

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI



Université des Sciences, des Techniques et
des Technologies de Bamako (USTTB)



FACULTE DE PHARMACIE

A **U.S.T.T-B** aire : 2022-2023

Thèse N°:.....

THESE

**Introggression, Avidité au Gorgement et statut de
Résistance aux Insecticides d'une Souche de Moustique
Génétiquement Modifiée D'*Anopheles Coluzzii*
au Laboratoire**

Mr. Djiguiba TOURE

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr. Sékou Fantamady Traoré Prof

Membre : Dr Bréhima Diallo Assistant

Membre : Pr Seidina A.S Diakité Professeur

Membre : Dr Cheick Amadou Coulibaly Maître de Recherche

Co-directeur : M. Lakamy Sylla Maître-Assistant

Directeur : Pr. Mahamadou Diakité Professeur

Ce travail a été effectué au laboratoire transgénique de Malaria Research and Training Center (MRTC) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako dans le cadre des activités du projet Target Malaria Mali. Le laboratoire transgénique est seul responsable du contenu de ce document.

DEDICACES

DEDICACES

À mes parents, mes premiers modèles et mes premiers soutiens.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Même si cette thèse est un travail personnel, je souhaite ici rendre hommage et exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et à son aboutissement.

À DIEU

L'Unique, le Parfait, le Sage, l'Omnipotent, le Miséricordieux par qui et pour qui nous sommes et à qui nous serons, de m'avoir donné la vie, la santé, et de m'avoir guidé sur le droit chemin. C'est par votre grâce que je suis arrivé à ce niveau aujourd'hui.

À MES PARENTS

Un grand merci à mes parents pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui m'ont permis de réaliser les études que je voulais.

A tout le corps professoral de la faculté de pharmacie, de médecine et d'odontostomatologie

Pour la qualité de la formation reçue.

À MES ENCADREURS

Au feu Dr Coulibaly Mamadou, Lakamy Sylla, Daouda Niare, Brehima Diallo, Boubacar Tembely, Amadou Guindo, Bilkissou Yagoure, Sidy Doumbai, Alahaye Mahamane Maiga, Amadou Sékou Traoré, Mohamed Moumine Traoré, Adama Sacko, Daman Sylla

Vous avez toujours répondu présent et avec enthousiasme quand j'avais besoin de vous. Vous m'avez gratifié de tant de respect. C'est le lieu de vous remercier pour tout ce que vous avez déployé comme efforts en ma faveur. Je vous souhaite une bonne carrière professionnelle.

À TOUT LE PERSONNEL DE TARGET MALARIA

Au feu Dr Coulibaly Mamadou, Lakamy Sylla, Daouda Niare, Brehima Diallo, Boubacar Tembely, Amadou Guindo, Bilkissou Yagoure, Sidy Doumbia, Alahaye Mahamane Maiga, Amadou Sékou Traoré, Mohamed

Moumine Traoré, Adama Sacko, Daman Sylla , Aissata Sanogo, Abdoulaye Traoré, Baba M'barakou, Bakara Dicko, Souleymane Kodio, Fatoumata Traoré, Hatouma Samoura, Kadiatou Sanogo

Je voudrais ici remercier l'ensemble du personnel de Target Malaria pour leur aide et soutien tout au long de ce travail de thèse. Je voudrais insister sur la chaleur de l'accueil, la disponibilité et la gentillesse de l'ensemble du personnel que j'ai eu l'honneur de côtoyer durant mon séjour au sein du laboratoire.

À L'ENSEMBLE DU PERSONNEL DE MRTC

J'aimerais exprimer ma gratitude à tous les chercheurs et spécialistes, trop nombreux pour les citer, qui ont pris le temps de discuter de mon sujet. Chacun de ces échanges m'a aidé à faire avancer mon analyse.

A tous mes camarades de la 12ème promotion du numéris clausus (promotion Pr ELIMANE MARIKO)

Ce fut un agréable, chers frères et sœurs d'apprendre à vos côtés durant ces années. Vous avez été avec moi pendant les bons et mauvais moments de la vie estudiantine au point-G, je vous souhaite le meilleur dans votre vie professionnelle et familiale.

À L'ENSEMBLE DU PERSONNEL de la PHARMACIE SOUFIANA

Ce fut un agréable, chers frères et sœurs d'apprendre à vos côtés durant ces années. Vous avez été avec moi pendant les bons et mauvais moments, je vous souhaite le meilleur dans votre vie professionnelle et familiale. Une mention spéciale à **Dr Diané Kabiné**

**HOMMAGES AUX
MEMBRES DU JURY**

HOMMAGES Au feu DOCTEUR MAMADOU COULIBALY

(Madou génie)

Il me sera très difficile d'oublier de remercier le

feu Dr. Coulibaly Mamadou

Un homme de science, un pharmacien hors norme, un scientifique redoutable qu'on respectait pour sa capacité intellectuelle son savoir-faire et son amour pour le travail bien. Merci de m'avoir accepté dans ton service cher maitre. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité, sa compréhension et son sens élevé de responsabilité pour le respect de la dignité humaine sont entre autres des qualités enviées de tous.

Vous nous manquerez terriblement, **Dr. Coulibaly**

Votre mémoire et héritage resteront à jamais gravés dans les esprits de ceux qui vous ont connu et que vous avez si bien inspirés pour poursuivre vos enseignements en quête du travail bien fait. Nous chérirons vos bons souvenirs dans nos cœurs et nous vous garderons dans nos prières quotidiennes. Nous tenons à exprimer notre plus chaleureuse pensée, notre sympathie et nos condoléances les plus sincères aux membres de ta famille.

Son sens d'organisation était impeccable et sa mémoire phénoménale, comptant uniquement sur un petit agenda tenant dans la paume d'une main. Il était capable de se rappeler précisément la place de n'importe quel document ou article scientifique dans ses grandes filières, le nom des auteurs, l'année de sa publication et l'essentiel de son contenu. C'était un collaborateur formidable et généreux, mais sévèrement critique et substantiellement constructif. Sa culture était vaste et sans faille. Avec ses patients, il était gentil et très ouvert d'esprit.

Merci cher maitre

Pour votre exemple, pour votre vie donnée, pour votre infatigable dévouement.

Que le tout ALLAH vous accorde sa grâce et son paradis, Amen...

feu Dr Coulibaly Mamadou

Une personne chère ne nous quitte jamais... Elle vit au plus profond de notre cœur et pour la revoir, il suffit de fermer les yeux !



Merci mon mentor Dr Coulibaly

A notre Maître et président du jury

Professeur Sékou Fantamady TRAORE

- **PhD en Entomologie Médicale, Professeur d'entomologie médicale**
- **Ancien Directeur du département Entomologie du centre de recherche et de formation sur le paludisme MRTC (Malaria Research and Training Center)**
- **Professeur honoraire à la faculté de pharmacie**

Cher maitre

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury. Nous vous remercions de votre enseignement et nous vous sommes très reconnaissants de bien vouloir porter intérêt à ce travail. Nous avons bénéficié, au cours de nos études, de votre enseignement clair et précis. Votre gentillesse, vos qualités humaines, votre modestie n'ont rien d'égal que votre compétence. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de nos sincères remerciements.

A notre maitre et juge :

Professeur Diakité Seidina A.S

- **Docteur en Pharmacie**
- **PhD en Immunologie**
- **Maitre de conférences en Immunologie à la FAPH**

Cher Maitre

Vous nous faite un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maitre respecté et respectable.

A notre Maître et juge

Docteur Brehima DIALLO

➤ **Docteur en Pharmacie,**

➤ **Master en Bio-informatique et Chercheur Assistant au MRTC**

Cher Maître

Votre présence au sein de notre jury constitue pour moi un grand honneur. Par votre modestie, vous m'avez montré la signification morale de notre profession. Nous vous remercions de votre enseignement et gentillesse. Qu'il me soit permis de vous présenter à travers ce travail le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

A notre Maître et juge

- **Docteur Cheick Amadou COULIBALY**
- **PhD en entomologie et parasitologie médicales.**
- **Maitre de recherche à la Faculté de Pharmacie (FAPH).**

Cher Maitre

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour votre bienveillance et votre simplicité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Veuillez trouver ici, cher Maitre, le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.

A notre Maitre, encadreur et co-directeur :

Monsieur Lakamy Sylla

- **Doctorant en entomologie**
- **Master en management de l'environnement et du développement durable**
- **Co Investigateur Principal du projet ACEME**
- **Chercheur au département d'entomologie du MRTC**

Cher maitre et encadreur,

C'est un réel plaisir que vous nous faite en acceptant de codiriger ce travail. Votre amabilité, votre sympathie, votre courage, votre simplicité et surtout votre aptitude scientifique sont les qualités qui vous définissent depuis le laboratoire. Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple. Nous avons beaucoup bénéficié de votre assistance durant la réalisation de ce travail. Permettez-nous aujourd'hui de réitérer notre indéfectible gratitude. Merci très cher et infatigable encadreur.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Mahamadou DIAKITE

- **Professeur Titulaire d'Immunologie-Génétique**
- **Vice-recteur de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)**
- **Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC)**
- **Chef de l'unité Immunogénétique et Parasitologie du MRTC**
- **Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH**
- **Membre du Comité National d'Ethique pour la Santé et les Sciences**

Cher Maître

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre compréhension et votre sens élevé pour le respect de la dignité humaine sont entre autres des qualités enviées de tous. Vous resterez pour nous un exemple à suivre. Vous avez accepté de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Les mots nous manquent pour vous remercier. Cher maître recevez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**SIGLES ET
ABBREVIATIONS**

SIGLES ET ABBREVIATIONS

% : Pourcentage

°C : degrés Celsius

Ac(DSM) : souche d'*Anopheles coluzzii* contenant un transgène de stérilité mâle dominante (*dominant sterile male*, DSM)

Ac(WT) : *Anopheles coluzzii* de type sauvage (*wild type*, WT)

ACEME: African Center for Excellence in Molecular Engineering (Centre africain d'excellence en ingénierie moléculaire)

ADN: acide désoxyribonucléinique

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomique

Ag(DSM) : souche d'*Anopheles gambiae* contenant un transgène de stérilité mâle dominante (*dominant sterile male*, DSM)

AKT : Activated by kinase tyrosine

ALC2 : Niveau de confinement 2 pour les arthropodes (Arthropod Containment level 2)

An : Anophèles

ARN : Acide Ribonucléique.

ARNi : L'interférence de l'acide ribonucléique.

cm : centimètre

Covid-19: Coronavirus Disease 2019

CPS : chimioprophylaxie saisonnière

CRISPER CAS9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (technique moléculaire permettant de couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule)

DSM : dominant male sterile (male sterile dominant)

DsRed : gène marqueur dans le matériel transgénique de couleur rouge.

FAPH : Faculté de Pharmacie

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

FsRILD : Insectes porteurs d'une létalité dominante dont le gène létal est spécifique aux femelles

G3 : souche-hôte d'*Anopheles gambiae* pour la transformation de la lignée germinale

GFP : protéine fluorescente verte, marqueur testiculaire/spermatique des mâles transgéniques

GY : Gray

H : heures

HR : humidité relative

IC : incompatibilité cytoplasmique

ICER-Mali : International Center for Excellence in Research-Mali

IIT : technique de l'insecte incompatible

IRSS : Institut de Recherche en Sciences de la Santé

L3 : Larves de troisième stade

L4 : Larves de quatrième stade

MEADD : Ministère de l'Environnement, de l'Assainissement et du Développement Durable)

MILD : moustiquaires imprégnées d'insecticides à long durée d'action

mm: millimètre

MMC : moyenne des moindres carrés

MRTC : Centre de recherche et de formation sur le paludisme (*Malaria Research and Training Centre*)

Neg : négatif/ive

Oxitec : Oxford Insect Technologies

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : polymerase chain reaction

PID : pulvérisation intra-domiciliaire

Pos. : positif/ive

PRC: Polymerase Chain reaction

RC : rétrocroisement

RILD : Libération d'insectes porteurs d'une létalité dominante

SAS : Petit vestibule

SD : écart type (*standard déviation*)

SEM : erreur-type de la moyenne

SIT : Technique de l'insecte stérile

SOP : procédure opérationnelle normalisée

TE : éléments transposables

TL 50 : temps létal 50 % en jours

tTAV : transActivator(une protéine activatrice)

UCRC : Centre Universitaire de Recherche Clinique

USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de
Bamako

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : GÈNES D'ENDONUCLEASE HOMING.	11
FIGURE 2 : SITE D'ETUDE.....	22
FIGURE 3 : PHOTO D'UNE LARVE NON MODIFIEE ET D'UNE LARVE MODIFIEE.....	25
FIGURE 4 : PHOTO D'UNE NYMPHE FEMELLE ET D'UNE NYMPHE MALE	26
FIGURE 5 : PROCESSUS DE GENOTYPAGE PAR LA PCR	28
FIGURE 6 : PHOTO DE GORGEMENT DES MOUSTIQUES.....	29
FIGURE 7 : MOUSTIQUE EN PONTE INDIVIDUELLE	32
FIGURE 8 : PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE NON OUVERTE	33
FIGURE 9 : PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE OUVERTE.....	33
FIGURE 10 : PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE INSEMINEE A LA FLUORESCENCE VERTE	33
FIGURE 11: Photo d'une spermathèque non inséminée à la fluorescence verte	33
FIGURE 12 : Taux de génotypage des espèces analysées.....	41

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: NOMS, CLASSES, ET CONCENTRATIONS DES INSECTICIDES UTILISES	344
TABLEAU 2: RESUME DES RESULTATS DE LA PCR POUR L'IDENTIFICATION DES ESPECES	399
TABLE 3: RESULTAT DES PARAMETRES DE L'AVIDITE AU GORGEMENT POUR LE REPAS SANGUIN	422
TABLE 4: MORTALITE OBSERVEE CHEZ LES MOUSTIQUES AC(DSM)2 EXPOSES AUX INSECTICIDES ET CHEZ LES MOUSTIQUES TEMOINS.	444
TABLE 5: MORTALITE CHEZ LES MOUSTIQUES AC(WT)A EXPOSES AUX INSECTICIDES ET CHEZ LES MOUSTIQUES TEMOINS.	445
TABLE 6: MORTALITE CHEZ LES MOUSTIQUES AC(WT)B EXPOSES AUX INSECTICIDES ET CHEZ LES MOUSTIQUES TEMOINS.	466

TABLE DES MATIERES

1. Introduction.....	2
2. Objectifs.....	6
2.1. Objectif général.....	6
2.2. Objectifs spécifiques	6
3. Généralités	8
3.1. Moustiques génétiquement modifiés et lutte antivectorielle contre les maladies	8
3.1.1. Réduction des populations, Principes, applications et quelques exemples	9
3.1.2. Modification des populations, Principes, applications et quelques exemples.....	11
3.1.3. La technologie de Gene drive, Principes, applications et quelques exemples.....	13
3.2. Etat de lieux de la mise en œuvre des approches basées sur les moustiques génétiquement modifiés dans la lutte anti-vectorielle	14
3.2.1. Paludisme-Anopheles	15
3.2.1.1. Situation au Monde	15
3.2.1.2. En Afrique	16
3.2.2. Dengue, Fièvre jaune, Zika – Aedes spp.....	17
3.3. Autres stratégies de lutte génétique	17
3.3.1. Technique de l’insecte stérile par irradiation (SIT) – Principes, applications et quelques exemples.....	17
3.3.2. Technique des insectes incompatibles (IIT) - Principes et quelques exemples.....	18
3.3.3. IIT et SIT combinées : Principes et quelques exemples	20
4. Matériel et méthodes	22
4.1. Site d’étude	22
4.2. Période et type d’étude	23
4.3. Déroulement des expériences	23

4.3.1. Détermination du niveau d'introgession.....	25
4.3.2. Déternination de l'avidite pour le gorgement.....	29
4.3.3. Détermination du statut de résistance	34
4.4. Analyse des données.....	36
5.1. Résultat de l'introgession	39
5.2. Résultat de l'avidité au gorgement pour le repas sanguin	40
5.2.1. Avidité pour le repas sanguin	41
5.2.2. Probabilité de pondre	41
5.2.3. Taux d'insémination de femelles qui n'ont pas pondu d'œufs	42
5.2.4. Fécondité et fertilité	42
5.3.1. Colonie modifiée Ac(DSM)2.....	44
5.3.2. Colonie non-modifiée Ac(WT)A et Ac(WT)B.....	45
6. Commentaires et discussions.....	48
6.1. Introgession.....	48
6.2. Avidité au gorgement pour le repas sanguin	48
6.3. Résistance aux insecticides utilisés.....	52
7. Conclusion et recommandations	54
7.1. Conclusion	54
7.2. Recommandations	54
8. Références Bibliographiques	56
9 Annexes	71

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le paludisme constitue de nos jours un problème majeur de santé publique dans les pays tropicaux, spécifiquement ceux situés en Afrique sub-saharienne. Il demeure de loin la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde intertropical. Environ 3,2 milliards de personnes, soit près de la moitié de la population mondiale, sont exposées au risque palustre (OMS, 2022). Les culicidés ou moustiques sont responsables de plusieurs maladies comme la filariose lymphatique, la dengue, le chikungunya, le Zika et le paludisme (OMS). En 2022 il y a eu 247 millions de cas de paludisme contre 241 millions en 2021. Le nombre de cas de décès dû à cette maladie est estimé à 619 000 en 2022 contre 625 000 enregistrés en 2021 (OMS, 2022). Deux grandes méthodes de lutte sont utilisées contre le paludisme : la lutte contre le parasite visant à éliminer l'agent pathogène par l'utilisation des médicaments antipaludiques par chimiothérapie ou chimioprophylaxie saisonnière (CPS) et la lutte antivectorielle destinées contre les moustiques (Wangdi et al. 2018). Cette dernière comprend la lutte physique, chimique et biologique. La lutte physique repose sur l'utilisation de barrières physiques. Elle consiste aussi à la gestion des moustiques dans l'environnement (le drainage ou remblayage des endroits où l'eau stagne, la protection des portes et des fenêtres par des grillages, la protection personnelle à travers le port des vêtements assez long couvrant toutes les parties du corps, etc.). La lutte chimique repose sur l'utilisation d'insecticides à travers la pulvérisation intra-domiciliaire (PID), des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILD), des répulsifs, etc. La lutte biologique repose sur les champignons entomopathogènes, les agents bactériens, les poissons larvivores, les parasites microsporidiens, entre autres (Carnevale et Robert 2009; Kamareddine 2012). Ces moyens se sont avérés efficaces pour réduire la transmission du paludisme et ont permis de sauver des milliers de vies. Environ 1,7 milliard de cas et 10,6 millions de décès ont été évités entre 2000 et 2020 à travers les campagnes de lutttes telles que les MILD, PID, CPS (OMS, 2021). Cependant, ces moyens ont

aussi montré certaines limites (OMS, 2020). Les stratégies de lutte antivectorielle basées sur les insecticides sont continuellement menacées par la résistance développée chez les vecteurs (Hargreaves et al. 2009; Kouyaté et al. 2007), l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides est plus efficace à l'intérieur des chambres alors que les vecteurs piquent aussi en dehors des chambres (Sylla Daman et al. 2015). Elles (les moustiquaires) peuvent être confrontées à diverses complications : de la distribution à l'utilisation appropriée. La résistance croissante aux médicaments antipaludiques (OMS, 2021), le coût élevé des nouvelles molécules plus efficaces, l'accès difficile aux centres de soins pour certains, les ruptures de stock des produits antipaludiques, la pauvreté croissante, les conflits civils dévastateurs dans de nombreux pays endémiques aggravent aussi la situation (Christophides 2005). Inquiétante, la pandémie de Covid-19 a davantage compliqué les choses en augmentant le nombre de décès due au paludisme à 47 000 (OMS, 2021) à la suite d'une réduction du diagnostic et du traitement variant de 5 à 50% dans l'ensemble des pays endémiques (OMS, 2021). Au vu des problèmes cités ci-dessus en rapport avec les stratégies de lutte antipaludiques, il s'avère que ces outils seuls sont insuffisants pour amener la transmission du paludisme à un niveau qui pourrait éventuellement conduire à l'élimination ou à l'éradication de la maladie. « Les progrès antipaludiques avaient cessé et que nous risquons de compromettre les acquis de ces vingt dernières années. Il est clair que nous devons changer de cap et améliorer notre approche de la lutte contre le paludisme, notamment dans les pays où la maladie pèse le plus lourdement » (OMS, 2018). Il est, donc, nécessaire de mettre au point de nouveaux outils, rentables et durables (OMS 2020 et messages 2020; Shretta et al. 2017), qui viendront compléter les moyens de luttés actuelles renforçant ainsi les stratégies d'élimination du paludisme. L'utilisation de moustiques génétiquement modifiés en constitue un. La conception d'une telle méthode remonte depuis les années 1930 et 1940. Pour des fins de recherche, au Mali, de nombreuses expériences, comme l'introggression, la résistance aux insecticides et

l'avidité au gorgement ont été réalisées sur la souche de moustiques génétiquement modifié mâles stériles Ac(DSM)2, introduite au Mali en septembre 2019. Elle a été importée depuis le laboratoire de Terni en Italie et introduite dans le laboratoire ACL2 au centre de recherche et de formation sur le paludisme (Malaria Research and Training Center) "MRTC" sous forme d'œufs, après obtention d'une autorisation (arrêté N° 2019 1563/MEADD-SG du 21 juin 2019) auprès du Ministère de l'Environnement, de l'Assainissement et du Développement Durable qui, à travers le Comité National de Biosécurité, régule l'utilisation des organismes génétiquement modifiés au Mali. C'est ainsi que la présente étude se propose d'évaluer le niveau d'introggression, l'avidité au gorgement et le statut de la résistance aux insecticides de la souche de mâles stériles Ac(DSM)2 au laboratoire de niveau de confinement deux (2) pour les arthropodes (Arthropod Containment Level 2) (ACL2) .

OBECTIFS

OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Évaluer le niveau d'introgression, l'avidité pour le gorgement et le statut de la résistance aux insecticides d'une souche de mâle stérile d'*Anopheles. Coluzzii* Ac(DSM)2 génétiquement modifiée au laboratoire.

2.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer la composition moléculaire de la souche Ac(DSM)2 sur six rétrocroisements
- Comparer le taux de gorgement, de ponte, et d'éclosion des œufs des moustiques modifiés par rapport aux non modifiés
- Déterminer le statut de résistance phénotypique de la souche Ac(DSM)2 aux insecticides couramment utilisés en santé publique

GENERALITES

GENERALITES

3.1 Moustiques génétiquement modifiés et lutte antivectorielle contre les maladies

Les technologies de manipulation génétique promettent d'améliorer considérablement le développement de nouvelles mesures de lutte contre les maladies à transmission vectorielle (Curtis et Graves 1988). La conception d'une telle méthode remonte depuis les années 1930 et 1940. En 1982, *Drosophila melanogaster* a été le premier insecte à être modifié de façon stable avec l'utilisation d'un élément transposable (Scavarda et Hartl 1984). Cette modification a permis d'introduire dans la lignée germinale de l'insecte, des gènes favorables à l'homme et non délétère à l'insecte à la suite d'une proposition de C. Curtis en 1968 (Curtis. 1968). La modification génétique des espèces vectorielles a été établie en 1991 comme approche dans la lutte contre le paludisme (A. A. James et al. 1999). Elle consistait à développer des outils pour la transformation de la lignée germinale stable des anophèles. L'un des buts de la transformation est de produire des moustiques incapables de porter le paludisme, et de mener des expériences contrôlées pour tester comment faire passer le trait génétiquement modifié dans les populations sauvages. Pour la mise en œuvre de telle approche, il est indispensable d'évaluer les risques, de réaliser des études pour garantir la sécurité humaine et environnementale, prendre en compte les implications éthiques, juridiques, sociales et des préoccupations du public (Touré et al.,2002). Les stratégies génétiques de lutte contre les maladies à transmission vectorielle sont regroupées en deux grands groupes (Flores et O'Neill 2018) : 1] un groupe dont l'objectif est la réduction de la population de moustiques et réduire ainsi la maladie et 2] un groupe dont l'objectif est la modification de la population de moustiques pour le rendre réfractaire à la transmission d'agents pathogènes. Les groupes sont tous deux basés sur l'accouplement et sont spécifiques à l'espèce (Alphey 2014). Contrairement aux méthodes classiques telles que les

moustiquaires, le vaccin, ces méthodes permettent de protéger de la même manière des populations d'une zone des maladies transmises par les moustiques sans distinction de sexe, de race, de religion, etc.

3.1.1 Réduction des populations – Principes, applications et quelques exemples

Les méthodes de réduction de la population de vecteurs reposent sur l'hypothèse d'une réduction de la transmission de la maladie à travers la réduction des moustiques. En réduisant le nombre de moustiques responsable des maladies, la transmission sera ainsi de même puisque ce sont les moustiques qui transmettent les maladies à travers les piqûres. Comme exemples de cette méthode, on peut citer la stérilité des moustiques mâles induite par l'activation d'un gène de nucléase I-Ppol, une endonucléase de Homing appelée HEG (figure 1) qui reconnaît et détruit une partie du chromosome X dans les spermatozoïdes et le chromosome X hérité de la mère de l'embryon. L'accouplement de ces moustiques mâles avec des femelles fertiles donnent des œufs qui ne parviennent pas à éclore (Windbichler et al. 2008). Cette stratégie, si elle doit être utilisée pour lutter contre la maladie, nécessitera l'élevage et le lâcher d'un grand nombre de moustiques mâles incapables de produire des progénitures viables lorsqu'ils s'accouplent avec des femelles dans la nature. Au cours des lâchers continus de ces mâles, la taille de la population de vecteurs devrait être considérablement réduite, ce qui devrait à son tour réduire la transmission de la maladie. Cette approche inclue l'utilisation des marqueurs génétiques pour la séparation des moustiques mâles et femelles au stade larvaire (stade L3 et/ou L4), surveiller à la fois le lâcher des mâles adultes et la compétitivité d'accouplement sexuels de ces derniers pour répondre à l'exigence de ne lâcher que des mâles (Crompton et al. 2010) car les femelles contribueront à la prolifération de la maladie. On peut également citer l'exemple des mâles sans spermatozoïdes modifiés par séquençage ARNi d'un gène de différenciation des cellules

germinales qui, lorsqu'ils s'accouplent avec des femelles, celles-ci présentent des réponses post copulatoires normales et deviennent réfractaires à une insémination ultérieure (Thailayil Janis et al. 2011). Un autre exemple mais d'approche différente, comprend la modification génétique pouvant biaiser le sex-ratio de la progéniture en faveur des mâles (Galizi et al. 2014). Au cours de la spermatogénèse, une séquence présente chez le chromosome X et absente chez Y est ciblée par une endonucléase. Le déchiquetage du chromosome X favorise les spermatozoïdes porteurs du chromosome Y non affectés et entraîne la production d'une progéniture à tendance masculine (Galizi et al. 2014). On peut aussi citer le lâcher d'insectes porteurs d'une létalité dominante (RIDL) (Alphey et al. 2008). Cette méthode confère une grande flexibilité car le gène létal peut être conçu pour agir à un moment précis du développement du moustique (Alphey 2014). Elle comprend le RILD bi-sexe et le RILD spécifique aux femelles appelée fsRILD. On parle de RILD bi-sexe lorsque toute la progéniture meurt à travers une létalité héritée. Quant au RILD spécifique aux femelles appelée fsRILD, le gène létal est spécifique aux femelles, laissant vivre les mâles hétérozygotes qui, lorsqu'ils s'accouplent, la moitié de leur progéniture hérite du transgène létal femelle (Alphey 2014). Également la souche transgénique développée par la société Oxytec, "OX513A", dotée d'un système alternatif répressible à la tétracycline qui tue les progénitures femelles des mâles lâchers (Fu et al. 2010; Marinotti et al. 2013; Schliekelman et Gould 2000). Au cours de cette méthode, la létalité est induite tardivement au stade larvaire, ce qui permet aux larves d'entrer en compétition avec d'autres de types sauvages pour la nourriture, améliorant peut-être la réduction de la population (Phuc et al. 2007).

Il existe aussi une autre méthode utilisant une technologie génétique dominante appelé « SIT guidée avec précision » qui permet le tri des nymphes et la stérilisation simultanée (Kandul et al. 2018). Cette méthode consiste à lâcher des œufs de manière que ce que seuls les moustiques adultes mâles stériles compétitifs émergent.

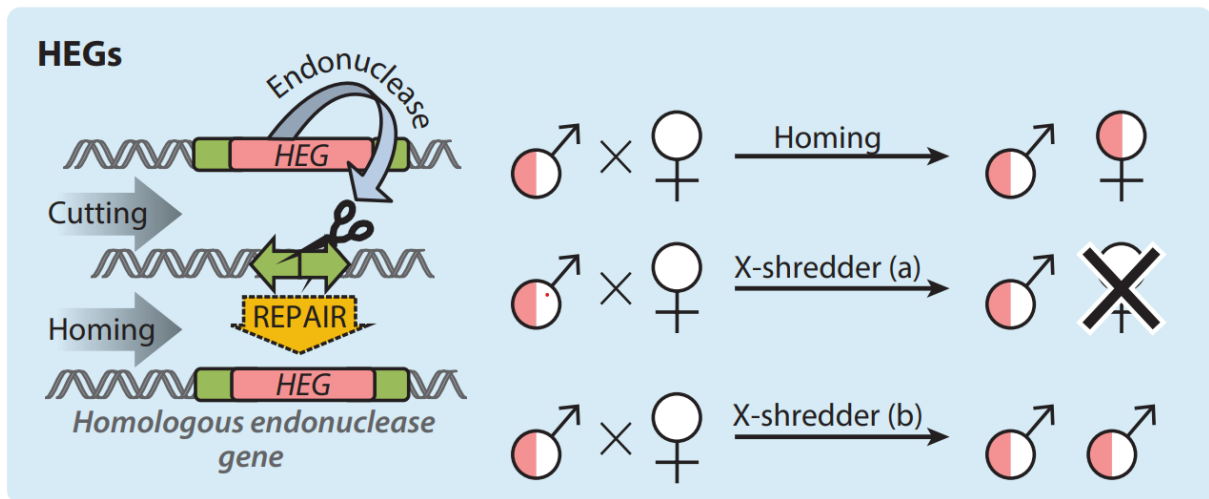


FIGURE 1: GÈNES D'ENDONUCLEASE *HOMING*.

SOURCE (ALPHEY 2014)

3.1.2 Modification des populations, principes, applications et quelques exemples

La modification des populations s'appelle aussi conversion ou remplacement de populations. Les approches de modification des populations consistent à apporter des modifications aux moustiques qui seront lâchés, notamment qu'il s'agisse de l'introduction d'un ou plusieurs gènes dans le génome nucléaire, ou d'un endosymbionte hérité de la mère dans le cytoplasme (Burt 2014). L'accouplement de ces moustiques modifiés avec d'autres moustiques non modifiés propage dans la population de moustiques le facteur héréditaire, ce qui rend les moustiques incapables de transmettre le pathogène sans qu'il ne soit nécessaire de les supprimer (Flores et O'Neill 2018). Chez les moustiques après avoir pris un repas de sang infecté, il se produit une division au niveau des gamétocytes mâles et femelles entraînant la formation et la fusion de gamètes mâles et femelles dans l'estomac du moustique, pour former un zygote. Le zygote se développe alors en ookinète. Elle (ookinète) traverse l'épithélium de l'estomac pour atteindre la lame basale, où il mûrit en oocyste. Les oocystes, lors de la maturation, libèrent des centaines de sporozoïtes dans l'hémocœle. Les sporozoïtes migrent de l'estomac vers la glande salivaire par l'hémolymphe, puis

envahissent les glandes salivaires. Une fois à l'intérieur de la glande salivaire, les sporozoïtes subissent d'autres modifications et sont injectés dans la circulation sanguine de l'hôte lors d'un nouveau repas sanguin. L'estomac du moustique est une cible de choix pour interférer avec les parasites avant leurs transformations en oocystes (Pringle 1965; Rosenberg et Rungsiwongse 1991). Il existe trois (3) principales manières d'agir à ce niveau: la mise à mort proprement dite, la lyse qui est un mode de clairance par désagrégation des parasites tués et la mélanisation qui entoure les parasites tués d'une couche dense de mélanine et qui est un autre mode de clairance dans une souche appelée R qui interrompt complètement le développement d'un certain nombre de parasites du paludisme, y compris le parasite simien *Plasmodium (cynomolgi bastianellii)* (Blandin et al. 2004). Parmi les exemples de cette méthode de modification on peut citer, entre autres :

- le contrôle du *plasmodium* par les gènes de peptide antimicrobien ayant des activités bactéricides et fongicides dans les essais in vitro chez *Anopheles gambiae* (Christophides et al. 2004) ;
- la surexpression ectopique d'un gène codant pour la cécropine A dans l'estomac d'*Anopheles gambiae* qui réduit de 60 % le nombre d'oocystes en développement (Kim et al. 2004) ;
- la surexpression transgénique de la cécropine A ou de la défensine A endogène dans le corps adipeux d'*Aedes aegypti* adulte qui conduit à une forte inhibition du développement des sporozoïtes de *Plasmodium gallinaceum* (Shin et al. 2003) ;
- la mélanisation induite par le renversement des lectines spécifiques de type C qui tue les ookinètes (Volz et al. 2006) ;
- des moustiques modifiés d'*Aedes aegypti* qui expriment un groupe polycistronique de petits ARN synthétiques conçus pour résister à la transmission du virus Zika (Buchman Anna et al. 2019).

Une autre méthode consiste à une régulation négative de protéine des glandes salivaires d'*Anopheles gambiae*, appelée protéine de liaison à la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium* (J. Wang et al. 2013). Cette régulation négative empêche les sporozoïtes de *Plasmodium* d'envahir les glandes salivaires des moustiques. On peut aussi citer la manipulation génétique d'une protéine de signalisation clé appelé akt, qui lorsque augmentée au niveau de l'estomac du moustique *Anopheles stephensi*, permet de réduire la prévalence et l'intensité de l'infection parasitaire du paludisme et la durée de vie des moustiques (Corby-Harris et al. 2010). Il existe une autre approche basée sur les micro-organismes symbiotiques telle que *Bacillus thuringiensis var. israelensis* et *Bacillus sphaericus* du moustique permettant d'annihiler sa capacité à transmettre un pathogène donné (Ricci et al. 2011): les symbiontes qui contribuent à cette capacité sont éliminés ou modifiés (para transgénèse) de manière à rendre l'insecte incompetent vis-à-vis de l'agent infectieux.

3.1.3. La technologie de Gene drive, Principes, applications et quelques exemples

La technique de gène drive ou impulsion génétique est un processus d'héritage biaisé par lequel un élément génétique peut être transmis des parents à la progéniture à un taux supérieur à l'hérédité mendélienne et ainsi augmenter en fréquence dans une population (Burt et Crisanti 2018).. Ces systèmes font une exception aux principes conventionnels de l'hérédité décrite par Gregor Mendel (hérédité mendélienne) selon lesquels, la descendance a, en moyenne, 50 % de chance d'hériter d'un gène particulier de ses parents. Ils peuvent être utilisés pour modifier entièrement des populations de moustiques pour une lutte antivectorielle durable (Burt 2003). Cette technologie permet d'augmenter la probabilité de transmission d'un gène désiré, sans tenir compte de la valeur sélective. Elle permet soit de modifier efficacement les moustiques *Anophèles* de sorte qu'ils ne soient plus capables de transmettre les parasites du paludisme (Gantz et Bier

2015) soit d'introduire des séquences létales de gènes pouvant supprimer ou réduire considérablement et en un temps rapide des populations entières de ces moustiques (Hammond et al. 2016). De par leur caractère autonome, les approches à base d'impulsion génétique pourraient en conjonction avec d'autres outils existants offrir des méthodes durables et économiques permettant de lutter à long terme contre les populations de moustiques *Anophèles* (Windbichler et al. 2011; Nolan et al. 2011; Bhatt et al. 2015; Rabinovich et al. 2017). Des études ont été menées sur des moustiques génétiquement modifiés avec la technologie d'impulsion génétique et ont permis d'atteindre une fréquence de 100 % en 7 à 11 générations avec une élimination d'une population de 600 moustiques en cage sans induire de résistance (Kyrou et al. 2018). Également, d'autres lâchers en cages de moustiques avec impulsion génétique de sexe ratio 1:1 ont permis d'atteindre une fréquence d'introduction de transgènes supérieure ou égale à 80 % en 3-4 générations (Carballar Lejarazú et al. 2021).

Cette stratégie (impulsion génétique) potentiellement puissante est capable de propager une mutation qui bloque la reproduction des femelles et causer la réduction du nombre de moustiques (Deredec, Godfray, et Burt 2011; Andrew M Hammond 2018; Burt et Crisanti 2018). Pour le développement et le test des méthodes basées sur l'impulsion génétique, des scientifiques ont adopté des approches par étape (S. James et al. 2018). Pour l'élimination du paludisme en Afrique subsaharienne, il est recommandé d'explorer la voie vers le déploiement des moustiques par impulsion génétique comme outil potentiel de biocontrôle.

Il est à noter que cette technologie d'impulsion génétique est confrontée à des défis importants pour garantir la confiance et l'acceptation du public (Feachem et al. 2019).

3.2. Etat de lieux de la mise en œuvre des approches basées sur les moustiques génétiquement modifiés dans la lutte anti-vectorielle

3.2.1. Paludisme- *Anophèles*

3.2.1.1. Situation au Monde

La mise en œuvre des approches basées sur les moustiques génétiquement modifiés en cours de développement visent soit à réduire la taille de la population de moustiques vecteurs à un point tel que la transmission de l'agent pathogène soit considérablement réduite ou à modifier la population de moustiques indigènes pour réduire leurs capacités à transmettre des maladies. Ces approches peuvent être définies plus précisément en termes de stratégies auto limitatives (stratégie au cours de laquelle la modification a tendance à disparaître de la population) et de stratégies autonomes (la modification est destinée à persister dans la population et même à se propager au sein de celle-ci et dans d'autres). Elles offrent des options supplémentaires en termes de spécificité et de durabilité de l'effet, ainsi que d'adaptabilité à différentes conditions de transmission des maladies. Plusieurs méthodes ont été proposées notamment la technique de stérilité génétique. Cette technique a été développée pour le principal vecteur du paludisme en Afrique, *An. gambiae* (Grossman et al. 2001), le vecteur indien *An. Stephensis*53 (Catteruccia et al. 2000) et le vecteur sud-américain du paludisme, *An. albimanus* (Perera, Harrell II, et Handler 2002).

Les différentes méthodes actuelles utilisant des moustiques génétiquement modifiés comprennent, entre autres :

- une nucléase qui coupe spécifiquement le chromosome X au cours de la spermatogénèse chez les moustiques *Anopheles gambiae* (Windbichler et al. 2008) des moustiques sans spermatozoïdes (Thailayil Janis et al. 2011),
- un système génétique létal dominant (Alphey 2014), des peptides d'immunité innée, des peptides artificiels, une signalisation cellulaire altérée (S. Wang et Jacobs-Lorena 2013),
- l'interférence ARN (Franz et al. 2006), des systèmes d'impulsion génétiques "Gene drive" les gènes d'endonucléase homing (HEG) associé à l'impulsion génétique (Alphey 2014),

- des éléments synthétiques de type *Medea* inspirés par les éléments *Medea* égoïstes naturels de *Tribolium castaneum* (Chen Chun-Hong et al. 2007),
- des types de modification utilisant la technologie “CRISPER” (Andrew M Hammond 2018; Kandul et al. 2018),
- une souche transgénique portant un gène codant pour l'activateur de transcription répressible à la tétracycline (tTA), une protéine dont l'expression élevée est délétère pour le développement cellulaire (Fu et al. 2010).

En 2019 au Burkina, des lâchers de moustiques *Anopheles coluzzii* mâles stérile ont été effectués, ce qui marque un progrès pour le continent africain dans la lutte génétique contre les moustiques (Yao et al. 2022). Il faut noter que ces lâchés au Burkina ont été effectués dans le cadre de développement des capacités des équipes et aussi dans le cadre de la recherche et non pour une lutte proprement dite contre le paludisme (Yao et al. 2022)

3.2.1.2 En Afrique

En Afrique, cette lutte est menée sous forme de recherche par “Target Malaria”, un consortium international de recherche à but non-lucratif qui vise à codévelopper et à partager des technologies génétiques nouvelles, durables et économiques, visant à réduire la transmission du paludisme par l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés. Le consortium renferme des scientifiques africains au Burkina Faso, au Ghana, au Mali et en Ouganda.

Les travaux de “Target Malaria” ont débuté en 2008 avec un moustique mâle stérile *Anophèles gambiae* génétiquement modifié pour créer des mâles stériles par insertion d'ADN codant pour I-PpoI, une endonucléase de homing (HEG) provenant d'une moisissure visqueuse (*Physarum polycephalum*) qui clive spécifiquement les répétitions d'ADNr sur le chromosome X (Windbichler et al, 2008). Chez ces moustiques, l'expression de I-PpoI est régulée par le promoteur de la bêta2-tubuline (gène de stérilité) qui est sélectivement transcrit dans les testicules des moustiques mâles au cours de la différenciation des spermatozoïdes.

L'endonucléase est transmise via le sperme dans le zygote, ainsi les mâles hétérozygotes pour cette construction ne produisent aucune descendance viable. En juillet 2019, une équipe scientifique de l'Institut de Recherche en Science de la Santé du Burkina Faso en partenariat avec le consortium Target Malaria a procédé à Bana au lâcher à petite échelle d'environ 6400 moustiques génétiquement modifiés mâles stériles d'*Anopheles coluzzii* (Yao et al. 2022). Avant ce lâcher, plusieurs expériences avaient été menées sur la souche au laboratoire au Burkina. Les mêmes expériences sauf le lâcher ont été menées au Mali. Cette étape a permis aux deux pays ainsi que le consortium, l'acquisition de connaissances, le renforcement des capacités opérationnelles des équipes. Elle a aussi permis d'entamer un dialogue avec les communautés locales concernées par les activités du projet, ainsi qu'avec les parties prenantes aux niveaux national et international (Yao et al. 2022).

3.2.2. Dengue, Fièvre jaune, Zika – *Aedes* spp

Si pour les anophèles les efforts sont encore concentrés sur le niveau laboratoire, il faut noter que certaines des méthodes génétiques ont été appliquées sur le terrain contre le moustique du genre *Aedes*. Des *Aedes* génétiquement modifiés ont été lâchés dans une forêt en Malaisie entre 2009 et 2010 (Waltz 2016), en 2010 dans un site de terrain au Grand Caïman (Harris et al. 2012), dans la ville de Piracicaba au Brésil en 2015 (Carvalho et al. 2015), en 2012 au Panama (Waltz 2016) et en 2021 en Floride aux Etats-Unis tous des moustiques transgénique *Aedes aegypti* (OX513A) de la société Oxytec (Waltz 2021).

3.3. Autres stratégies de lutte génétique

3.3.1. Technique de l'insecte stérile par irradiation (SIT) – Principes, applications et quelques exemples

La technique de stérilité par irradiation a été utilisée contre d'autres maladies transmises par les moustiques comme la dengue, le Zika, la fièvre jaune, le chikungunya etc. Cette méthode a été couramment utilisée dans les

programmes de SIT qui consistait à l'exposition des mâles aux rayonnements gamma par irradiation qui provoquaient des ruptures chromosomiques dans les cellules germinales, entraînant une rupture du maintien de l'information génétique après la fécondation et la mort de l'embryon en développement précoce. La technique de l'insecte stérile inclut également comme méthode de stérilisation : l'incompatibilité cytoplasmique (IC) (appliquée en Birmanie en 1967 pour contrôler les populations de l'espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*), la chimio stérilisation (En 1972 en Inde pour contrôler les populations de l'espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*), la translocation chromosomiale, la chimio-stérilisation couplée à la translocation chromosomiale, l'incompatibilité cytoplasmique couplée à l'inversion chromosomiale dans différents pays, la liste n'est pas exhaustive. En principe, la stérilisation par irradiation est applicable à tout insecte nuisible, bien que la dose correcte doive être établie empiriquement afin d'assurer des dommages suffisants aux cellules germinales pour provoquer la stérilité tout en minimisant les dommages somatiques qui réduiront l'aptitude globale et la compétitivité d'accouplement de la population libérée (Nolan et al. 2011). Les programmes de SIT ont été très efficaces contre un certain nombre d'insectes nuisibles agricoles : en Amérique du nord les mouches méditerranéenne des fruits (*Medfly*; *Ceratitis capitata*) et autres mouches téphrites des fruits dans de nombreux pays du monde, la mouche tsé-tsé (exemple : *Glossina fuscipes*) vecteur de la trypanosomose de Zanzibar (Burt 2014).

3.3.2. Technique des insectes incompatibles (IIT) - Principes et quelques exemples

La stérilité peut également être induite par la libération de moustiques mâles infectés par des souches endosymbiotiques de *Wolbachia* (Alphey 2014). Cette bactérie infecte naturellement environ 40% à 60% de toutes les espèces d'insectes dans un large éventail de familles (Caragata et al.2016). Les souches endosymbiotiques de *Wolbachia* induisent une forme de stérilité connue sous le

nom d'incompatibilité cytoplasmique (IC), dans laquelle les embryons de femelles non infectées fécondés par le sperme de mâles infectés ne se développent pas. Les mâles infectés sont donc stériles lorsqu'ils s'accouplent avec des femelles non infectées ou infectés avec une espèce de *Wolbachia* différente (Saridaki et Bourtzis 2010), mais fertiles lorsqu'ils s'accouplent avec des femelles infectées (Alphey et al. 2013). La suppression des populations basée sur l'IC est connue sous le nom de technique des insectes incompatibles (IIT) (Lees et al. 2015). La bactérie bloque également la transmission de nombreux agents pathogènes humains importants chez les moustiques, notamment le *Plasmodium* et le chikungunya (Bian et al. 2013; Caragata et al. 2016; Moreira et al. 2009). La lutte contre le paludisme progresse rapidement avec l'application de *Wolbachia* à travers l'identification d'une infection indigène chez *Anopheles gambiae* et la création de la première trans-infection stable chez *Anopheles stephensi*, qui inhibe l'infection par le parasite du paludisme humain *Plasmodium falciparum* (Caragata et al. 2016). De plus, une population naturellement infectée d'*An. funestus* et d'*An. gambiae* a été découverte respectivement au Sénégal et au Burkina Faso (Baldini et al. 2014; Niang et al. 2018). Cette approche pourrait aussi être utilisée pour la suppression et/ou le remplacement de la population de moustique responsable du paludisme. Parmi les nombreux exemples de *Wolbachia* on peut citer : la compétence réduite aux arbovirus pour donner suite à l'invasion durable de *Wolbachia* dans *Aedes aegypti* indigène du sud-est du Brésil dans l'agglomération de Rio de Janeiro (Gesto et al. 2021), l'envahissement de deux populations naturelles d'*Aedes aegypti* en Australie, atteignant une quasi-fixation quelques mois après la libération de *A. aegypti* (Hoffmann et al. 2011).

Des études de faisabilité pour l'utilisation de l'IIT avec ou sans irradiation ont été menées au laboratoire et sur le terrain pour contrôler les populations de l'espèce de moustique *Ae. Albopictus* (Calvitti et al. 2010) , *Ae. polynesiensis* (Brelsfoard et al. 2009), *Cx. pipiens pallens* et *An. stephensi* (Chen, Zhu, et Zhang 2013)

3.3.3. IIT et SIT combinées : Principes et quelques exemples

La stérilité des mâles relâchés due à la fois à *Wolbachia* et à une irradiation à faible dose est connu sous le nom de : technique combinée d'insectes stériles et technique d'insectes incompatibles SIT/IIT (Kittayapong et al. 2018). Cette combinaison permet de stériliser par irradiation toutes les femelles en cas de lâcher accidentel de ces derrières et n'interféreraient donc pas avec l'IC induit dans la population (Flores et O'Neill 2018). Cette méthode pourrait être efficace sur le terrain en raison de la faible dose d'irradiation des mâles (Zhang et al. 2015).

Des études ont été menées sur des moustiques *Ae. Albopictus* au laboratoire et en milieu semi-terrain (Zhang et al. 2015; 2016).

MATERIELS ET METHODES

Matériel et méthodes9

4.1. Site d'étude

L'étude s'est déroulée à l'insectarium du laboratoire de transgénique du département d'entomologie médicale de la MRTC (*Malaria Research and Training Center*) dans la Faculté de Médecine d'Odontostomatologie (FMOS) et de la faculté de pharmacie (FAPH) à l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) (voir figure 2).



FIGURE 2: SITE D'ETUDE (LABORATOIRE TRANSGENIQUE DU MRTC, 2019)

Le laboratoire transgénique de Target Malaria au Mali est un laboratoire de confinement d'arthropode de niveau de sécurité II (ACL2), l'un des premiers du continent africain destiné à l'élevage des moustiques génétiquement modifiés. Il a été bâti grâce à un partenariat entre le MRTC et l'université de "Keele" au Royaume-Uni, avec le soutien de la fondation "Wellcome Trust". Son inauguration a eu lieu le 3 août 2010.

Il fut rénové, en 2015, et mis à niveau pour correspondre aux normes ACL2 dans le cadre d'un autre partenariat cette fois-ci avec Imperial College (Angleterre) à travers un projet dénommé « Target Malaria ». Target Malaria est un consortium de recherche à but non lucratif qui vise à développer et à partager les technologies génétiques nouvelles, durable et économique visant à modifier les moustiques et ainsi réduire la transmission du paludisme. Le laboratoire

comporte un système de double porte non ouvrable simultanément. Seuls les personnels autorisés ont accès. Le confinement est renforcé par l'installation de rideaux au niveau des portes. Des pièges lumineux sont installés dans le laboratoire, l'insectarium, et chacun des deux petits vestibules (SAS). Des ventilateurs installés dans chaque SAS sont automatiquement mis en marche quand l'une des portes s'ouvre, empêchant les moustiques de s'échapper. L'insectarium est composé d'une petite salle consacrée au gorgement, d'une autre petite salle pour l'élevage de moustiques locaux non modifiés et d'une grande salle consacrée à l'élevage des moustiques génétiquement modifiés. Les moustiques non modifiés et modifiés sont donc maintenus dans des salles distinctes du laboratoire, mais tous sous les mêmes conditions de photo périodicité (12h jour, 12h nuit) de température ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) et d'humidité relative ($80\% \pm 10$). La température et l'humidité de l'insectarium sont automatiquement enregistrées dans une base de données.

4.2. Type et Période d'étude

C'était une étude expérimentale conduite en condition de laboratoire. Elle s'est déroulée de janvier 2020 à février 2021.

4.3. Déroulement des expériences

Les expériences ont été réalisées à l'insectarium de confinement de moustiques de Target Malaria du MRTC au Mali. Deux souches de moustiques anophèles y étaient élevées. La première souche est *Anopheles coluzzii*, du type local (*wild-type*). Elle provient des sites d'étude du projet Target Malaria (Ouassorola, et Sogolombougou, cercle de Kati, région de Koulikoro). Cette souche a été établie en octobre 2013 et maintenue au laboratoire pour les travaux de recherche de Target Malaria en utilisant des procédures opérationnelles normalisées. La seconde souche est une souche transgénique de *An.coluzzii* porteuse d'une modification génétique conférant une stérilité aux mâles avec un caractère dominant. Cette souche a été désignée par (Ac(DSM)2) pour « *Anopheles coluzzii* Dominant Sterile Males ». La lignée Ac(DSM)2 a été

obtenue par introgression, en croisant des femelles transgéniques *An.gambiae* d'une souche de laboratoire dénommée « G3 » avec des mâles locaux du Mali. Cette souche modifiée a été désignée (Ag(DSM)2) pour « *Anopheles gambiae* Dominant Sterile Males ».

Le chiffre renvoie au type de moustiques modifiés en relation au site d'insertion de la construction génétique. Cette souche (Ag(DSM)2) fut importée du laboratoire de Target Malaria de Terni, en Italie.

La souche de moustiques transgéniques de départ a été introduite dans le laboratoire sous forme d'œufs, après l'obtention d'une autorisation d'utilisation (arrêté N°2019 1563/MEADD-SG du 21 juin 2019) auprès du Ministère de l'Environnement, de l'Assainissement et du Développement Durable (MEADD) du Mali qui est l'autorité nationale compétente pour la réglementation des organismes génétiquement modifiés. La souche Ac(DSM)2 a été maintenue dans l'insectarium par rétrocroisement entre les femelles modifiées et les mâles locaux. Ce rétrocroisement (backcross ou BC) produit d'une part des descendants transgéniques (caractérisés par la présence du transgène et du marqueur détectable DsRed qu'il contient) et d'autre part des descendants non transgéniques (chez lesquels le marqueur DsRed est absent).

Les moustiques mâles et femelles transgéniques contiennent tous deux le même transgène, mais la stérilité n'est exprimée que dans les gonades des moustiques mâles, chez lesquels on anticipe que le sperme n'est pas fertile. Ils ont les caractéristiques suivantes : Fluorescence rouge (DsRed) dans les tissus nerveux (chez les mâles et les femelles) ; fluorescence verte (GFP = Green Fluorescence protéine) dans les testicules (uniquement chez les mâles). Il est attendu que le sperme soit stérile, comme observé par (Windbichler et al. 2008) et (Klein et al. 2012).

4.3.1. Détermination du niveau d'introggression

L'introggression consistait à rétrocroiser les femelles de la souche génétiquement modifiée Ac(DSM)2, avec la colonie locale (wild type). Cela passait par plusieurs étapes à savoir

4.3.1.1 Le Tri des larves

Séparation des larves DsRed positives et négatives. Les larves transgéniques ont été séparées des non transgéniques aux troisième et quatrième stades larvaires (L3/L4). Pour cela, les larves ont été étalées individuellement dans des puits (8puits) sur une lame de microscope (ER-201B-CE24 6mm), en utilisant le moins d'eau possible. Elles ont été observées sous la loupe à fluorescence en déterminant la présence ou l'absence du marqueur DsRed au niveau des yeux (voir figure 3). À l'aide d'une pipette en plastique, les larves DsRed positives (larves ayant la fluorescence rouge au niveau des yeux) ont été triées des DsRed négative (larves n'ayant pas de fluorescence rouge). Elles ont alors été regroupées en fonction de leur statut (positive ou négative) dans des pots qui avaient été étiquetés.

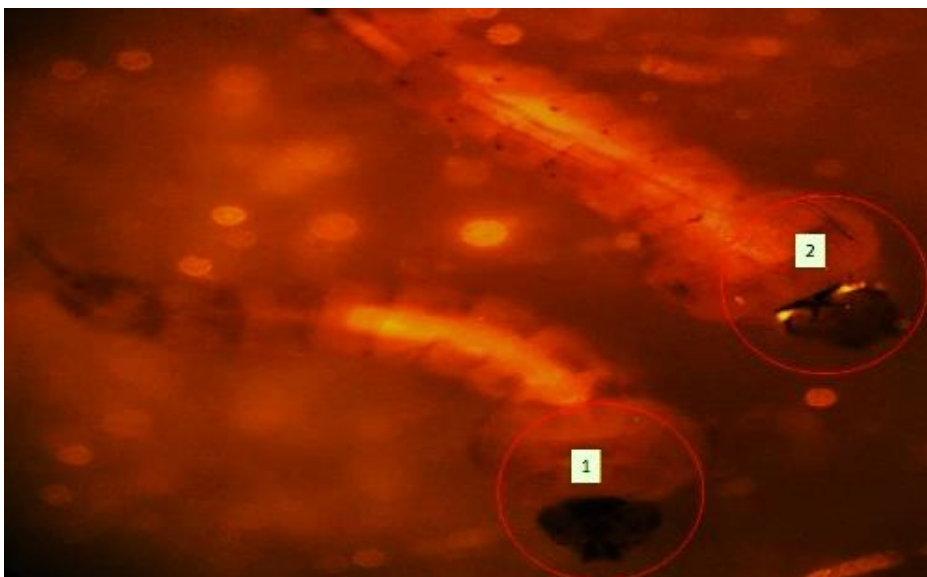


Figure 3: Photo d'une larve non modifiée (1) et d'une larve modifiée (2).

Source (Laboratoire transgénique du MRTC, 2019).

4.3.1.2 Tri des nymphes

A. Séparation des nymphes mâles des femelles

À l'apparition des nymphes, elles ont été collectées, puis triées par sexe sous une loupe binoculaire ; Transférées par lot, environ une trentaine était placée dans une boîte de Pétri contenant une petite quantité d'eau.

Un pinceau à bout fin servait à faire bouger délicatement chaque nymphe pour regarder la partie terminale de l'abdomen afin d'identifier le sexe (figure 4).

Les nymphes triées ont été transférées dans les pots de la manière suivante : mâles positifs, femelles positives, mâles négatifs et femelles négatives.



FIGURE 4: PHOTO D'UNE NYMPHE FEMELLE (1) ET D'UNE NYMPHE MALE (2).

SOURCE (LABORATOIRE TRANSGENIQUE DE TARGET MALARIA AU MRTC, 2019)

B. Établissement des cages

Les nymphes une fois triées, sont placées dans les cages en croisant les femelles génétiquement modifiés avec les mâles locaux (wild types) ce qui constituait les rétrocroisements (BC).

C. Moustiques expérimentaux

Des rétrocroisements (BC) 2 à 7, des échantillons de moustiques adultes ont été conservés dans des tubes Eppendorf individuels de 1,5 ml contenant de l'éthanol à 80 % et stockés à -20 °C prêts pour le génotypage.

D. Conception expérimentale

L'identification des espèces par PCR a été effectuée sur un total de 905 échantillons du 2^e au 7^e rétrocroisement ; BC 2 (5 échantillons) ; BC 3 (100 échantillons) ; BC 4 (200 échantillons) ; BC 5 (200 échantillons) ; BC 6 (200 échantillons) ; BC 7 (200 échantillons) ont été analysés.

La PCR menée selon la méthode de Wilkins et al. 2006 a été utilisée pour le génotypage, sur la base d'un polymorphisme unique spécifique à l'espèce (SNP) dans la région de l'espaceur intergénique, incorporant des mésappariements intentionnels dans les amorces pour augmenter la spécificité.

L'ADN issu des échantillons a été extrait à l'aide de la méthode de tampon de charge (100 µl de tampon de charge 10X* [composé de MgCl₂] ajoutés à 900 µl d'eau stérile). 1 échantillon de moustique dans 50 µl de tampon de charge préchauffé pendant 15 min à 95 °C. La PCR a été exécutée à l'aide d'une matrice d'ADN de 1 µl.

Les amorces utilisées pour les réactions étaient :

IMP-UNF GCTGCGAGTTGTAGAGATGCG : amorce universelle

IMP-M1R TAGCCAGCTCTTGTCCACTAGTTTT pour *Anopheles coluzzii* (333 paires de bases)

IMP-S1R CCAGACCAAGATGGTTCGCTG pour *Anopheles gambiae* (221 paires de bases)

AR-3TR GTGTTAAGTGTCCCTTCTCCGTC pour *Anopheles arabiensis* (387 paires de bases)

Le cycle thermique de PCR (Thermocycleur ARTIK de Thermo Fisher Scientific) pour les réactions consistait en une fonte à 95 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de 95 °C pendant 30 secondes, 54 °C pendant 30 secondes et

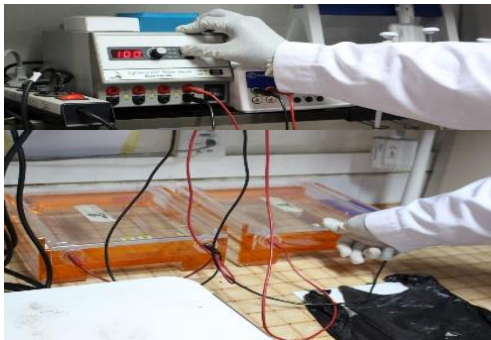
72 °C pendant 30 secondes, puis d'un cycle à 72 °C pendant 5 minutes et d'un maintien à 4 °C. La migration a été réalisée sur du gel d'agarose à 1,5 %. Voir la figure 5.



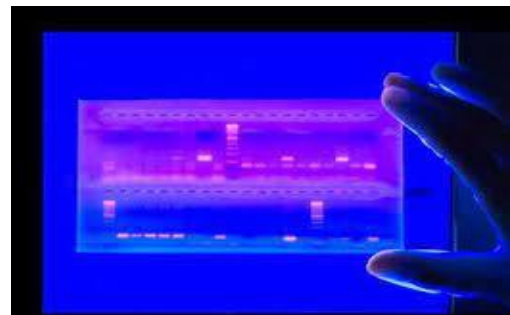
1- collecte des moustiques



2- Extraction et amplification de l'ADN des moustiques



3- migration sur gel



4- Photo d'un gel après lecture sur ordinateur

Figure 5 : processus du génotypage par la PCR

4.3.2 Détermination de l'avidité pour le gorgement

Dans cette étude, l'un des objectifs était de savoir si le statut transgénique des femelles Ac(DSM)2 avait un effet sur leurs caractéristiques de fécondité, notamment l'avidité pour le sang, la probabilité de pondre et le nombre d'œufs pondus, par rapport aux femelles non transgéniques. Les larves et les nymphes modifiées et wild type ont été triées comme décrits dans la section d'introgession (4.3.1 .1) afin d'établir les cages de stocks contenant chacune les femelles transgéniques, les femelles non transgéniques et les mâles Wild type. Ces moustiques ont été utilisés pour constituer les cages expérimentales. Voire figure 6.



Figure 6 : Photo de gorgement des moustiques

Source : Laboratoire Transgénique du MRTC.

4.3.2.1. Établissement des cages expérimentales

Au total, deux cages expérimentales de 30x30x30 cm ont été établis. Une première cage contenant 100 femelles transgéniques âgées de 3-4 jours et 100 mâles de la colonie locale (wild type) âgés de 3 jours. Une deuxième de contenant 100 non-transgéniques âgées de 3-4 jours et 100 mâles de la colonie locale (wild type) âgés de 3 jours. Pour une bonne probabilité d'accouplement, les moustiques

ont été nourris avec du jus sucré à 10 % de saccharose plus 0,1% de méthyl parabène (méthyl 4-hydroxybenzoate) dans un tube Falcon® dont la fermeture comporte un tissu à maille très serré était suspendu dans les cages. Les adultes se nourrissaient à travers ce tissu pendant 3 jours avant d'être gorgés.

4.3.2.2. Processus de gorgement

À l'aide d'un appareil de gorgement de type « Hemotek Membrane Feeding System » (Hemotek Ltd), les moustiques ont été gorgés. L'appareil d'alimentation est composé de six plaques (6) d'aluminium à laquelle une membrane de collagène (Parafilm) est fixée et remplie de sang maintenu chaud par un élément chauffant électrique. Les moustiques sont au préalable mis à jeun pendant six heures et gorgé au crépuscule pendant 30 minutes.

À la fin du gorgement, les disques du feeder contenant le sang sont retirés, nettoyés et lavés à l'eau de robinet. Les disques sont ensuite trempés dans une solution d'eau javellisée à 1% pendant 30 minutes afin d'être désinfecté. Afin d'enlever les résidus de chlore, les disques sont lavés une seconde fois à l'eau de robinet et gardés pour une prochaine utilisation. Le lendemain, les moustiques n'ayant pas pris de sang pendant le 1^{er} gorgement ont été retirés et les femelles soumises à un second gorgement comme la 1^{ère} fois.

Le troisième jour après le second gorgement, les femelles positives et négatives de toutes les cages ont été aspirées et placées dans des pots pour faire des pontes individuelles.

4.3.2.3. Ponte individuelle

A l'aide d'aspirateur à bouche, les femelles étaient retirées des cages et introduites dans les pots individuels (voir figure 5) contenant un papier buvard imprégné par l'eau et le pot recouvert par une tissu moustiquaire. Les femelles ont alors été nourries de saccharose par l'intermédiaire du coton imbibé dans le jus. Pendant 4 jours, nous avons surveillé la présence d'œufs pondus. Les femelles ayant pondu des œufs ont été isolés et les œufs ont été conservés dans de l'eau en

vue de leur éclosion. Parlement à ce processus, la dissection des spermathèques était menée.



FIGURE 7: MOUSTIQUE EN PONTE INDIVIDUELLE (UNE FEMELLE PAR POT).

Source : Laboratoire Transgénique du MRTC.

4.3.2.4 Dissection des spermathèques

Chaque jour, les femelles mortes et vivantes (dernier jour) qui n'avaient pas pondu étaient disséquées afin d'évaluer le statut d'insémination par examen de leur spermathèque (organe de stockage du sperme).

Il consistait anesthésier la femelle vivante et la disséquer dans une goutte de solution physiologique de Phosphate Buffer Saline (PBS), puis à l'aide d'une pince et d'une aiguille à disséquer la femelle pour faire sortir la spermathèque (voir figure 7 ; 8 ; 9 ; 10). Sur les lames, la fluorescence séminale a été observée à l'aide d'un microscope Evos FL à cube lumineux avec longueurs d'onde d'excitation de 470 nm et d'émission de 525 nm. Le quatrième jour après isolement des femelles dans les pots de ponte, les spermathèques de toutes les femelles n'ayant pas pondu ont été disséquées pour en évaluer le statut d'insémination. Puis a suivi l'examen de la fécondité et de la fertilité.

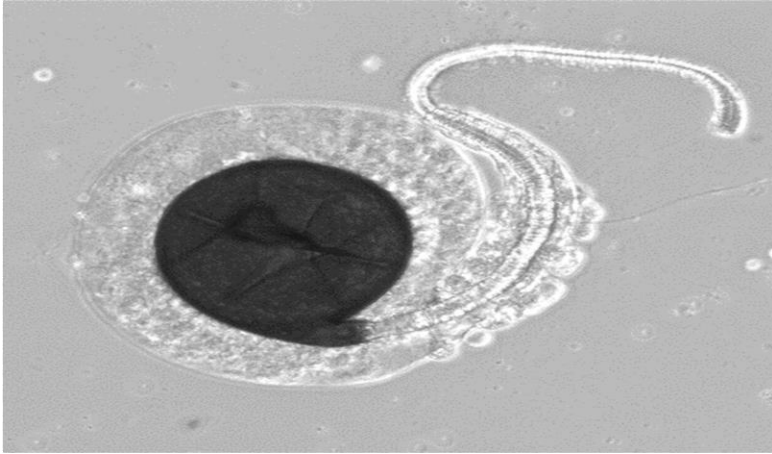


FIGURE 8: PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE NON OUVERTE

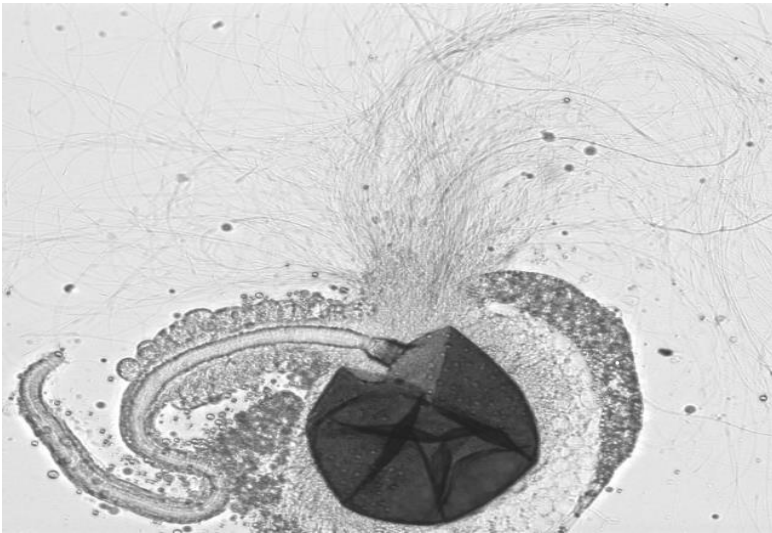


FIGURE 9: PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE OUVERTE

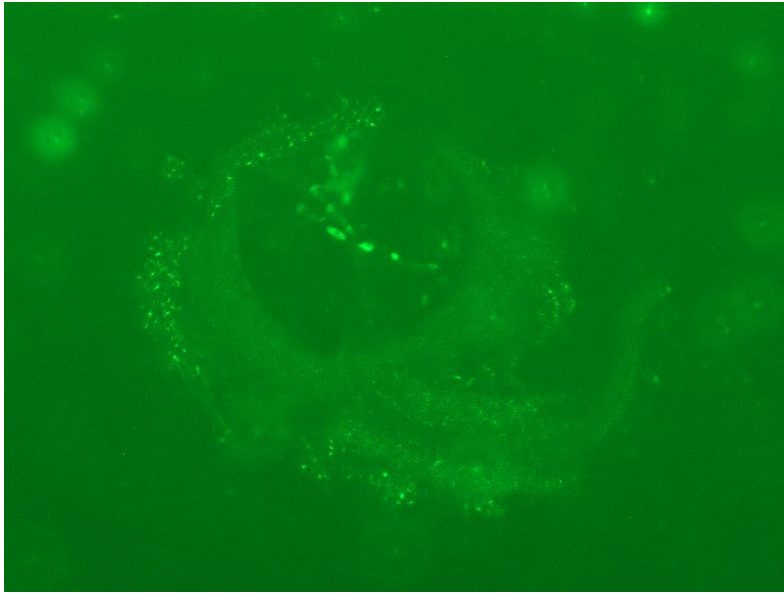


FIGURE 10: PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE INSEMINEE A LA FLUORESCENCE VERTE.

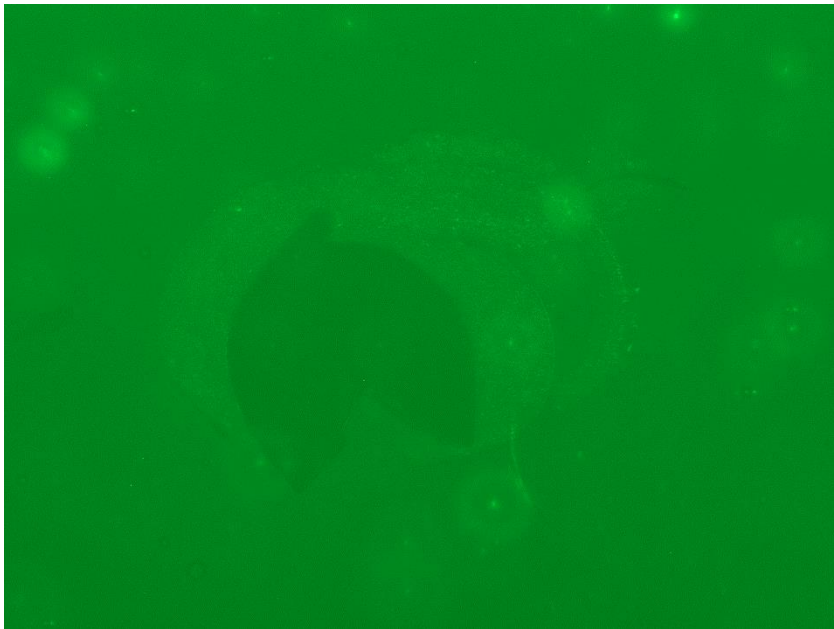


FIGURE 11: PHOTO D'UNE SPERMATHEQUE NON INSEMINEE A LA FLUORESCENCE VERTE.

4.3.2.5 Examen de la fécondité et de la fertilité

Les tubes contenant des œufs ont été examinés à l'aide d'une loupe afin de déterminer la fécondité et la fertilité par comptage des œufs éclos et non éclos.

4.3.3 Détermination du statut de résistance

Un protocole standardisé permettant d'évaluer la sensibilité des anophèles femelles est fournie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 1998). Les moustiques vecteurs d'une espèce donnée sont exposés dans tubes à essais spéciaux, contenant du papier filtre imprégné d'une concentration létale (dose discriminatoire) d'un insecticide donné dissout dans de l'huile.

Au total huit insecticides ont été testés sur les moustiques génétiquement modifiés et la colonie locale (wild type). Ces insecticides qui regroupaient les quatre classes d'insecticides ont été utilisés aussi bien sur les larves mais également sur les adultes (voir tableau N : 1).

TABLEAU 1: NOMS, CLASSES, ET CONCENTRATIONS DES INSECTICIDES UTILISES

Nom d'insecticide	Concentration	Classe d'insecticide	Type d'insecticide
Alpha-cypermethrine	0.05%	Pyréthroïdes	Adulticide
Deltaméthrine	0.05%	Pyréthroïdes	Adulticide
Perméthrine	0,75%	Pyréthroïdes	Adulticide
Lambda-cyhalothrine	0.05%	Pyréthroïdes	Adulticide
DDT	4%	Organochlorés	Adulticide
Fénitrothion	1%	Organophosphates	Adulticide
Bendiocarbe	0.1%	Carbamates	Adulticide
Téméphos	0.25 mg/l	Organophosphates	Larvicide

Les moustiques génétiquement modifiés Ac(DSM)2 ont été élevés comme décrits dans la section méthodologie 4.2. Le tri a été fait comme décrits dans la même section méthodologie 4.3.1.1. Quant à la colonie locale, elle a été élevée

comme décrits dans la section 4.3 et triées par sexe comme les moustiques génétiquement dans la section méthodologie 4.3.1.1.

4.3.3.1 Statut de résistance chez les adultes

L'étude a été menée en utilisant les tests de bio-essais 2018 de l'organisation mondiale de la santé. Il s'agit, d'utiliser six feuilles de papier blanc propre (12 x 15 cm), roulées en forme de cylindre et insérées dans six tubes de maintien (un par tube) et fixé en position avec une pince à ressort en acier. Les tubes qui étaient marqués au vert étaient attachés l'un à l'autre à l'aide des dispositifs.

À l'aide d'un aspirateur à bouche, 150 femelles étaient transférées à travers le trou de remplissage de la glissière dans les tubes de bio-essais à raison de 25 femelles par tubes, Une heure plus tard, les femelles mortes étaient éliminées. Six tubes (d'exposition étaient préparés à peu près de la même manière. Quatre étaient marqués au rouge et deux au jaune. Les tubes d'exposition marqués au rouge contenaient chacun une feuille de papier imprégné d'insecticide, tandis que les 2 tubes d'exposition de contrôle à points jaunes contenaient les papiers imprégnés d'huile car les insecticides étaient dilués dans l'huile. Chacun était fixé en position avec un fil à ressort en cuivre agrafe.

Les moustiques étaient soufflés doucement dans les tubes d'exposition. Une fois que tous les moustiques étaient dans les tubes d'exposition, l'unité de glissière était fermée et les tubes de maintien étaient détachés et mis de côté.

Les observations du nombre de moustiques assommés (*Knock Down*) étaient effectuées pendant la période d'exposition de 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes. Après l'exposition, les femelles sont transférées dans les tubes marqués en vert et la lecture est faite 24 h plus tard afin de déterminer le statut de résistance.

4.3.3.2 Statut de résistance chez les larves

Pour les larves, une solution de traitement de 0,25 mg/l de Téméphos a été préparée ainsi qu'une solution de contrôle d'éthanol. Cela, de telle sorte que la

concentration finale d'éthanol dans la solution de traitement témoin était la même que celle du traitement à l'insecticide. Pour la réalisation de l'expérience, 6 pots en plastique de 225ml et 10cm de diamètre étaient utilisés. Quatre pots étaient destinés à l'exposition des larves à l'insecticide et 2 au contrôle. A l'aide d'un tamis, 25 larves de stade 3-4 étaient transférées dans chaque pot avec 25 ml soit de la solution d'insecticide ou soit de la solution d'eau et éthanol. Les pots ont été gardés à l'insectarium et la lecture a été faite 24h plus tard en dénombrant les larves mortes. Un moustique est considéré comme vivant s'il est en mesure de voler, indépendamment du nombre de pattes qui lui restent. Un moustique est classé comme mort ou « *knocked down* » s'il est immobile ou incapable de se lever ou de s'envoler (OMS 2018). Tous les moustiques « *knocked down* » (assommés ou en état de choc), qu'ils aient ou non perdu des pattes ou des ailes, sont considérés comme moribonds et comptés pour morts.

A. Détermination du taux de mortalité

La mortalité dans l'échantillon testé est calculée en sommant le nombre de moustiques morts dans l'ensemble des tests d'exposition répliqués et en exprimant cette somme sous forme de pourcentage par rapport au nombre total de moustiques exposés :

Taux de mortalité observée = (nombre de mort total /nombre total exposé) ×100

Il faudra effectuer un calcul similaire pour obtenir une valeur de la mortalité parmi les témoins. Si celle-ci est $\geq 20\%$, les résultats des tests devront être écartés. Lorsqu'elle est $\leq 20\%$, la mortalité observée doit être corrigée à l'aide de la formule d'Abbott de la façon suivante

Taux de mortalité corrigée = (nombre de mort total /nombre total exposé) × 100corrigée

Si la mortalité chez les témoins est $\leq 5\%$ aucune correction n'est nécessaire sur les résultats de test, tandis que si cette mortalité est $\geq 5\%$, une correction s'impose. Lors du rapport des résultats de mortalité, on indiquera toujours la taille

de l'échantillon et, de préférence, une estimation de l'intervalle de confiance à 95 % (OMS 2018).

B. Interprétation des résultats

Les recommandations relatives aux tests de sensibilité avec les concentrations discriminantes sont les suivantes :

- Résistant si mortalité $\leq 90\%$
- Résistance probable si mortalité est comprise entre 90 - 97%
- Sensible si mortalité $\geq 98\%$

RESULTATS

RÉSULTATS

5.1. Résultat de l'introgression

Après identification des échantillons par la technique de PCR, le transgène fut introgressé avec succès dans le patrimoine génétique *d'Anopheles coluzzii* dès le 2ème rétrocroisement à 80% et atteignit 100% au 7ème rétrocroisement. Le tableau 2 résume les résultats de la PCR en présentant un pourcentage pour chaque catégorie à la figure 10.

Tableau 2: Résumé des résultats de la PCR pour l'identification des espèces.

Ac – *Anopheles coluzzii*, *Ag* – *Anopheles gambiae*

Rétrocroisement	Résultats PCR			Total des identifications confirmées d'espèces	% de chaque catégorie	Fréquence allélique %				
	<i>Ac</i>	Hybride <i>Ag/Ac</i>	<i>Ag</i>			Non identifié/Échec de la PCR	<i>Ac</i>	Hybride <i>Ac/Ag</i>	<i>Ag</i>	<i>Ac</i>
BC2	4	1	0	5	0	0,8	0,2	0	9	1
BC3	88	12	0	100	0	0,88	0,12	0	188	12
BC4	158	5	0	163	37	0,969	0,031	0	321	5
BC5	128	8	0	136	64	0,941	0,059	0	264	8
BC6	188	2	4	194	6	0,969	0,0121	0,021	378	10
BC7	183	0	0	183	17	1	0	0	366	0

Après chaque rétrocroisement des moustiques, nous avons obtenu des proportions pour les hybrides avec des fréquences alléliques différentes.

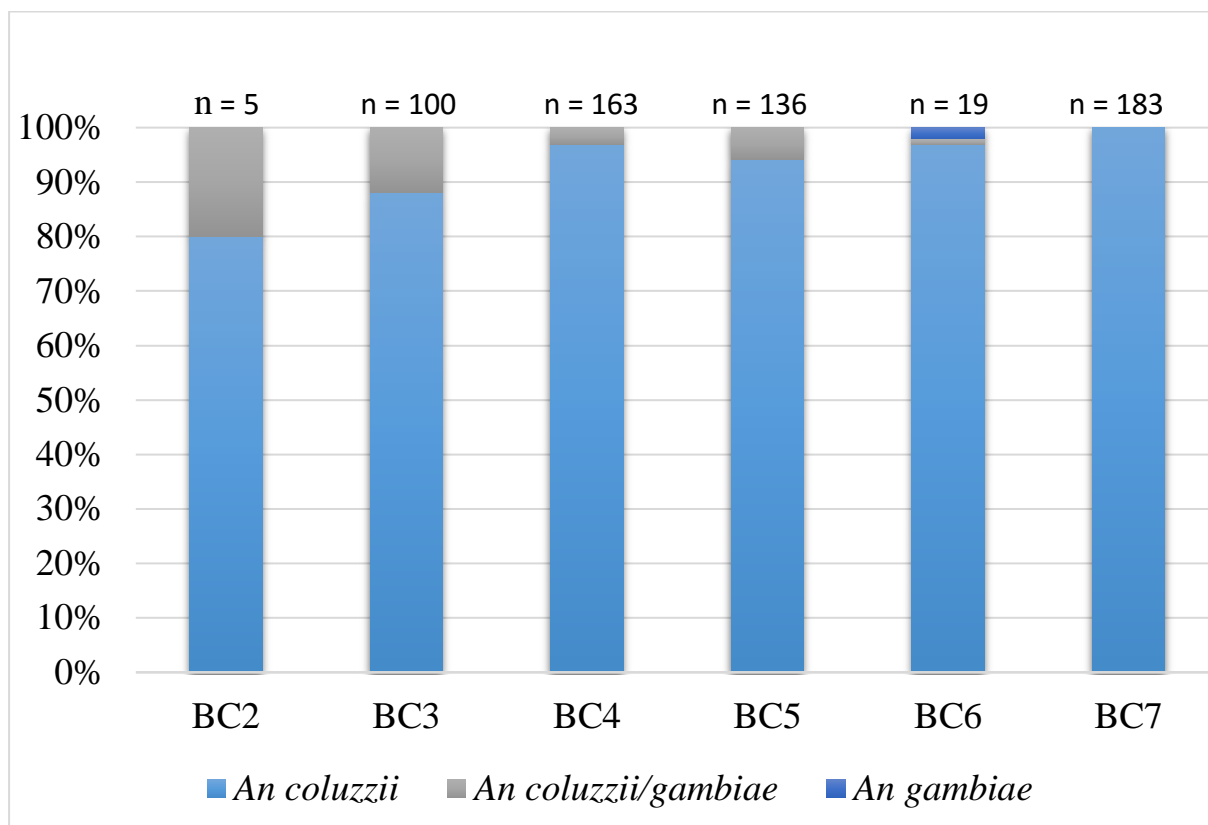


FIGURE 12: AUX DE GENOTYPAGE DES ESPECES ANALYSEES.

5.2. Résultat de l'avidité au gorgement pour le repas sanguin

Après l'analyse des paramètres de l'avidité pour le repas sanguin, nous avons obtenu :

5.2.1. Avidité pour le repas sanguin

La survie des femelles dans la cage d'accouplement avant le repas de sang était supérieure chez les femelles transgéniques (89,0 % vs 79,0 %), mais ce résultat n'était pas significatif. Parmi les femelles survivantes, 97,5 % ont eu un repas de sang, par rapport à 92,1 % chez les femelles non modifiées. Cette différence n'est pas significative (Tableau 3).

5.2.2. Probabilité de pondre

Le nombre de femelles ayant pondu par rapport au nombre de femelles nourries de sang (nombre de pots de ponte simples) était identique entre les

femelles modifiées et les femelles non modifiées, 51,7 % et 45,6 % d'entre elles ayant pondu, respectivement. (Tableau 3).

Le nombre de femelles mortes dans les pots de ponte simples avant la ponte (3 jours) a été évalué car ce nombre pourrait influencer le nombre total de femelles ayant pondu. La mortalité observée était significativement supérieure pour les femelles modifiées par rapport aux femelles non modifiées avec 35,0 % vs 11,8 %, respectivement. Il est à noter que le nombre de femelles survivantes ayant pondu était significativement supérieur chez les femelles modifiées (79,5 %) par rapport aux femelles de comparaison non modifiées (51,7 %).

5.2.3. Taux d'insémination de femelles qui n'ont pas pondu d'œufs

La dissection des femelles n'ayant pas pondu (mortes avant la ponte ou toujours vivantes mais n'ayant pas pondu) a montré un taux d'insémination significativement supérieur pour les femelles modifiées (34,6 %) par rapport aux femelles non modifiées (8,6 %).

5.2.4. Fécondité et fertilité

Le nombre moyen d'œufs issus de femelles ayant pondu était légèrement supérieur pour les femelles non modifiées (103,8, ET = 46,7) par rapport aux femelles modifiées (89,2, ET = 16,6), même si cette différence n'était pas significative. Le taux d'éclosion était également supérieur pour les femelles non modifiées par rapport aux femelles modifiées avec 83,8 % (ET = 44,1 %) et 70,5 % (ET = 32,9 %), respectivement. Cette différence était significative uniquement au seuil de signification de 0,5 % (Tableau 3).

Tableau 3: Résultat des paramètres de l'avidité au gorgement pour le repas sanguin

Évaluation	Paramètre	Nb de non transgéniques	Nb de transgéniques	Statistique de test	D L	Valeur p
Avidité	Nombre initial de femelles	100	100			
	Nb initial aux repas	79 (79,0 %)	89 (89,0 %)	$\chi^2 = 3,72$	1	0,054
	Nb de femelles gorgées	77 (97,5 %)	82 (92,1 %)	$\chi^2 = 2,35$	1	0,125
Probabilité de pondre	Nb de pots de ponte simples	68	60			
	Nb de femelles mortes avant ponte	8 (11,8 %)	21 (35,0 %)	$\chi^2 = 9,82$	1	0,002
	Nb de femelles ayant pondu / nb de pots de ponte simples	31 (45,6 %)	31 (51,7 %)	$\chi^2 = 0,47$	1	0,492
	Nb de femelles ayant pondu	60	39			
	Nb de femelles en cours de ponte / nombre de femelles ayant pondu	31 (51,7 %)	31 (79,5 %)	$\chi^2 = 7,82$	1	0,005
Taux d'insémination	Nb de femelles disséquées	35	26			
	Nb de femelles inséminées / nb de femelles disséquées	3 (8,6 %)	9 (34,6 %)	$\chi^2 = 6,40$	1	0,011
Fécondité	Nb moyen d'œufs par femelle ayant pondu	103,8 (ET = 46,7)	89,2 (ET = 16,6)	t = 1,269	60	0,209
Fertilité	Taux d'éclosion	83,8 % (ET = 44,1 %)	70,5 % (ET = 32,9 %)	t = 2,017	44	0,0498

Après l'évaluation des paramètres caractérisant l'avidité pour le gorgement, nous avons obtenu des résultats comparatifs entre les deux souches.

Des petites différences ont été observées entre les deux souches mais elles n'étaient pas significatives pour les paramètres évalués.

5.3. Résultat des tests d'insecticides évaluant le statut de la résistance

A. Colonie modifiée Ac(DSM)2

Une mortalité de 100 % a été observée avec les 8 insecticides, tandis que la mortalité des moustiques témoins reste systématiquement faible ≤ 6 %. Cela confirme que la souche Ac(DSM)2 n'est pas résistante aux insecticides testés (Tableau 4).

B. Colonies locales Ac(WT)A et Ac(WT)B

Une mortalité de 100 % a été observée avec les 8 insecticides, tandis qu'aucune mortalité n'a été observée chez les moustiques témoins. Cela confirme que les deux souches locales, Ac(WT)A et Ac(WT)B, ne sont pas résistantes aux insecticides testés (Tableaux 5 et 6).

Tableau 4: Mortalité observée chez les moustiques Ac(DSM)2 exposés aux insecticides et chez les moustiques témoins.

Insecticides et concentration	Nombre de moustiques testés	Mortalité (%)	Nombre (témoins)	Mortalité (%)
Deltaméthrine à 0,05 %	100	100	50	6
Bendiocarbe à 0,1 %	100	100	50	4
DDT à 4 %	100	100	50	6
Perméthrine à 0,75 %	100	100	50	6
Alpha-cyperméthrine à 0,05 %	100	100	50	6
Lambda-cyhalothrine à 0,05 %	100	100	50	6
Fénitrothion à 1 %	100	100	50	4
Téméphos à 0,25 mg/l	100	100	50	0

Nous avons obtenu 100% de mortalité avec la souche génétiquement modifiée après les tests d'insecticides.

TABLEAU 5: MORTALITE CHEZ LES MOUSTIQUES Ac(WT)A EXPOSES AUX INSECTICIDES ET CHEZ LES MOUSTIQUES TEMOINS.

Insecticides et concentration	Nombre d'insectes testés	Mortalité (%)	Nombre (témoins)	Mortalité (%)
Deltaméthrine à 0,05 %	100	100	50	0
Bendiocarbe à 0,1 %	100	100	50	0
DDT à 4 %	100	100	50	0
Perméthrine à 0,75 %	100	100	50	0
Alpha-cyperméthrine à 0,05 %	100	100	50	0
Lambda-cyhalothrine à 0,05 %	100	100	50	0
Fénitrothion à 1 %	100	100	50	0
Téméphos à 0,25 mg/l	100	100	50	0

Nous avons obtenu 100% de mortalité avec la souche non-modifiée Ac(WT)A après les tests d'insecticides.

TABLEAU 6: MORTALITE CHEZ LES MOUSTIQUES Ac(WT)B EXPOSES AUX INSECTICIDES ET CHEZ LES MOUSTIQUES TEMOINS.

Insecticides et concentration	Nombre d'insectes testés	Mortalité (%)	Nombre (témoins)	Mortalité (%)
Deltaméthrine à 0,05 %	100	100	50	0
Bendiocarbe à 0,1 %	100	100	50	0
DDT à 4 %	100	100	50	0
Perméthrine à 0,75 %	100	100	50	0
Alpha-cyperméthrine à 0,05 %	100	100	50	0
Lambda-cyhalothrine à 0,05 %	100	100	50	0
Fénitrothion à 1 %	100	100	50	0
Téméphos à 0,25 mg/l	100	100	50	0

Nous avons obtenu 100% de mortalité avec la souche non-modifiée Ac(WT)B après les tests d'insecticides.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

6.1. Introgression

Les résultats de cette étude ont montré qu'après sept (7) rétrocroisements, une proportion d'individus homozygotes *Anopheles coluzzii*, a augmenté de 80 % du 2^{ème} rétrocroisement à 100 % au 7^{ème} rétrocroisement. Cela explique que l'identification des espèces a été réalisée avec succès sur les échantillons analysés, prouvant le transfert du transgène du patrimoine génétique de *Anopheles gambiae* vers celui de *Anopheles coluzzii*. Les résultats obtenus sont supérieurs à ceux de Nonhlanhla L Ntoyi et *al.* en 2022 en Afrique du sud sur *Anopheles arabiensis* après trois séries de croisements d'introgression, la descendance de cette souche a reçu le patrimoine génétique de la colonie sud-africaine (KWAG) d'environ 87,5 %, et, grâce à des rétrocroisements continus, ont obtenu un transfert de patrimoine génétique de la souche à plus de 99,9 %.

Les résultats de cette étude sont supérieurs aussi à ceux de Atonios A et *al.* 2021 qui ont obtenu sur la souche *Aedes aegypti* au Brésil un transfert du transgène de 75% au 3^{ème} rétrocroisement à 98,83% au 11^{ème} rétrocroisement.

6.2. Avidité au gorgement pour le repas sanguin

A. Survie des femelles :

La survie des femelles dans la cage d'accouplement avant le repas de sang était supérieure chez les femelles transgéniques (89 % vs 79 %), mais ce résultat n'était pas significatif. Parmi les femelles survivantes, 97,5 % ont eu un repas de sang contre 92,1 % chez les femelles non transgéniques.

B. Probabilité de pondre :

Le nombre de femelles ayant pondu par rapport au nombre de femelles gorgées était identique entre les femelles transgéniques et les femelles non transgéniques, soit respectivement 51,7 % et 45,6 %. Cette différence n'est pas significative. Les résultats de notre étude étaient comparables à ceux obtenus par Nonhlanhla L.Ntoyi et *al.* 2022 en Afrique du sud, qui après les analyses, ont trouvé des taux d'éclosion de 67% pour la souche DONGOLA (une souche non modifiée

d'*Anopheles arabiensis* élevée au laboratoire), contre 68,3% pour AY-2 (une souche *Anopheles arabiensis* modifiée portant le chromosome Y de *Anopheles gambiae* et le marqueur fluorescent rouge) tandis que KWAG (une souche de *Anopheles arabiensis* locale) et KWAG-AY2 (une souche hybride) étaient respectivement de 74,2% et 88,1%.

Les résultats de cette étude étaient comparables à ceux obtenus par Chaoyani Li et al. en 2008 sur la souche *Anopheles stephensis* avec trois lignées génétiquement modifiées, qui n'ont pas trouvé de différence avec un taux d'éclosion des œufs (une moyenne de 75%).

C. Taux d'insémination :

La dissection des femelles n'ayant pas pondu (mortes avant la ponte ou toujours vivantes mais n'ayant pas pondu) a montré un taux d'insémination significativement supérieur pour les femelles transgéniques (34,6 %) par rapport aux femelles non transgéniques (8,6 %). Les résultats de notre étude étaient supérieurs à celle réalisée par Irka Bargielowski et al. 2011 en Malaisie sur la souche *Aedes aegypti* OX513A qui ont trouvé un taux d'insémination de 11,5% pour les femelles non modifiées et 6,6% pour les femelles modifiées. Ces différences pourraient s'expliquer par la souche de moustiques utilisées. Les résultats obtenus au cours de cette étude, étaient inférieurs à ceux obtenus par Celia lutrat et al. 2022 sur la souche *Aedes albopictus* mais également aux études réalisées par Thaiti par Eric Chambers et al. en 2009 sur la souche *Aedes polynesis*. Ces deux études ont trouvé respectivement un taux d'insémination de 50% et 96%. Cette différence pourrait s'expliquer par la souche de moustiques utilisés. Les résultats de cette étude sont supérieurs à ceux de Michelle Eh Helinki et al. en 2008 sur *Anopheles aranbiensis*, qui ont obtenu 25% de taux d'insémination. Cette différence pourrait s'expliquer par la souche de moustiques utilisés.

D. Fécondité et fertilité :

Le nombre moyen d'œufs issus de femelles ayant pondu était légèrement supérieur pour les femelles non transgéniques (103,8, ET = 46,7) par rapport aux femelles transgéniques (89,2, ET = 16,6), même si cette différence n'était pas significative. Le taux d'éclosion était également supérieur pour les femelles non transgéniques par rapport aux femelles transgéniques avec 83,8 % (ET = 44,1 %) et 70,5 % (ET = 32,9 %), respectivement. Cette différence était significative uniquement au seuil de signification de 0,5 %.

La survie des femelles dans la cage d'accouplement avant le repas de sang était supérieure chez les femelles transgéniques (89,0 % vs 79,0 %), mais ce résultat n'était pas significatif. Parmi les femelles survivantes, 97,5 % ont eu un repas de sang, par rapport à 92,1 % chez les femelles non transgéniques. Cette différence n'est pas significative avec $p=0.024$. Ces différences observées entre les deux souches peuvent être expliquées par les conditions de maintien à l'insectarium, le poids du transgène, la technique de manipulation génétique utilisée pour la modification.

Les différences observées dans les deux lignées de patrimoine génétique similaire peuvent également être attribuées à plusieurs facteurs possibles et non exclusifs, la construction transgénique elle-même peut être délétère par l'un ou l'autre de deux mécanismes. Premièrement, les produits du transgène peuvent avoir des effets négatifs, c'est-à-dire que l'accumulation de produits génétiques étrangers résultant des gènes étrangers intégrés peut être délétère pour les cellules hôtes dans lesquelles ils sont exprimés. Deuxièmement, la transposition peut être associée à une mutagenèse d'insertion, par exemple un transgène peut s'insérer dans une région du génome active sur le plan transcriptionnel où il peut perturber la fonction du gène natif. Les différences observées dans l'aptitude à l'accouplement des mâles dans nos traitements ne sont pas surprenantes si l'on considère l'influence précédemment rapportée que les conditions environnementales typiques induisant un stress ont sur d'autres aspects critiques

du cycle de vie d'*A. aegypti*, tels que la longévité, la fécondité, la fertilité et la susceptibilité à la dengue (Barbosa et al. 1972, Couret et al. 2014, De Jesus et Reiskind 2016, Kang et al. 2017). Le contraste entre nos résultats et les études qui suggèrent que les moustiques génétiquement modifiés sont à un désavantage concurrentiel par rapport aux populations sauvages (Catteruccia et al. 2003, Irvin et al. 2004, Facchinelli et al. 2013, Franz et al. 2014) sont probablement dues à des différences dans la conception expérimentale. Les résultats de notre étude étaient comparables à ceux obtenus par Nonhlanhla I.Ntoyi et al. 2022 en Afrique du sud, qui ont obtenus avec les souches différentes, les taux d'éclosion moyens étaient de 67% pour DONGOLA, 68,3% pour AY-2 tandis que KWAG et KWAG-AY2 étaient respectivement de 74,2% et 88,1%.

Nos résultats étaient supérieurs à ceux de Munhenga Givemore et al. en 2016, ayant eu des données relatives à la fécondité des femelles AMAL¹ accouplées avec des mâles irradiés et des témoins un pourcentage moyen de femelles ayant réussi à pondre des œufs était compris entre 37 et 58 % chez les témoins et entre 23 et 33 % dans les cohortes traitées. Cependant, il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans le nombre de femelles pondant des œufs entre les femelles accouplées avec des mâles non irradiés (témoins) et celles accouplées avec des mâles irradiés (traitements).

Nos résultats étaient inférieurs à ceux de Cf Oliva et al. en 2012 au Sud Soudan dont les études ont été réalisées sur trois souches (ANO IPCL1, Dongola et sennar). Ils ont obtenu dans des conditions similaires, une fertilité moyenne qui différait significativement entre les trois génotypes et un pourcentage moyen d'éclosion des œufs d'ANO IPCL1, qui était faible ($26,8 \pm 0,2$ %) par rapport à ceux de Dongola ($94,5 \pm 1,8$ %) et de Sennar ($81,8 \pm 1,7$ %).

Cette étude est comparable à celle réalisée en Thaiti par Eric Chambers et al. 2008, qui n'ont pas obtenus de différence significative avec une souche de *Aedes*

polynesis modifiée avec *wolbakia* et ont obtenu un taux d'éclosion des œufs de 69%.

Ces différences pourraient s'expliquer par les types de souches ou espèces de moustiques (*Aedes aegypti*, *Anopheles coluzzii* et *Anopheles stephensis*.) de moustiques utilisées, les techniques de modification génétique, également le milieu et les conditions de déroulement des expériences.

6.3. Résistance aux insecticides utilisés

Les insecticides sont la principale méthode de contrôle des populations de moustiques. Nous avons testé la sensibilité de nos souches de moustique transgénique et local aux insecticides appartenant aux classes d'insecticides couramment utilisées avec un test standard de l'OMS. Après une heure d'exposition et 24 heures d'observation nous avons observé une mortalité de 100% avec les 8 insecticides. Ce ci indique que nos moustiques génétiquement sont aussi sensibles aux insecticides que nos moustiques locaux.

Les résultats de cette étude sont comparables à ceux obtenus par Andrew et *al.* en 2018, qui ont obtenus une mortalité totale sur *Anopheles stephensis* génétiquement modifié. Les résultats de notre étude sont comparables à ceux obtenus par Linda Grigorika et *al.* en 2021, qui ont obtenus une mortalité totale sur *Anopheles gambiae* génétiquement modifié portant le gène *kdr*.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. CONCLUSION

- Le transfert du gène de la souche de moustiques génétiquement modifiés dans la colonie locale d'*An. Coluzzii* a été effectuée.
- Les femelles modifiées ont une avidité pour le repas sanguin comparable à celle des femelles non modifiées.
- Les moustiques génétiquement modifiés sont aussi sensibles aux insecticides que les moustiques sauvages.

7.2 Recommandations

A la fin de notre étude nous formulerons les recommandations suivantes :

Aux autorités

- De soutenir de telles initiatives, en appuyant davantage les structures de recherche.

Aux structures de recherche

- D'approfondir la recherche sur les nouveaux outils de lutte contre les maladies à transmission vectorielle tels que les moustiques génétiquement modifiés

Aux partenaires

- De continuer à financer davantage la recherche sur les nouveaux outils de lutte contre les vecteurs du paludisme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alphey, Luke. 2014.

« Genetic control of mosquitoes ». Annual Review of Entomology
59 (janvier): 205-24.

2. Alphey, Luke, Andrew McKemey, Derric Nimmo, Marco Neira Oviedo, Renaud Lacroix, Kelly Matzen, et Camilla Beech.

« Genetic control of Aedes mosquitoes ».
Pathogens and Global Health
2013 Vol 107 (4): P: 170-79.

3. Alphey, Luke, Derric Nimmo, Sinead O’Connell, et Nina Alphey.

« Insect Population Suppression Using Engineered Insects ». In Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease, édité par Serap Aksoy,
Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer.
Annee: 2008 P: 93-103.

4. Andreasen, M. H., et C. F. Curtis.

« Optimal life stage for radiation sterilization of Anopheles males and their fitness for release ». Medical and Veterinary Entomology
Année : 2005 vol :19 (3): P: 238-44.

5. Andrew M Hammond, Tony Nolan & Andrea Crisanti Kyros Kyrou, Roberto Galizi, Nace Kranjc, Austin Burt, Andrea K Beaghton.

« A crisPr–cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged Anopheles gambiae mosquitoes », septembre.
2018.2018 Dec; Vol 36(11) P/:1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245.

6. Baldini, Francesco, Nicola Segata, Julien Pompon, Perrine Marcenac, W. Robert Shaw, Roch K. Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Elena A. Levashina, et Flaminia Catteruccia.

« Evidence of Natural Wolbachia Infections in Field Populations of Anopheles Gambiae ».
Nature Communications 2014.N 5 (juin): 3985.

7. Bargielowski, Irka, Derric Nimmo, Luke Alphey, et Jacob C. Koella.

« Comparison of Life History Characteristics of the Genetically Modified OX513A 8. Line and a Wild Type Strain of Aedes Aegypti ». PLOS ONE 2011 6 (6): e20699.

8 Bhatt, S., D. J. Weiss, E. Cameron, D. Bisanzio, B. Mappin, U. Dalrymple, K. E. Battle, et al.

« The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015 ». Nature N: 526 (7572): P: 207-11.

9. Bian, Guowu, Deepak Joshi, Yuemei Dong, Peng Lu, Guoli Zhou, Xiaoling Pan, Yao Xu, George Dimopoulos, et Zhiyong Xi.

« Wolbachia Invades Anopheles Stephensi Populations and Induces Refractoriness to Plasmodium Infection ». 2013

Science Actions [Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search](#) 2013 May 10; 340 (6133):748-51. doi: 10.1126/science.1236192.

10. Blandin, Stephanie, Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, et Elena A. Levashina.

« Complement-Like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector Anopheles Gambiae ». 2004.

10. Boyer, S.

« [Sterile insect technique: targeted control without insecticide] ». Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial **Année 2012** N72 Spec No (mars): P : 60-62.

12. Brelsfoard, Corey L., William St Clair, et Stephen L. Dobson.

. « Integration of Irradiation with Cytoplasmic Incompatibility to Facilitate a Lymphatic Filariasis Vector Elimination Approach ».

Parasites & Vectors 2009; 2 (1): P: 38.

13. Buchman Anna, Gamez Stephanie, Li Ming, Antoshechkin Igor, Li HsingHan, Wang Hsin-Wei, Chen Chun-Hong, et al.

« Engineered resistance to Zika virus in transgenic *Aedes Aegypti* expressing a polycistronic cluster of synthetic small RNAs ». Proceedings of the National Academy of Sciences 2019. 116 (9): P: 3656-61.

14. Burt, Austin. 2003. « Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations ». Proceedings of the Royal Society of London. Series B:

Biological Sciences « Heritable strategies for controlling insect vectors of disease ». Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society.

Année 2014 vol: 270 (1518): P: 921-28.

15. Burt, Austin, et Andrea Crisanti.

« Gene Drive: Evolved and Synthetic ».

ACS Chemical Biology 2018 13 (2): 343-46.

16. Calvitti, Maurizio, Riccardo Moretti, Elena Lampazzi, Romeo Bellini, et Stephen L. Dobson. « Characterization of a New *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Symbiotic Association Generated by Artificial Transfer of the wPip Strain From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) ». Journal of Medical Entomology 2010. 47 (2): 179-87.

17. Caragata, Eric P., Heverton L. C. Dutra, et Luciano A.

Moreira.. « Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito Transmitted Disease with *Wolbachia* ».

Trends in Parasitology 2016 N 32 (3): P: 207-18.

18. Carballar-Lejarazú, Rebeca, Thai Binh Pham, Vanessa Bottino-Rojas, Adriana Adolphi, et Anthony A. James.

« Small-Cage Laboratory Trials of Genetically-Engineered Anopheline Mosquitoes ». JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2021 N 171 (mai): e62588.

19. Carnevale, Pierre, et Vincent Robert. « Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle ».

20. **Carvalho, Danilo O., Andrew R. McKemey, Luiza Garziera, Renaud Lacroix, Christl A. Donnelly, Luke Alphey, Aldo Malavasi, et Margareth L. Capurro.** « Suppression of a Field Population of *Aedes Aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes ».

PLOS Neglected Tropical Diseases 20159 (7): e0003864.

21. **Catteruccia, Flaminia, Tony Nolan, Thanasis G. Loukeris, Claudia Blass, Charalambos Savakis, Fotis C. Kafatos, et Andrea Crisanti.**

«Stable Germline Transformation of the Malaria Mosquito *Anopheles Stephensi* ».

2000. Nature 405 vol: (6789): P: 959-62.

22. **Chen Chun-Hong, Huang Haixia, Ward Catherine M., Su Jessica T., Schaeffer Lorian V., Guo Ming, et Hay Bruce A.**

. « A Synthetic Maternal-Effect Selfish Genetic Element Drives Population Replacement in *Drosophila* ».

Science 2007 vol: 316 (5824): P: 597-600.

23. **Chen, Lin, Changliang Zhu, et Donghui Zhang.**

« Naturally Occurring Incompatibilities between Different *Culex Pipiens Pallens* Populations as the Basis of Potential Mosquito Control Measures ». PLOS Neglected Tropical Diseases 2013. 7 (1): e2030.

24. **Christophides, George K., Dina Vlachou, et Fotis C. Kafatos.**

« Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae* ».

Immunological Reviews 2004. Vol: 198 (1): P: 127-48.

25. **Corby-Harris, Vanessa, Anna Drexler, Laurel Watkins de Jong, Yevgeniya Antonova, Nazzy Pakpour, Rolf Ziegler, Frank Ramberg, et al.** «

Activation of Akt Signaling Reduces the Prevalence and Intensity of Malaria Parasite Infection and Lifespan in *Anopheles stephensi* Mosquitoes ».

PLoS Pathogens 2010. Vol: 6 (7): e1001003.

26. **Crompton, Peter D., Susan K. Pierce, et Louis H. Miller.**

. « Advances and Challenges in Malaria Vaccine Development ». The Journal of Clinical Investigation 2010 vol: 120 (12): P: 4168-78.

27. Curtis, C. F. 1968.

« Possible Use of Translocations to Fix Desirable Genes in Insect Pest Populations ». Nature

Curtis, C. F., et P. M. Graves. « Methods for replacement of malaria vector populations. » J Trop Med Hyg 91.

1988. vol: 218 (5139): P: 368-69.

28. Deredec, Anne, H. Charles J. Godfray, et Austin Burt..

« Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes ».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011 vol: 108 (43): P: E874-80.

29. Ekechukwu, Nkiru E, Rowida Baeshen, Sékou F Traorè, Mamadou

Coulibaly, Abdoulaye Diabate, Flaminia Catteruccia, et Frédéric Tripet. «

Heterosis Increases Fertility, Fecundity, and Survival of Laboratory-Produced

F1 Hybrid Males of the Malaria Mosquito *Anopheles coluzzii* ». G3

Genes|Genomes|Genetics 2015. Vol: 5 (12): P: 2693-2709.

30. Facchinelli, Luca, Laura Valerio, Rosemary S Lees, Clelia F Oliva, Tania Persampieri, C Matilda Collins, Andrea Crisanti, Roberta Spaccapelo, et Mark Q Benedict.

« Stimulating *Anopheles gambiae* swarms in the laboratory: application for behavioural and fitness studies ».

2015. Malaria Journal 14 (juillet): 271.

31. Feachem, Richard G. A., Ingrid Chen, Omar Akbari, Amelia Bertozzi-Villa, Samir Bhatt, Fred Binka, Maciej F. Boni, et al.

. « Malaria Eradication within a Generation: Ambitious, Achievable, and Necessary ».

The Lancet 2019 394 (10203): 1056-1112.

32. Flores, Heather A., et Scott L. O'Neill.

2018a. « Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes ».

Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group.

33. Flores, Heather A., et Scott L. O'Neill.

« Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes ». Nature Reviews Microbiology 2018b vol: 16 (8):P: 508-18.

34. Franz, Alexander W. E., Irma Sanchez-Vargas, Zach N. Adelman, Carol D. Blair, Barry J. Beaty, Anthony A. James, et Ken E. Olson.

« Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes Aegypti* ». Proceedings of the National Academy of Sciences 2006. Vol: 103 (11): P: 4198-4203.

35. Fu, Guoliang, Rosemary S. Lees, Derric Nimmo, Diane Aw, Li Jin, Pam Gray, Thomas U. Berendonk, et al.

« Female-specific flightless phenotype for mosquito control ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010 vol: 107 (10): P: 4550-54.

36. Galizi, Roberto, Lindsey A. Doyle, Miriam Menichelli, Federica Bernardini, Anne Deredec, Austin Burt, Barry L. Stoddard, Nikolai Windbichler, et Andrea Crisanti.

« A Synthetic Sex Ratio Distortion System for the Control of the Human Malaria Mosquito ». Nature Communications 2014. 5 (1): P: 3977.

37. Gantz, Valentino M., et Ethan Bier.

« The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations ». Science 2015. Vol: 348 (6233): P: 442-44.

38. Grossman, G. L., C. S. Rafferty, J. R. Clayton, T. K. Stevens, O. Mukabayire, et M. Q. Benedict.

« Germline Transformation of the Malaria Vector, *Anopheles Gambiae*, with the PiggyBac Transposable Element ». Insect Molecular Biology 2001. Vol: 10 (6): P: 597-604.

39. Hammond, Andrew, Roberto Galizi, Kyros Kyrou, Alekos Simoni, Carla Siniscalchi, Dimitris Katsanos, Matthew Gribble, et al

« A CRISPR-Cas9

Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito vector *Anopheles gambiae* ». *Nature biotechnology*.

2016. vol :34 (1): P:78-83.

40. Hargreaves, K., B. D. Brooke, M. Coetzee, et L. L. Koekemoer.

« Pyrethroid resistance in a major African malaria vector *Anopheles arabiensis* from Mamfene , northern KwaZulu-Natal ,

South Africa », no April: 2009. P: 127-31.

41. Harris, Angela F, Andrew R McKemey, Derric Nimmo, Zoe Curtis, Isaac Black, Siân A Morgan, Marco Neira Oviedo, et al.

« Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes ».

Nature Biotechnology 2012. Vol: 30 (9): P: 828-30.

42. Hoffmann, A. A., B. L. Montgomery, J. Popovici, I. Iturbe-Ormaetxe, P. H. Johnson, F. Muzzi, M. Greenfield, et al.

« Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission ». *Nature*. 2011. Vol: 476 (7361): P: 454-59.

43. Ickowicz, Adrien, Scott D. Foster, Geoffrey R. Hosack, et Keith R. Hayes.

« Predicting the spread and persistence of genetically modified dominant sterile male mosquitoes ».

Parasites and Vectors 2021. Vol: 14 (1): P: 1-14.

44. James, A. A., B. T. Beerntsen, M. de L. Capurro, C. J. Coates, J. Coleman, N. Jasinskiene, et A. U. Krettli.

« Controlling Malaria Transmission with Genetically-Engineered, Plasmodium-Resistant Mosquitoes: Milestones in a Model System ».

Parassitologia 1999. Vol : 41 (1-3): P: 461-71.

45. Kamareddine, Layla.

« The Biological Control of the Malaria Vector ». *Toxins* 2012. Vol: 4 (9): P: 748-67.

46. Kandul, Nikolay P., Junru Liu, Hector M. Sanchez C, Sean L. Wu, John M. Marshall, et Omar S. Akbariut.

« Transforming Insect Population Control with Precision Guided Sterile Males ». 2018. bioRxiv.

47. Kim, Won, Hyeyoung Koo, Adam M. Richman, Douglas Seeley, Jacopo Vizioli, Andrew D. Klocko, et David A. O'Brochta.

« Ectopic Expression of a Cecropin Transgene in the Human Malaria Vector Mosquito *Anopheles Gambiae* (Diptera: Culicidae): Effects on Susceptibility to *Plasmodium*. »

Journal of Medical Entomology 2004. Vol: 41 (3): P: 447-55.

48. Kittayapong, Pattamaporn, Nuanla-ong Kaeothaisong, Suwannapa Ninphanomchai, et Wanitch Limohpasmanee.

Sterile insect technique and incompatible insect technique: sex separation and quality of sterile *Aedes Aegypti* male mosquitoes released in a pilot population suppression trial in Thailand ».

Parasites & Vectors 2018. Vol: 11 (2): P: 657.

49. Klein, T. A., N. Windbichler, A. Deredec, A. Burt, et M. Q. Benedict. «

Infertility resulting from transgenic I-PpoI male *Anopheles gambiae* in large cage trials ».

Pathogens and Global Health 2012. Vol: 106 (1):P: 20-31.

50. Kouyaté Bocar, Ali Sie, Maurice Yé, Manuela De Allegri, et Olaf Müller.

« The Great Failure of Malaria Control in Africa : A District Perspective from Burkina Faso » 2007. Vol: 4 (6): P: 997-1000.

51. Kyrou, Kyros, Andrew M. Hammond, Roberto Galizi, Nace Kranjc, Austin Burt, Andrea K. Beaghton, Tony Nolan, et Andrea Crisanti.

« A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes ».

Nature Biotechnology 2018. Vol: 36 (11): P: 1062-71.

<https://doi.org/10.1038/nbt.4245>. « Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale : place et limite de la lutte antivectorielle- fdi:35329- Horizon ». s. d. Consulté le 6 juin 2022.

52. Lees, Rosemary Susan, Jeremie RL Gilles, Jorge Hendrichs, Marc JB Vreysen, et Kostas Bourtzis

« Back to the Future: The Sterile Insect Technique against Mosquito Disease Vectors ». Current Opinion in Insect Science, Social Insects * Vectors and Medical and Veterinary Entomology, 2015. Vol: 10 (août): P: 156-62.

53. Maïga, Hamidou, David Damiens, Abdoulaye Niang, Simon P. Sawadogo, mnia Fatherhaman, Rosemary S. Lees, Olivier Roux, et al.

« Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzii* in large cages ». Malaria Journal 2014 P: 13 (1)

54. Marinotti, Osvaldo, Nijole Jasinskiene, Aniko Fazekas, Sarah Scaife, Guoliang Fu, Stefanie T. Mattingly, Karissa Chow, David M. Brown, Luke Alphey, et Anthony A. James.

« Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi* ». Malaria Journal 2013. Vol:12 (1): P:1-10.

55. McArthur, Clare C, Janet M. Meredith, et Paul Eggleston.

« Transgenic *Anopheles gambiae* expressing an Antimalarial Peptide Suffer No Significant Fitness Cost ».

PLOS ONE 2014. Vol: 9 (2): P: e88625.

56. Moreira, Luciano A., Iñaki Iturbe-Ormaetxe, Jason A. Jeffery, Guangjin Lu, Alyssa T. Pyke, Lauren M. Hedges, Bruno C. Rocha, et al. « A Wolbachia Symbiont in *Aedes Aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium ». Cell 2009. Vol: 139 (7): P: 1268-78.

57. Munhenga, Givemore, Basil D. Brooke, Jeremie R. L. Gilles, Kobus Slabbert, Alan Kemp, Leonard C. Dandolo, Oliver R. Wood, et al. Mating competitiveness of sterile genetic sexing strain males (GAMA) under laboratory and semi-field conditions: Steps towards the use of the Sterile Insect Technique to control the major malaria vector *Anopheles arabiensis* in South Africa ». Parasites and Vectors 2016. Vol: 9 (1).

58. Niang, El Hadji Amadou, Hubert Bassene, Patrick Makoundou, Florence Fenollar, Mylène Weill, et Oleg Mediannikov. «First report of natural Wolbachia infection in wild *Anopheles funestus* population in Senegal ». Malaria Journal 2018. 17 (1): 408.

59. Nolan, Tony, Philippos Papathanos, Nikolai Windbichler, Kalle Magnusson, Jason Benton, Flaminia Catteruccia, et Andrea Crisanti. « Developing Transgenic *Anopheles* Mosquitoes for the Sterile Insect Technique ». Genetica 2011. Vol: 139 (1): P: 33-39. OMS 2020,

60. Perera, O. P., R. A. Harrell II, et A. M. Handler. « Germ-Line Transformation of the South American Malaria Vector, *Albimanus*, with a PiggyBac/EGFP Transposon Vector Is Routine and Highly Efficient ». Insect Molecular Biology 2002 vol : 11 (4): 291-97.

61. Phuc, Hoang, Morten H. Andreassen, Rosemary S. Burton, Céline Vass, Matthew J. Epton, Gavin Pape, Guoliang Fu, et al.

« Lateacting dominant lethal genetic systems and mosquito control ». *BMC Biology* 2007. Vol: 5 (1): P: 1-11

62. Rabinovich, Regina N., Chris Drakeley, Abdoulaye A. Djimde, B. Fenton Hall, Simon I. Hay, Janet Hemingway, David C. Kaslow, et al

« MalERA: An Updated Research Agenda for Malaria Elimination and Eradication ». *PLOS Médecine*. 2017 vol : 14 (11):P : e1002456.

63. Ricci, I., C. Damiani, P. Rossi, A. Capone, P. Scuppa, A. Cappelli, U. Ulissi, et al.

« Mosquito symbioses: from basic research to the paratransgenic control of mosquito-borne diseases ».

Journal of Applied Entomology 2011. Vol : 135 (7): 487-93.

64. Rosenberg, R., et J. Rungsiwongse.

« The Number of Sporozoites Produced by Individual Malaria Oocysts. » *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991. Vol: 45 (5): P: 574-77.

65. Scavarda, N. J., et D. L. Hartl.

« Interspecific DNA Transformation in *Drosophila* ».

Proceedings of the National Academy of Sciences 1984. vol 81 (23): 7515-19.

66. D. O. Carvalho *et al.*,

« Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes », *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2015 vol. 9, n° 7,

67. T. Nolan, E. Petris, H. M. Müller, A. Cronin, F. Catteruccia, et A.

Crisanti, « Analysis of two novel midgut-specific promoters driving transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquitoes »,

PLoS One, 2011. vol. 6, n° 2,

68. Hoffmann. A. A *et al.*,

« Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission », *Nature*, août 2011 vol. 476, n° 7361, P: 454-459, , doi: 10.1038/nature10356.

69. Isaacs. A. T. *et al.*,

« Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, juill. 2012 vol. 109, n° 28,

70. Z. Adelman *et al.*,

« Rules of the road for insect gene drive research and testing », *Nature Biotechnology*, 2017. vol. 35, n° 8. Nature Publishing Group, P : 716-718, août 08, Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde (oms, 2020).

71. J. L. Rasgon et T. W. Scott,

« Impact of population age structure on *Wolbachia* transgene driver efficacy: Ecologically complex factors and release of genetically modified mosquitoes », in *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, juill. 2004, vol. 34, n° 7, P: 707-713

72. A. Hammond *et al.*,

« A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* », *Nat. Biotechnol.*, janv. 2016. vol. 34, n° 1, P : 78-83,

73. Windbichler, N., Papathanos, P. A. & Crisanti, A.

Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae* (Ciblage du chromosome X au cours de la spermatogénèse entraînant une distorsion du ratio de transmission du chromosome Y et une mortalité précoce de l'embryon dominant chez l'*Anopheles gambiae*). *PLoS Genetics*, 2008. Vol : 4(12), P : e1000291.

74. Wilkins EE, Howell PI, Benedict MQ

IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, *Mopti* and *Savannah* rDNA types and resistance to dieltrin in *Anopheles arabiensis* [Les amorces de PCR IMP détectent des polymorphismes nucléotidiques uniques pour l'identification des espèces d'*Anopheles gambiae*, les types de rDNA *Mopti* et *Savannah* et la résistance à la dieldrine chez *Anopheles arabiensis*]. *Malaria* (2006) J 5: P: 125

75. R Core Team

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria OMS (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.

ISBN 978 92 4 151157 5 Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2016.

Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde (oms, 2021)

76. Klein, T. A., Windbichler, N., Deredec, A., Burt, A., & Benedict, M. Q.

Infertility resulting from transgenic I-PpoI male *Anopheles gambiae* in large cage trials. *Pathogens and Global Health*, (2012). 106 (1), 20–31.

77. Windbichler, N., Papathanos, P. A., & Crisanti, A.

Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoSGenetics*, (2008). Vol: 4 (12), P: e1000291.

78. Chambers GM, Klowden MJ

Age of *Anopheles gambiae* Giles male mosquitoes at time of mating influences female oviposition.

J Vector Ecol 2001 26:196–201.

79. Klowden MJ, Russell RC

Mating affects egg maturation in *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 2004. 29:135–139.

80. Okal et al. Malar J

Analysing the oviposition behaviour of malaria mosquitoes: design considerations for improving two-choice egg count experiments.

2015 vol: 14: P:250

81. Windbichler, N., Papathanos, P. A. & Crisanti, A

Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae* (Ciblage du chromosome X au cours de la spermatogénèse entraînant une distorsion du ratio de transmission du chromosome Y et une mortalité précoce de l'embryon dominant chez l'*Anopheles gambiae*). PLoS Genetics, (2008). Vol 4 (12) P : 45-62

82. Wilkins EE, Howell PI, Benedict MQ

IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, *Mopti* and *Savannah* rDNA types and resistance to dieltrin in *Anopheles arabiensis* [Les amorces de PCR IMP détectent des polymorphismes nucléotidiques uniques pour l'identification des espèces d'*Anopheles gambiae*, les types de rDNA *Mopti* et *Savannah* et la résistance à la dieltrine chez *Anopheles arabiensis*]. Malaria 200. J vol : N 5: P : 125

83. H. A. L. Id,

« Développement de méthodes innovantes de sexage pour l'application de la Technique de l' Insecte Stérile chez les moustiques du genre *Aedes* Célia Lutrat
To cite this version : HAL Id : tel-03615702 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER Développement de métho », 2022.

84. N. L. Ntoyi et al.,

« Life-history traits of a fluorescent *Anopheles arabiensis* genetic sexing strain introgressed into South African genomic background », *Malar. J.*, vol. 21, n° 1, P : 1-12, 2022. Rapport 2022 sur le paludisme dans le monde (2022); Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde (oms, 2021)

85. Dama.Sylla et al.

Comportement trophique d'*Anopheles gambiae* et d'autres espèces de moustiques pour différents hôtes
Sélingue, Mali, 2015m83 (thèse de médecine)

ANNEXES

9. Annexes

9.1. Protocole de maintien de la colonie de moustique mâle stérile

Le maintien de la souche mâle stérile génétiquement modifié se fait en développement synchrone avec la colonie locale (wild-type) par rétrocroisement augmentant ainsi les chances d'accouplement réussi et la transmission du transgène présent dans les souches Ac(DSM)2.

Au stade 3 et ou 4, les larves transgéniques sont triées. Pour cela, les larves sont étalées individuellement dans des puits (8puits) sur une lame de microscope (ER-201B-CE24 6mm), en utilisant le moins d'eau possible. Elles sont observées sous la loupe à fluorescence en déterminant la présence où l'absence du marqueur DsRed au niveau des yeux. A l'aide d'une pipette en plastique, les larves portant le marqueur DsRed positifs (larves ayant la fluorescence rouge au niveau des yeux) sont triées des DsRed négatives (larves n'ayant pas de fluorescence rouge). Elles sont ensuite regroupées en fonction de leur statut modifiées ou non modifiées. A l'apparition des nymphes, elles sont collectées, puis triées par sexe sous une loupe binoculaire. Elles sont ensuite transférées par lot dans une boîte de Pétri contenant une petite quantité d'eau. Un pinceau à bout fin servira à faire bouger délicatement chaque nymphe pour regarder la partie terminale de l'abdomen afin d'identifier le sexe. Pour l'établissement de la cage de maintenance, les nymphes femelles sont croisées avec les nymphes mâles de la colonie locale (wild type).

9.2. Processus du gorgement des cages pour la détermination de la stérilité sexuelle des mâles Ac(DSM)2

Après émergence des adultes, à l'aide d'un appareil de gorgement de type « Hemotek Membrane Feeding System » (Hemotek Ltd), les moustiques âgés d'au moins trois jours sont gorgés. L'appareil d'alimentation est

composé de six plaques (6) d'aluminium à laquelle une membrane de collagène (Parafilm) est fixée et remplie de sang maintenu chaud par un élément chauffant électrique. Les moustiques sont au préalable mis à jeun pendant quatre (4-8) heures et gorgé durant 30-60 minutes. A la fin du gorgement, les disques du feeder contenant le sang sont retirés, nettoyés et lavés à l'eau de robinet. Les disques sont ensuite trempés dans une solution d'eau javellisée à 1% pendant 30 minutes afin d'être désinfecté. Afin d'enlever les résidus de chlore, les disques sont lavés une seconde fois à l'eau de robinet et gardés pour une prochaine utilisation.

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : TOURE

Prénom : DJIGUIBA

Numero de telephone: 00223 66270679

E-mail: 126toure@gmail.com

Titre de la thèse : Introgression, avidité au gorgement et statut de résistance aux insecticides d'une souche de moustique génétiquement modifiée d'*An. Coluzzii* en milieu confiné

Année universitaire : 2022-2023

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la FMOS/FAPH

Secteur d'intérêt : Entomologie Médicale

Résumé

Le paludisme tue chaque année des milliers de personnes. Les moyens actuels de lutte contre cette maladie ont permis de sauver des millions de vie mais sont limités. Toutes fois les moyens actuels ont montré leurs limites d'où la nécessité de mettre en œuvre de nouveaux moyens rentable et durable pour renforcer les stratégies d'élimination du paludisme.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le niveau d'introgression, l'avidité au gorgement et statut de résistance aux insecticides d'une souche mâle stérile Ac(DSM)2 au laboratoire au Mali.

Le transfert du gène de la souche de moustiques génétiquement modifiés dans la colonie locale d'*An. Coluzzii* a été effectuée.

Les femelles modifiées ont une avidité pour le repas sanguin comparable à celle des femelles non modifiées. Les moustiques génétiquement modifiés sont aussi sensibles aux insecticides que les moustiques sauvages. Il est important de mener ces expériences sur d'autres espèces de moustiques.

Mots clés : Moustique génétiquement modifié, Introgression, avidité au gorgement et statut de résistance

INSTRUCTIONS

Surname: TOURE

Name: DJIGUIBA

Phone number: 00223 66 27 06 79 **E-mail address:** 126toure@gmail.com

Thesis title: Introgression, gorging avidity and insecticide resistance status of a genetically modified mosquito strain of *An. Coluzzii* in a confined environment

Academic year: 2022-2023

City: Bamako

Origin country: Mali

Place of deposit: FMOS/FAPH library

Area of interest: Medical Entomology

Abstract

Malaria is responsible for the death of thousands of people every year. The current means to control this disease have permitted to avoid millions of lives but are limited. However, the current means have shown their limits, hence the need to implement new cost-effective and sustainable means to strengthen malaria elimination strategies.

The object of this study was to evaluate the level of introgression, gorging avidity and insecticide resistance statue of a male sterile Ac(DSM)2 strain in the laboratory in Mali. Gene transfer from the genetically modified mosquito strain to the local colony of *An. Coluzzii* was carried out.

The modified females had a blood-meal avidity comparable to that of unmodified females. Genetically modified mosquitoes are as sensitive to insecticides as wild mosquitoes. It is important to carry out these experiments on other mosquito species.

Keywords: Genetically modified mosquito, introgression, avidity, insecticide resistance statue

LIMITES DE L'ETUDE

Au cours de notre étude, nous avons rencontré des limites

- Un nombre limité d'échantillons à géotyper lors de l'introgession
- Un nombre limité de réplias pour les tests réalisés
- La non-réalisation des tests plusieurs fois sur l'avidité, sur le statut de la résistance aux insecticides

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure