Backeljau, T. & Coosemans, M. (2006). Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malaria Journal*, 5, 16

199.

Verhulst, N.O., Qiu, Y.T., Beijleveld, H., Maliepaard, C., Knights, D. & Schulz, S. (2011). Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One*, 6

200.

Vijverberg, H.P.M., van der Zalm, J.M. & van den Bercken, J. (1982). Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature*, 295, 601–603

201.

Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., David, J.-P., Kafatos, F.C., Louis, C., *et al.* (2005). Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Molecular Biology*, 14, 509–521

202.

Vontas, J.G., Small, G.J. & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*, 357, 65–72

203.

Wakeling, E.N., Neal, A.P. & Atchison, W.D. (2012). Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels

204.

Walker, K. (2000). Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 345–354

205.

Walker, K. & Lynch, M. (2007). Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 2–21

206.

Webster, B., Lacey, E.S. & Cardé, R.T. (2015). Waiting with Bated Breath: Opportunistic Orientation to Human Odor in the Malaria Mosquito, *Anopheles gambiae*, is Modulated by Minute Changes in Carbon Dioxide Concentration. *J Chem Ecol*, 41, 59–66

207.

Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N. & Raymond, M. (2002). A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269, 2007–2016

208.

Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M., *et al.* (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect molecular biology*, 13, 1–7

209.

Wery, M. (1967). Studies on the sporogony of rodent malaria parasites. University College, London

210.

White, G.B. (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 278–298

211.

White, G.B. (2014). Terminology of insect repellents. *Insect Repellents Handbook*, 1

212.

WHO. (2001). *Malaria vector control. Insecticides for indoor residual spraying (archived)*. Geneva

213.

WHO. (2008). Global malaria control and elimination : report of a technical review

214.

WHO. (2012). Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors

215.

WHO. (2013a). Indoor Residual Spraying: An operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination. *Geneva: World Health Organization*

216.

WHO. (2013b). Larval source management: a supplementary malaria vector control measure: an operational manual

217.

WHO. (2014). *World Malaria Report*

218.

Williams, J.C., Hagedorn, H.H. & Beyenbach, K.W. (1983). Dynamic changes in flow rate and composition of urine during the post-bloodmeal diuresis in *Aedes aegypti* (L.). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 153, 257–265

219.

Wilton, D.P. & Fay, R.W. (1972). RESPONSES OF ADULT ANOPHELES STEPHENSI TO LIGHT OF VARIOUS WAVELENGTHS. *Journal of Medical Entomology*, 9, 301–304

220.

Wood, O.R., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L.L. & Brooke, B.D. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors*, 3, 1–7

221.

World Health Organization. (2010). *World malaria report 2010*

222.

Yang, Y.-Y., Liu, Y., Teng, H.-J., Sauman, I., Sehnal, F. & Lee, H.-J. (2010). Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1219–1223

223.

Zaim, M., Aitio, A. & Nakashima, N. (2000). Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 1–5

224.

Zhao, X., Salgado, V.L., Yeh, J.Z. & Narahashi, T. (2003). Differential Actions of Fipronil and Dieldrin Insecticides on GABA-Gated Chloride Channels in Cockroach Neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 914–924

225.

Zwiebel, L. & Takken, W. (2004). Olfactory regulation of mosquito–host interactions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34, 645–652

Résumé

Les parasites du genre *Plasmodium* responsables du paludisme sont transmis du moustique à l'homme et de l'homme au moustique pendant la prise du repas de sang. L'utilisation massive des moustiquaires imprégnées d'insecticide pyréthrinoïdes vise à limiter la prise du repas de sang et à réduire la survie des moustiques. Dans un contexte de lutte antivectorielle généralisée, des mécanismes d'adaptations physiologiques et comportementaux ont été sélectionnés chez les populations d'*Anophèles* vecteurs. Les mécanismes de résistances physiologiques font l'objet d'un large effort de recherche alors que nous ne disposons que de peu de connaissances sur le comportement de recherche et de piqure d'un homme protégé par une moustiquaire. L'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à la compréhension des interactions entre un mécanisme de résistance physiologique aux insecticides, le comportement des moustiques et les outils de lutte antivectorielle. Pour réaliser cette étude, nous avons testé l'effet de la moustiquaire imprégnée d'insecticide sur le comportement de recherche de l'hôte chez *Anopheles gambiae* en relation avec le génotype *kdr* L1014F, qui confère une résistance aux pyréthrinoïdes utilisés sur les moustiquaires imprégnées. Dans la première partie, nous avons analysé l'effet de l'insecticide pyréthrinoïde présent sur la moustiquaire sur l'attractivité de l'hôte chez *An. gambiae*. Nos résultats ont montré que les moustiques résistants étaient plus attirés par un hôte protégé par une moustiquaire traitée de perméthrine comparé une moustiquaire non traitée. Nous avons ensuite analysé la performance des trois génotypes *kdr* à atteindre un hôte protégé par une moustiquaire et leur activité comportementale au contact de la moustiquaire. Cette expérience a mis en évidence d'une part un coût adaptatif du gène *kdr* sur l'activité comportementale des moustiques résistants et d'autre part, une meilleure performance des hétérozygotes (superdominance) pour localiser une faille sur une moustiquaire traitée afin d'atteindre un hôte protégé. Enfin, nos expériences ont porté sur l'effet d'une exposition sublétales des moustiques à des insecticides pyréthrinoïdes sur le comportement de piqure lors de la recherche d'un hôte protégé. Cette préexposition aux pyréthrinoïdes a eu un effet contrasté sur le taux de gorgement des moustiques résistants toutefois elle a réduit la durée de gorgement, de prédiurèse ainsi que le volume de repas de sang des trois génotypes. À travers l'étude de 3 séquences comportementales, nos résultats ont permis d'apporter des informations cruciales sur le comportement des anophèles vecteurs du paludisme face aux moustiquaires imprégnées et ouvre la voie à de nombreuses pistes de recherches.

Mots-clés : Anophèles, *Kdr*, Comportement, Olfaction, Insecticide, Valeur sélective

Abstract

The blood feeding behaviour is a crucial step in the reproductive cycle of female mosquitoes for egg maturation. However the widespread use of insecticide treated bed nets reduce the ability of mosquitoes to feed on human host. In this context of integrated vector control strategies, mosquitoes have evolve physiological and behavioural adaptations to scope the deleterious effect of insecticides. Despite the progress made on understanding of physiological resistance, few data exist on effects of insecticide treated nets on host seeking behaviour. The aim of my thesis was to determine whether host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* in the presence of insecticide-treated materials is modulated by the presence of the *kdr* L1014F mutation which confers resistance to pyrethroids used on treated bed nets. Firstly, our results show that the *kdr* gene modulate the host seeking behaviour in the presence of insecticide treated nettings and the fitness of *kdr*-resistant mosquitoes. Homozygous resistant mosquitoes for *kdr* gene have oriented flight to host odours in the presence of permethrin treated net compared to untreated net. The analysis of the performance of the three genotypes to pass through a hole on untreated net in the presence of a vertebrate host showed a cost of *kdr* mutation on behavioural activity of resistant mosquitoes. In addition, this work highlighted a high performance of heterozygous (overdominance) to pass through a hole treated net to reach a vertebrate host. Finally, our data reveals that a sub-lethal exposure of resistant mosquitoes to two pyrethroid treated nets has a contrasting effect on blood feeding rate. In addition, the pre-exposure of the three genotypes to pyrethroid impact the biting behaviour of susceptible and resistant mosquitoes by reducing the feeding duration, pre-diuresis duration and blood meal size. All of these results are discussed in the context of blood seeking behaviour in natural conditions. Through the study of 3 complementary behavioural sequences, our results brought new insights about the malaria vector behavior in front of pyrethroid-impregnated bed nets and highlighted complex gene-environment interactions.

Keywords: *Anopheles*, *Kdr*, Behaviour, Olfaction, Insecticide, Fitness