

**REPUBLIQUE DU MALI**

**UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI**



**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO  
FACULTE DE PHARMACIE**

**Année universitaire 2021 - 2022**

**Thèse N° .....**

**THESE**

**Stérilité, Compétitivité pour l'accouplement et Longévité  
d'une souche mâle stérile de *An. coluzzii* génétiquement  
modifiée au Mali**

Présentée et soutenue publiquement le 04/06/2022

Devant la Faculté de Pharmacie

Par

**M. Yahaya KEITA**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

**Jury**

**Président : Professeur Sékou Fantamady TRAORE**

**Membres : Professeur Alpha Seydou YARO**

**Docteur Cheick Amadou COULIBALY**

**Co-Directeur : Docteur Mamadou B. COULIBALY**

**Directeur : Professeur Mahamadou DIAKITE**

*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**

Je dédie ce modeste travail à Allah, le tout miséricordieux, le très miséricordieux. Toutes les louanges sont à Allah, seigneur de l'univers, celui qui existe sans début sans fin sans endroit et ne dépend pas du temps. Rien n'est telle que Lui, à Lui la royauté, à Lui la louange, et Il est capable de toutes choses. Louanges à Allah qui me donne la force d'avancer. Que les prières et bénédictions d'Allah soient sur son esclave et serviteur le prophète Muhammad, sa famille ainsi que l'ensemble des personnes qui suivent son chemin.



# REMERCIEMENTS

### **A mon père : Mamadou Keita**

Nous remercions le bon Dieu de t'avoir comme père. Depuis tout petit tu nous as inculqué l'importance des études. Tu nous as toujours soutenu pour la réalisation de nos entreprises. Tu nous as appris l'honnêteté, la droiture, la persévérance, la patience ... on ne s'aurait te remercié pour tous ce que tu as fait pour nous. Qu'Allah te bénisse et te préserve.

### **A mes mamans : Mariam Konaté et Fanta Tounkara**

Vous êtes des infatigables mamans, des mères exemplaires. A travers vos nombreux conseils prodigués, vos prières élevées vers les cieux, ... Grâce à Dieu, l'une de vos invocations s'est exaucée. Mamans vous nous avez toujours aimer, pardonner et aider. Les mots nous manquent pour exprimer notre amour pour vous. Qu'Allah vous bénisse et vous préserve.

### **A mes frères, sœurs, cousins, cousines, tontons, tantes et oncles**

J'ai eu la chance d'être entouré de plusieurs talents. Votre dévouement, compréhension, grande tendresse, disponibilités, soutient, conseils, amour et sens d'écoute m'ont beaucoup encouragé tout le long de ma vie. Merci d'être présent dans ma vie.

### **A ma femme Aichata Troaré et mes enfants Mariam et Kadidia**

Vous êtes la joie de ma vie. J'ai toujours lu un sourire sur vos yeux. Aicha, tu es la fleur de ma vie. Tu m'as toujours motivé, encouragé pour la réalisation de ce travail. T'avoir dans ma vie est une grâce. J'espère que Mariam et Kadidia prendrons exemples de cette thèse et ferons mieux dans les jours à venir.

### **A mon co chambrier, camarade, ami et frère : Docteur KONE Sidi Mohamed**

Les mots me manquent pour te remercier pour tous ce que tu as fait et continue de faire pour moi. Nous avons traversé beaucoup d'épreuves.

Tu as toujours répondu présent quand j'en avais besoin. Tes conseils, aides, appuis et écoutes n'ont pas fait défaut. Qu'Allah nous assiste et nous aide à avancer.

**A mes camarades de la onzième promotion du numerus et tous mes amis**

Recevez ici ma grande reconnaissance et gratitude. Qu'Allah vous assiste tous.

**A tout le personnel de l'Officine Bassan de Niarela particulièrement à docteur BAGAYOGO Mariame**

Vous m'avez appris l'amour et l'esprit de famille. Vous m'avez aidé, respecté et soutenue durant ces longues années. C'est l'occasion de vous remercier même si les mots me manquent. Qu'Allah nous assiste et nous bénisse.

**A mes encadreurs**

Lakamy SYLLA, Bréhima DIALLO, Amadou GUINDO, Sidy DOUMBIA, Bilkissou YAGOURE.

Vous m'avez aidé, assisté à chaque fois que j'exprimais le besoin. Malgré mon jeune âge, vous m'avez toujours respecté. Merci pour tous vos enseignements. Qu'Allah vous aide à avancer dans ce que vous entreprenez.

**A l'équipe de l'insectarium**

Lakamy SYLLA, Brehima DIALLO, Daouda NIARE, Boubacar TEMBALY, Aïssata SANOGO, Alaye TRAORE, Yacouba DEMBELE, Djiguiba TOURE, Abdoulaye KONE

**A l'équipe de management et de communication de TARGET MALARIA**

Bilkissou YAGOURE, Baba M'BARAKOU, Kadiatou Sanogo.

**A l'équipe d'engagement communautaire de TARGET MALARIA**

Samba I DIOP, Bakara DICKO, Souleymane KODIO, Fatoumata TRAORE, Hatouma SAMOURA.

Une thèse est le fruit de plusieurs années d'études et je ne saurais vous remercier assez. Ce travail est le nôtre.

### **A mes maîtres et collaborateurs**

Mamadou B. COULIBALY, Adama SACKO, Boubacar COULIBALY, Daman SYLLA, Boubacar TEMBELY, Mohamed DIARRA, Karim SAWADOGO, Adama Coulibaly, Aminata NIAMBELE, Amadou BERTHE, Sékou BAGAYOKO, Fatoumata DIAW, Cheick O. SANOGO, Gaoussou FOFANA, Moribo COULIBALY, Bakary O. DIARRA, Chata DOUMBIA, Daouda OULOGUEM, Mariam DOUMBIA, Moridiè SIDIBE, Diakaridia FOMBA, Bassala BAGAYOKO, Anata TRAORE, Salé SIDIBE, Sékou GOITA, Issaka SAMAKE, Toumani KONATE, Yacouba DIARRA, Makan CAMARA, Salif KONE, Aboubacar FOFANA, Djenebou DIAKITE, Fatoumata BALLO, Moussa DIALLO, Zana L SANOGO, Ousmane YOSSI, Djibril SAMAKE, Lakamy SYLLA, Bréhima DIALLO, Amadou GUINDO, Sidy DOUMBIA, Bilkissou YAGOURE, Daouda NIARE, Cheick O CAMARA, Nafomon SOGOBA, Mamadou DIAKITE, Souleymane KAREMBE, Yaya COULIBALY, Amadou KONE, Modibo KAMIAN, Fatoumata O MAIGA, Abdourahmane TRAORE, Amadou Sékou TRAORE, Mohamed M TRAORE, Seidina A DIAKITE, Drissa S KONATE, Daouda DEMBELE, Daoud OURDE, Moussa KEITA, Adama DAO, Alpha Seydou YARO, Alahaye M MAIGA, Abdoulaye DAO, Dramane DANTE, Alou KEITA, Siriman SAMAKE, Bintou KANOUTE, Alassane dit Assitoun.

### **A mes camarades internes**

Wesley Jefferson Maurice KONGBO GBASSINGA, Djiguiba TOURE.

### **A tous les informaticiens du MRTC**

Sidy SOUMARE, Salimata TRAORE, Amadou DIALLO, Mady DIARRA, Issa BA, Aoua COULIBALY.

### **A nos garçons de salles**

Samba MORO, Alhassane KANE.

### **Au bureau de sécurité**

Bakary A COULIBALY, Aïssata B MAIGA et l'ensemble des agents de sécurité.



**HOMMAGE AUX  
MEMBRES DU JURY**



## **A notre Maître et président du jury**

### **Professeur Sékou Fantamady TRAORE,**

- **PhD en entomologie médicale, ancien enseignant de la biologie cellulaire à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et la Faculté de Pharmacie (FMOS-FAPH).**
- **Ancien Directeur du département entomologie du Centre de recherche et de formation sur le paludisme MRTC (*Malaria Research and Training Centre*).**

Trouvez ici cher Maître le témoignage de notre profond respect.

## **A notre Maître et juge**

### **Docteur Cheick Amadou COULIBALY**

- **PhD en entomologie et parasitologie médicales.**
- **Chargé de recherche à la Faculté de Pharmacie (FAPH).**

Trouvez ici cher Maître le témoignage de notre profond respect.

## **A notre Maître et juge**

### **Professeur Alpha S YARO**

- **PhD en Entomologie- Parasitologie.**
- **Chef de DER Biologie de la Faculté des Sciences Techniques (FST) de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako Mali (USTTB).**
- **Maitre de conférences CAMES en Entomologie médicale- Ecologie-Parasitologie Microbiologie.**
- **Senior Scientiste, MRTC /FMOS-FPHA- Point G.**

Trouvez ici cher Maître le témoignage de notre profond respect.

## **A notre Maître et Co-directeur**

### **Docteur Mamadou B. COULIBALY**

- **PhD en sciences biologiques.**
- **Docteur en Pharmacie.**
- **Directeur adjoint du département d'entomologie de la MRTC.**
- **Responsable de l'unité génomique et protéomique ; de l'unité transgénique et de l'unité " Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology" /Entomologie du MRTC.**

Vous m'avez accepté dans votre unité, vous m'avez toujours prodigué des conseils fructueux qui m'ont permis non seulement d'élaborer ce modeste travail mais aussi d'apprendre beaucoup de leçons de vie.

Vous avez toujours fait la promotion de l'excellence. Nous apprenons à vos côtés à chaque fois que l'occasion se présente, la bonne manière de faire les choses en se souvenant des leçons du passé.

Veillez trouver ici, l'assurance de notre reconnaissance et notre profonde admiration.

Qu'Allah vous aide à aller de l'avant et vous facilite la réalisation de beaucoup d'entreprises et vous assiste.

## **A notre Maître et Directeur de thèse**

### **Professeur Mahamadou DIAKITE**

- **Professeur Titulaire d'Immunologie-Génétique à la FAPH.**
- **Vice-Recteur de l'Université des Sciences, des Technique et des Technologies de Bamako (USTTB).**
- **Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC).**
- **Chef de l'unité Immunogénétique et Parasitologie de l'International Centre for Excellence in Research-Mali (ICER-Mali).**
- **Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la (FMOS/FAPH).**
- **Membre du Comité National d'Ethique pour la Santé et les Sciences de la vie.**

Trouvez ici cher Maître le témoignage de notre profond respect.



# **SIGLES ET ABREVIATIONS**

**%** : Pourcentage

**°C** : Degrés centigrades

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

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

**ACL2** : Niveau de confinement 2 pour les arthropodes

**ADNr** : Acide Désoxyribonucléique ribosomique

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

*An* : *Anopheles*

**ARN** : Acide Ribonucléique.

**ARNi** : L'interférence de l'acide ribonucléique.

**C** : Taux de compétitivité

**cm** : Centimètre

**CPS** : Chimio prévention du Paludisme Saisonnier

**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)

*Cx* : *Culex*

**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 de *Anopheles gambiae s.l* pour la transformation de la lignée germinale

**GFP** : Green Fluorescence Protein (Protéine fluorescente verte, marqueur testiculaire/spermatique des mâles transgéniques)

**GY** : Gray

**h** : heures

**HEG** : Homing Endonuclease Gene (gène d'endonuclease de homing)

**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

**MMC** : moyenne des moindres carrés

**MRTC** : Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (*Malaria Research and Training Center*)

**Neg** : négatif/ive

**Oxitec** : Oxford Insect Technologies

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PID** : Pulvérisation Intra-Domiciliaire

**Pos** : Positif/ive

**RC** : Rétrocroisement

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

**SAS** : Petit vestibule

**SD** : Ecart type (*standard deviation*)

**SEM** : Erreur-type de la moyenne

**SIT** : Technique de l'insecte stérile

**SOP** : Procédure opérationnelle normalisée

**TE** : Eléments transposables

**TL 50** : Temps léthal 50 % en jours

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





# **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

## **Liste des figures**

Figure 1: Genes d'Endonuclease de Homing. Source.....	11
Figure 2 : Laboratoire d'étude .....	23
Figure 3 : Laboratoire transgenique de target malaria .....	25
Figure 4 : Larve non modifiée (1) et larve modifiée (2).....	27
Figure 5 : Nymphe femelle (1) et nymphe mâle (2).....	28
Figure 6 : Nombre d'œufs et taux d'éclosion observes .....	38
Figure 7 : Courbes de survie de kaplan-meier pour les mâles et les femelles positifs et negatifs .....	41

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Types et répliques des croisements effectués pour la détermination de la longévité de moustiques modifiés et non modifiés .....	34
Tableau 2 : Synthèse de la dissection, évaluation du statut d'accouplement et l'indice « C » de compétitivité .....	39
Tableau 3 : Récapitulatif des durées de vie moyennes et des TL50 calculés à partir des analyses de survie de Kaplan-Meier .....	40



# TABLE DES MATIERES

## Table des matières

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. 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.....	15
3.2.1. Paludisme- <i>Anopheles</i> .....	15
3.2.1.1. Situation au Monde .....	15
3.2.1.2. En Afrique.....	16
3.2.2. Dengue, Fièvre jaune, Zika – <i>Aedes spp</i> .....	18
3.3. Autres stratégies de lutte génétique.....	18
3.3.1. Technique de l'insecte stérile par irradiation (SIT) – Principes, applications et quelques exemples .....	18
3.3.2. Technique des insectes incompatibles (IIT) - Principes et quelques exemples .....	19
3.3.3. IIT et SIT combinées : Principes et quelques exemples .....	20
4. Matériel et méthodes.....	23

4.1. Site d'étude .....	23
4.2. Période et type d'étude.....	25
4.3. Déroulement des expériences.....	25
4.3.1. Détermination de la stérilité sexuelle des mâles Ac(DSM)2 .....	27
4.3.1.1. Tri des larves .....	27
4.3.1.2. Tri des nymphes.....	28
4.3.1.3. Etablissement des cages d'expériences pour la détermination de la stérilité.....	29
4.3.1.4. Retrait et lavage des œufs .....	30
4.3.1.5. Détermination du taux d'éclosion.....	30
4.3.2. Détermination de la compétitivité pour l'accouplement des mâles Ac(DSM)2.....	30
4.3.2.1. Tri des larves .....	31
4.3.2.2. Tri des nymphes.....	31
4.3.2.3. Emergences des adultes .....	31
4.3.2.4. Détermination de la compétitivité pour l'accouplement des mâles Ac(DSM)2 .....	31
4.3.3. Détermination de la longévité des moustiques génétiquement modifiés Ac(DSM)2 .....	32
4.3.3.1. Tri des larves .....	32
4.3.3.2. Tri des nymphes.....	33
4.3.3.3. Emergence des adultes.....	33
4.3.3.4. Détermination de la longévité.....	33
4.4. Saisie et analyse des données .....	35
4.4.1. Stérilité .....	35
4.4.2. Compétitivité .....	35
4.4.3. Longévité .....	36

5. Résultats.....	38
5.1. Stérilité .....	38
5.2. Compétitivité .....	38
5.3. Longévité.....	39
6. Commentaires et discussion .....	43
6.1. Stérilité .....	43
6.2. Compétitivité pour l'accouplement .....	43
6.3 Longévité.....	45
7. Conclusion et recommandations.....	48
7.1. Conclusion .....	48
7.2. Recommandations .....	48
8. Bibliographie .....	50
9. Annexe .....	64
9.1. Maintien de la colonie de moustique mâle stérile génétiquement modifié .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
9.2. Processus du gorgement des cages pour la détermination de la stérilité sexuelle des mâles Ac(DSM)2 .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>



# **INTRODUCTION**

## **1. Introduction**

Les moustiques sont responsables de plusieurs maladies comme la filariose lymphatique, la dengue, le chikungunya, le zika et le paludisme (la liste n'est pas exhaustive). En 2020, il y a eu 241 millions de cas de paludisme avec 627 000 décès (OMS, 2021).

La lutte contre le paludisme comprend : la lutte contre le parasite visant à éliminer l'agent pathogène par l'utilisation des médicaments antipaludiques par chimiothérapie ou chimioprophylaxie saisonnière 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. La lutte chimique repose sur l'utilisation d'insecticides à travers la pulvérisation intradomiciliaire (PID), des moustiquaires imprégnées d'insecticides à long durée d'action (MILD), des répulsif, 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).

Environ 1,7 milliard de cas et 10,6 millions de décès ont été évités entre 2000 et 2020 à travers les campagnes de luttés telles que les MILD, PID, CPS (OMS, 2021).

Les stratégies de lutte anti-vectorielle basées sur les insecticides sont continuellement menacées par la résistance développée chez les vecteurs (Hargreaves et al. 2009; Kouyaté et al. 2007), les moustiquaires imprégnées d'insecticides sont plus efficaces à l'intérieur des chambres alors que les vecteurs piquent aussi en dehors des chambres. 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).



L'actuel Directeur de l'OMS, Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus dans un propos tenu en novembre 2017 disait : « 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.

Au Mali, la souche de moustiques génétiquement modifié mâles stériles Ac(DSM)2 a été introduite au laboratoire pour des fins de recherche. Dans l'hypothèse de lâcher d'une souche de moustiques mâles stériles génétiquement modifié Ac(DSM)2 dans la nature, il est important de connaître certains paramètres : 1] voir si la stérilité sexuelle attendue chez les DSM mâles transgéniques est belle et bien observée lorsque ces derniers sont croisés avec des femelles non transgéniques fertiles ; 2] connaître la longévité des DSM afin d'avoir une idée sur le temps que ces moustiques modifiés peuvent vivre après émergence et 3] évaluer la compétitivité sexuelle des mâles DSM qui permettra de déterminer la probabilité d'observer des accouplements avec les populations de moustiques non transgéniques dans les grandes cages de compétition en présence des mâles non transgéniques. Ces informations permettront non seulement de comprendre certains comportements de ces moustiques mais aussi d'améliorer la modification génétique afin de mieux élaborer une technologie de réduction des populations des moustiques dans le cadre de la lutte contre le paludisme.

C'est ainsi que la présente étude se propose de déterminer la stérilité, la compétitivité pour l'accouplement et la longévité de la souche de

moustiques génétiquement modifiés mâles stériles Ac(DSM)2 au laboratoire.



# OBJECTIFS

## **2. Objectifs**

### **2.1 Objectif général**

Evaluer la stérilité sexuelle des mâles, la compétitivité pour l'accouplement et la longévité d'une souche mâle stérile de *An. coluzzii* génétiquement modifiée au Mali.

### **2.2 Objectifs spécifiques**

- ✓ Déterminer la stérilité sexuelle des mâles Ac(DSM)2 lorsqu'ils sont croisés avec les femelles non modifiées fertiles ;
- ✓ Déterminer la compétitivité pour l'accouplement des mâles Ac(DSM)2 lorsqu'ils sont croisés avec les femelles non modifiées de la colonie locale ;
- ✓ Déterminer la longévité des moustiques génétiquement modifiés Ac(DSM)2 en présence des non modifiés.



# **GENERALITES**

### **3. Généralités**

#### **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 (James et al. 1999). Elle consistait à développer des outils pour la transformation de la lignée germinale stable des anophèles.

L'un des objectifs de la transformation était 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 exemple de cette méthode, on peut citer la stérilité des moustiques mâles induite par l'activation d'un gène de nucléase I-PpoI, une endonucléase de homing appelée (HEG) "Homing Endonuclease Genes" (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 silençage 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 Oxitec, "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 seuls les moustiques adultes mâles stériles compétitifs émergent.

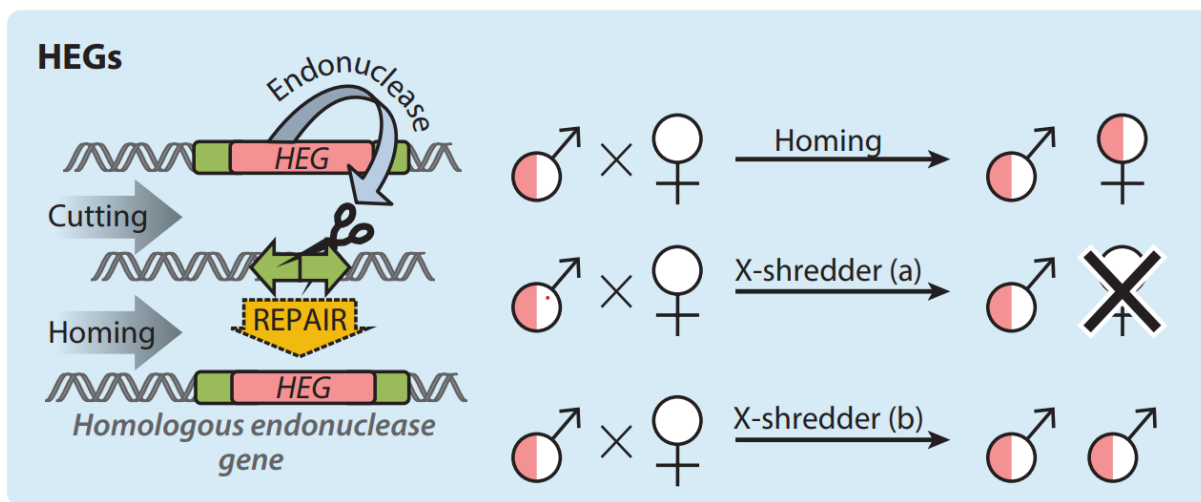


Figure 1: Gènes d'endonuclease de homing. Source (Alphey 2014)

### 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. Ce dernier 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 de *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 de *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 transgénése) de manière à rendre l'insecte incompetent vis-à-vis de l'agent infectieux.

### **3.1.3. Technologie de Gene drive – Principes, applications et quelques exemples**

La technique de "gene 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 *Anopheles* 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 *Anopheles* (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 (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- *Anopheles***

##### **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. stephensi* (Catteruccia et al. 2000) et le vecteur sud-américain du paludisme, *An. albimanus* (Perera et al. 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 cas9" (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 en Afrique (Yao et al. 2022).

### **3.2.1.2. En Afrique**

En Afrique, cette lutte est menée sous forme de recherche par un projet "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 de l'Ouganda.

Les travaux de "Target Malaria" ont débuté en 2008 avec un moustique mâle stérile *Anopheles 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'acide désoxyribonucléique ribosomique (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 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 de *Anopheles coluzzii* (Yao et al. 2022). Avant ce lâcher, plusieurs expériences avaient été menées sur la souche au laboratoire au Burkina<sup>1</sup>. Les mêmes expériences sauf le lâcher ont été menées au Mali<sup>2</sup>. 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

---

<sup>1</sup> [https://targetmalaria.org/wp-content/uploads/2021/03/Development-pathway\\_FS\\_FR\\_Re%CC%81sultats-du-la%CC%82cher-a%CC%80-petite-e%CC%81chelle-de-moustiques-ma%CC%82les-ste%CC%81riles-au-Burkina-Faso\\_Mars21.pdf](https://targetmalaria.org/wp-content/uploads/2021/03/Development-pathway_FS_FR_Re%CC%81sultats-du-la%CC%82cher-a%CC%80-petite-e%CC%81chelle-de-moustiques-ma%CC%82les-ste%CC%81riles-au-Burkina-Faso_Mars21.pdf)  
Modifié le 09052022 à 15h39

<sup>2</sup> [https://targetmalaria.org/wp-content/uploads/2021/11/Factsheet-Results-of-laboratory-studies\\_FR.pdf](https://targetmalaria.org/wp-content/uploads/2021/11/Factsheet-Results-of-laboratory-studies_FR.pdf)  
Modifié le 09052022 à 15h42

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 Oxitec (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, la fièvre jaune, le chikungunya, etc (Boyer 2012). 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 infectées 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* (Caragataet al. 2016). De plus, une population naturellement infectée de *An. funestus* et de *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).



# **MATERIEL ET METHODES**

## **4. Matériel et méthodes**

### **4.1. Site d'étude**

L'étude s'est déroulée à l'insectarium du laboratoire de transgénique du département d'entomologie médicale du 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 : Laboratoire d'étude. Source : Laboratoire transgénique du MRTC

Le laboratoire transgénique de Target Malaria au Mali est un laboratoire de confinement d'arthropode de niveau de sécurité 2 (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 les portes s'ouvrent, 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 ( $80\% \pm 10$ ) (figure 3).

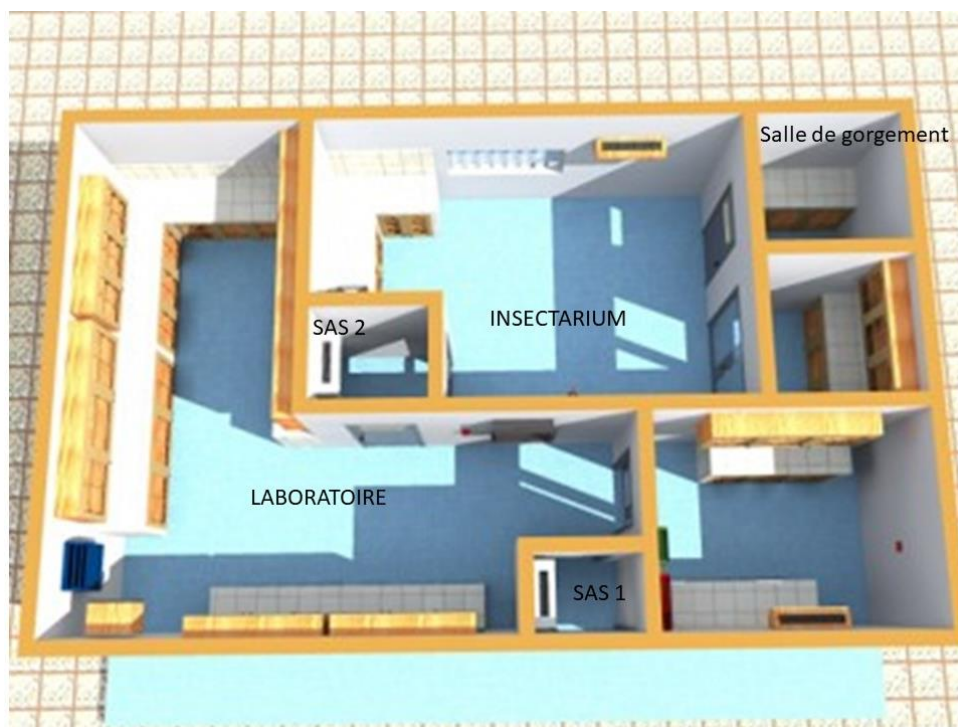


Figure 3 : Plan du laboratoire. Source (Laboratoire transgénique de Target Malaria au MRTC).

#### 4.2. Période et type 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 entomologiques 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 confèrent 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 Florescence 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 de la stérilité sexuelle des mâles Ac(DSM)2**

Pour cette étude, la stérilité est définie comme l'incapacité des œufs à éclore après leurs avoir mis en éclosion.

#### **4.3.1.1. 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 4). A 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 pour être de nouveau réexaminées.



Figure 4 : larve non modifiée (1) et larve modifiée (2).  
Source (Laboratoire transgénique du MRTC).

## **Réexamen des larves**

Les larves triées ont été réexaminées à la loupe à fluorescence par une seconde personne afin d'éviter toute erreur de tri possible, puis elles ont été transférées dans les plateaux à l'insectarium afin d'avoir des plateaux positifs et négatifs distincts avant le tri des nymphes.

### **4.3.1.2. Tri des nymphes**

#### **Séparation des nymphes mâles des femelles**

A 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 5).

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



Figure 5 : nymphe femelle (1) et nymphe mâle (2)

Source (Laboratoire transgénique de Target Malaria au MRTC)

## **Réexamen des nymphes**

Comme pour le tri des larves, les nymphes ont été réexaminées par une seconde personne afin de s'assurer qu'aucune nymphe mâle par exemple n'était dans le lot des femelles. Elles ont ensuite été placées dans les cages pour l'émergence.

## **Emergence des nymphes**

Trois cages « Bugdorm » de 30x30x30 cm ont été établies. Dans chacune de ces cages, les pots de nymphes mâles négatifs ; femelles négatives et mâles positifs ont été introduits.

Chaque jour pendant la période d'émergence, les adultes ont été vérifiés visuellement afin de s'assurer qu'aucun mâle ou femelle n'était dans la mauvaise cage. Les pots ont été retirés 48h après émergence afin d'établir les cages d'expérience.

### **4.3.1.3. Etablissement des cages d'expériences pour la détermination de la stérilité**

Les adultes âgés de trois à cinq jours ont été transférés dans deux nouvelles cages Bugdorm de 30x30x30 cm. La première était la cage témoin et la seconde la cage expérimentale.

La cage témoin contenait cinquante (50) femelles négatives et cinquante (50) mâles négatifs. La cage expérimentale contenait 304 femelles positives et 152 mâles positifs. Les deux cages ont été maintenues à l'insectarium

## **Maintien des adultes**

Pour le maintien des moustiques adultes, un repas de jus sucré au saccharose à 10 % 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. Le jus a été fourni pendant trois jours avant le gorgement afin d'obtenir une bonne probabilité d'accouplement avant la mise en ponte.

## **Mise en ponte**

Le cycle gonotrophique (temps nécessaire à la digestion du sang et à la maturation des œufs) a pris deux jours. Un pondoir constitué d'un papier buvard humecté d'eau de robinet et déposé dans une boîte de Pétri en prenant soin de placer un chiffon imbibé d'eau sous le papier buvard afin d'éviter son dessèchement rapide a été introduit dans les cages 48h après

le gorgement. A la suite de ces travaux, les pondoirs contenant les œufs ont été retirés.

#### **4.3.1.4. Retrait et lavage des œufs**

Le jour suivant la mise en ponte, les pondoirs ont été retirés des cages. Les adultes morts ont été éliminés des pondoirs à l'aide d'une pince. Les œufs ont été photographiés afin d'en déterminer le nombre à l'aide du logiciel "Egg Counter V1.0". Ils ont ensuite été lavés à l'eau chloré à 1%. Pour cela, un disque de papier filtre (papier Wattman®) est placé en position centrale au sommet du système de filtrage et humecté en appuyant légèrement dessus pour qu'il se colle aux rebords et forme un joint hermétique. La pompe est mise en marche. Les œufs se trouvant sur le papier filtre du pondoir sont lavés lentement pour les déposer au centre du papier filtre afin d'éviter que les œufs ne s'échappent de part et d'autre du creux. Une fois tous les œufs lavés, la pompe est arrêtée et le papier filtre est légèrement soulevé pour supprimer la pression. Le creux est rempli soigneusement avec une solution chlorée à 1%. Trente secondes pompe est ensuite arrêtée, le creux rempli d'eau, puis elle (la pompe) est de nouveau mise en marche. Cette dernière étape est répétée une seconde fois. Les œufs sur le papier sont transférés dans des plateaux distincts (plateaux expérimentaux et plateaux témoins) contenant 500ml d'eau de robinet et gardés à l'insectarium pour la détermination du taux d'éclosion.

#### **4.3.1.5. Détermination du taux d'éclosion**

Après la mise en éclosion, les plateaux ont été inspectés et suivis d'un à sept jours pour la détection des larves de stade 1. Un échantillon de 200 œufs a été prélevé afin de déterminer le taux d'éclosion.

#### **4.3.2. Détermination de la compétitivité pour l'accouplement des mâles Ac(DSM)2**

Dans le cadre de cette étude, la compétitivité pour l'accouplement est l'expression du taux d'accouplement des mâles transgéniques, en présence des mâles non transgéniques du même âge.

#### **4.3.2.1. Tri des larves**

Les larves transgéniques ont été triées des non transgéniques comme décrit dans la section Stérilité 4.3.1.1. A la différence du tri des larves pour la stérilité, celles triées pour la compétitivité n'ont pas été réexaminées. Les larves ont été élevées séparément jusqu'à l'apparition des nymphes.

#### **4.3.2.2. Tri des nymphes**

Les nymphes ont été triées comme décrit à la section Stérilité 4.3.1.2 ensuite les pots contenant les nymphes ont été introduits dans les cages pour l'émergence.

#### **4.3.2.3. Emergences des adultes**

Trois (3) cages Bugdorm de 30 x 30 cm, ont été établies. Elles contenaient respectivement les pots de nymphes étiquetés comme suit : mâles POSITIFS, mâles NÉGATIFS et femelles locaux (*wild-type*). Chaque jour, pendant la période d'émergence, les adultes ont été vérifiés visuellement afin de s'assurer qu'aucun mâle ou femelle ne se trouve dans les cages non indiquées avant l'évaluation de la compétitivité.

#### **4.3.2.4. Détermination de la compétitivité pour l'accouplement des mâles Ac(DSM)2**

Les moustiques adultes âgés de trois (3) jours ont été aspirés de la cage d'émergence et transférés dans trois (3) grandes cages Bugdorm (modèle E6100) de dimension 45x45x45cm. A l'intérieur de chaque cage était placé un papier de format A4 imprimé en noir qui servait de marqueur pour l'accouplement. Chaque cage contenait 50 mâles négatifs + 50 mâles positifs et 100 femelles de type local.

#### **Maintien des adultes**

Les adultes ont été maintenus comme décrit dans la section stérilité 4.3.1.3 pendant cinq (5) jours. Les adultes vivants ont ensuite été retirés des cages.

### **Retraits des adultes**

Tous les moustiques vivants des différentes cages ont été retirés à l'aide d'un aspirateur à bouche. Ils ont ensuite été placés dans des pots différents bien étiquetés. Du coton imbibé de jus sucré à 10% était déposé sur chaque pot. Le nombre de femelles et de mâles vivants présents dans chaque cage a été dénombré puis noté afin d'être examiné.

### **Examen des mâles**

Les mâles ont été examinés afin de déterminer les effectifs de transgéniques et de non-transgéniques. Pour cela, ils ont été placés au congélateur à -20°C pendant 30 secondes puis maintenus sur de la glace afin d'être anesthésiés. L'observation à la loupe à fluorescence a permis d'identifier et de dénombrer les individus porteurs du marqueur DsRed au niveau des yeux. Parallèlement, les femelles aussi ont été examinées.

### **Examen des femelles pour insémination**

Les femelles vivantes ont été disséquées afin d'extraire leurs spermathèques. Ces dernières ont ensuite été examinées durant deux jours successifs sur un microscope de type EVOS FL. L'observation consistait à regarder dans un premier temps la présence des spermatozoïdes à l'objectif 4X sous la lumière blanche du microscope. Dans un second temps, à regarder la fluorescence avec le réglage GFP chez les spermatozoïdes obtenus.

#### **4.3.3. Détermination de la longévité des moustiques génétiquement modifiés Ac(DSM)2**

La longévité d'un moustique est le nombre de jours qui séparent la date d'émergence de l'imago de la date de sa mort. Nous l'avons déterminé de la date de croisement des adultes (trois jours après émergence des nymphes) jusqu'à six (6) semaines. Cette expérience a été effectuée en trois répliques.

##### **4.3.3.1. Tri des larves**

Le tri a été effectué comme décrit à la partie compétitivité 4.3.2.1. Les larves ont été élevées séparément jusqu'à l'apparition des nymphes.

#### **4.3.3.2. Tri des nymphes**

Le tri des nymphes a été effectué comme décrit dans la section compétitivité 4.3.2.2 à l'exception qu'elles n'ont pas été réexaminées. Ensuite les pots contenant les nymphes ont été introduits dans les cages pour l'émergence.

#### **4.3.3.3. Emergence des adultes**

Les nymphes collectées ont été placées dans quatre (4) cages. La première contenait les mâles positifs, la seconde les femelles négatives, la troisième les femelles positives et la quatrième les mâles négatifs. Les adultes émergés ont été utilisés pour la mise en place des cages de suivi de longévité.

#### **4.3.3.4. Détermination de la longévité**

Trois jours après l'émergence des adultes, douze (12) nouvelles cages ont été établies afin d'avoir toutes les combinaisons possibles (voir tableau 1).

**Tableau 1 :** Types et réplicas des croisements effectués pour la détermination de la longévité de moustiques modifiés et non modifiés

<b>Nombre de réplica</b>	<b>Type de croisement</b>	<b>Nombre de moustiques</b>
<b>Réplica 1</b>	Négatifs mâles	30
	Négatifs femelles	30
<b>Réplica 2</b>	Négatifs mâles	30
	Négatifs femelles	30
<b>Réplica 3</b>	Négatifs mâles	30
	Négatifs femelles	30
<b>Réplica 1</b>	Négatifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 2</b>	Négatifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 3</b>	Négatifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 1</b>	Positifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 2</b>	Positifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 3</b>	Positifs mâles	30
	Positives femelles	30
<b>Réplica 1</b>	Positifs mâles	30
	Négatives femelles	30
<b>Réplica 2</b>	Positifs mâles	30
	Négatives femelles	30
<b>Réplica 3</b>	Positifs mâles	30
	Négatives femelles	30



## **Maintien des adultes**

Les moustiques adultes ont été maintenus comme décrit à la section Stérilité 4.3.1.3 tout au long de l'expérience. Les jus des cages étaient changés une fois par semaine. A la suite de cela les adultes morts étaient retirés et identifiés par sexe quotidiennement.

## **Retrait et identification par sexe des adultes morts**

A compter du jour suivant le croisement des adultes, les moustiques adultes morts ont été retirés des cages et identifiés par sexe, quotidiennement pendant six (06) semaines. A la suite de cela, le jus sucré était retiré des cages.

### **4.4. Saisie et analyse des données**

#### **4.4.1. Stérilité**

Les données ont été collectées dans le registre du laboratoire, saisies et analysées à l'aide de Microsoft Excel 2010. Les données collectées étaient constituées des paramètres suivants : le nombre total d'œufs pondus, le nombre de larves écloses et le taux d'éclosion des œufs.

#### **4.4.2. Compétitivité**

Les données ont été collectées sur les fiches préétablies, saisies dans Microsoft Excel 2016. Le nombre moyen de moustiques femelles survivant à la fin de l'expérience ont été calculés avec Microsoft Excel 2016. Les taux de survie des mâles DSM par rapport aux moustiques locaux en cages d'accouplement ont été évalués par test-t bilatéral apparié exploitant la fonction d'Analyse des données d'Excel.

L'indicateur statistique de compétitivité, « C » (Fried, 1971), correspond au rapport entre le nombre de spermathèques contenant du sperme normal et celui contenant du sperme fluorescent tel qu'indiqué par la formule ci-dessous.

$$C = \frac{\text{nombre avec sperme GFP}}{\text{nombre avec sperme naturel}} \times \frac{\text{nombre de mâles positifs}}{\text{nombre de mâles négatifs}}$$

### **4.4.3. Longévité**

Les estimations de Kaplan-Meier pour la durée de vie (survie) moyenne et le temps létal 50 % (TL 50) ont été effectuées pour créer et analyser des courbes de survie en utilisant des données censurées (0 = mort observée, 1 = toujours en vie à la fin de l'expérience).

Un modèle linéaire généralisé à effets mixtes a été utilisé pour évaluer la durée de vie moyenne (calculée à l'aide des courbes de survie de Kaplan-Meier). Le sexe et le statut transgénique en constituaient les facteurs fixes et le réplica expérimental le facteur à effet aléatoire. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec divers programmes du logiciel JMP v15.2.

# RESULTATS

## 5. Résultats

### 5.1. Stérilité

Sur 10 697 œufs collectés dans la cage expérimentale, aucune larve n'a été retrouvée après sept jours. En revanche, après 24 heures déjà, 72% (89/146) des œufs ont éclos dans les plateaux témoins qui contenaient 1 119 œufs (Figure 6).

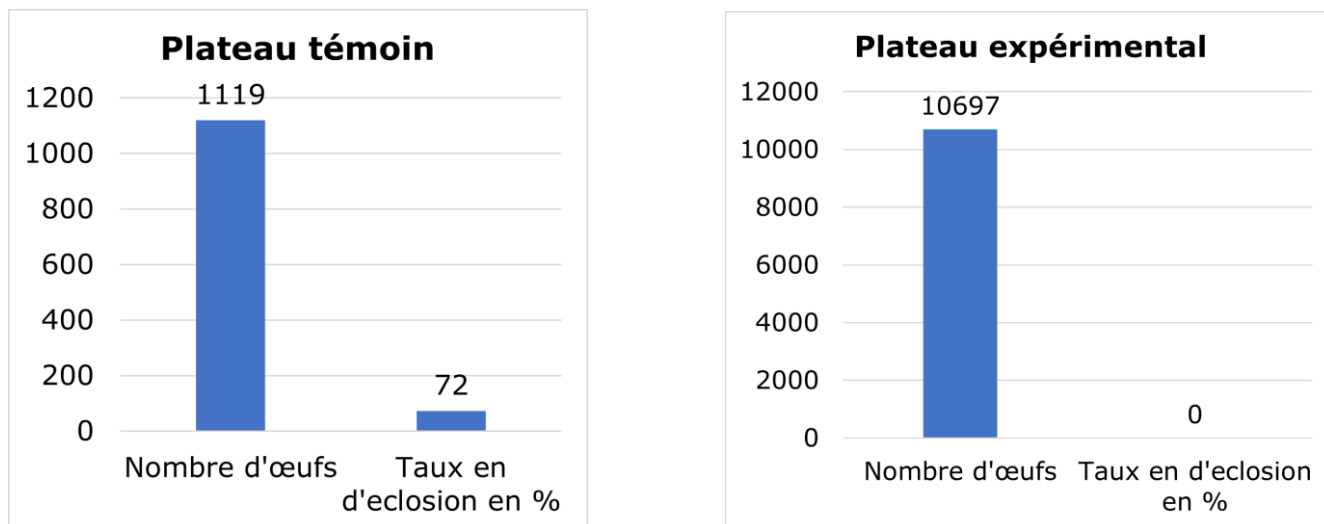


Figure 6 : Nombre d'œufs et taux d'éclosion observés

### 5.2. Compétitivité

Un taux d'accouplement moyen de 65,4 % (SEM = 1,9 %, n = 3) a été observé chez les femelles survivantes qui ont pu être disséquées (Tableau 2). Parmi les femelles inséminées, 15,4 % (SEM = 2,3, n = 3) s'étaient accouplées avec des mâles DSM et 84,6 % (SEM = 2,3, n = 3) avec des mâles locaux. Aucun accouplement mixte n'a été observé. L'indice de compétitivité de Fried calculé pour les mâles transgéniques DSM POSITIFS était de 0,18 (tableau 2).

**Tableau 2 :** Synthèse de la dissection, évaluation du statut d'accouplement et l'indice « C » de compétitivité

Réplica	Nombres de femelles disséquées	% de femelles accouplées	% de femelles accouplées avec un mâle transgénique	% de femelles accouplées avec un mâle non transgénique	Indice « C » de Fried
<b>1</b>	70	64,3% (45/70)	20% (09/45)	80,0% (36/45)	0,25
<b>2</b>	42	69,0% (29/42)	13,8% (04/29)	86,2% (25/29)	0,16
<b>3</b>	89	62,9% (56/89)	12,5% (07/56)	87,5% (49/56)	0,14
<b>Moyenne</b>	67,0	65,4%	15,4%	84,6%	<b>0,18</b>
<b>SEM</b>	13,7	1,9%	2,3%	2,3%	0,03%

### 5.3. Longévité

Il est apparu que le sexe influait de façon très significative sur la longévité et que les femelles vivent plus longtemps que les mâles (moyenne des moindres carrés (MMC) : Femelles = 23,1 ; mâles = 15,1 ;  $p < 0,001$  ;  $t = 10,98$  ;  $ddl = 64$ ). Également, le statut transgénique influait de façon significative sur la longévité, avec une longévité des moustiques non transgéniques supérieur à celle des moustiques transgéniques de même âge (MMC : moustiques non transgéniques = 18,8 ; moustiques transgéniques = 18,4 ;  $p = 0,049$  ;  $t = 2,00$  ;  $ddl = 64$ ). Il n'y avait pas

d'interaction entre le sexe et le statut transgénique ( $p = 0,6$  ;  $t = -0,53$  ;  $ddl = 64$ ).

Les durées moyennes de vie ont été évaluées dans le tableau suivant (tableau 3).

**Tableau 3** : Récapitulatif des durées de vie moyennes et des TL50 calculés à partir des analyses de survie de Kaplan-Meier

<b>Sexe</b>	<b>Statut transgénique</b>	<b>Durée de vie moyenne en jours</b>	<b>En cage avec</b>	<b>Durée de vie moyenne en jours</b>	<b>TL 50 en jours</b>
<b>Femelles</b>	Neg (c)	23,6 (4,0)	Neg (♂)	26,0 (2,8)	27,8
			Pos (♂)	21,3 (3,7)	23,3
	Pos (♀)	22,6 (2,6)	Neg (♂)	23,6 (1,9)	23,7
			Pos (♂)	21,5 (2,8)	22,6
<b>Mâles</b>	Neg (♂)	16,0 (2,3)	Neg (♀)	16,5 (2,7)	15,6
			Pos (♀)	15,6 (1,7)	17,3
	Pos (♂)	14,2 (3,0)	Neg (♀)	12,9 (3,0)	11,8
			Pos (♀)	15,5 (2,5)	14,4

L'évaluation de la courbe de survie de Kaplan Meier a été faite dans la figure ci-dessous (figure 7).

NB : Neg = Négatif ; Pos = Positif;

♂ = mâle ; ♀ = femelle

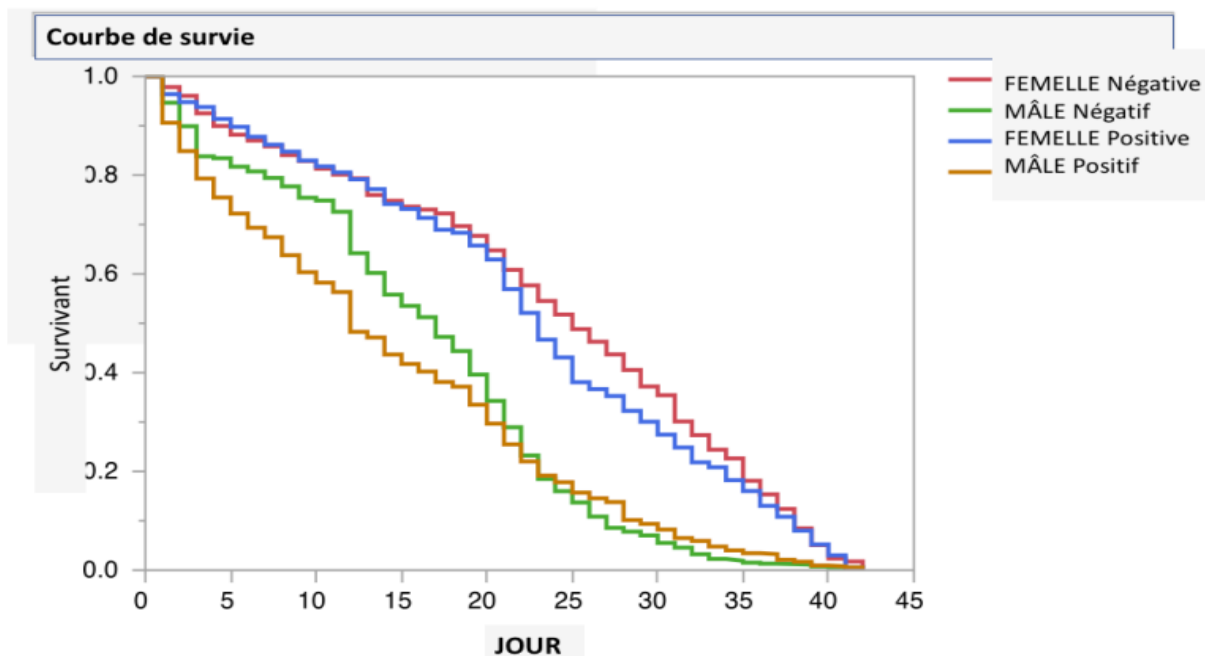


Figure 7 : Courbes de survie de Kaplan-Meier pour les mâles et les femelles positifs et négatifs



# COMMENTAIRES ET DISCUSSION



## **6. Commentaires et discussion**

### **6.1. Stérilité**

Cette étude a montré qu'après une observation de sept jours, aucun œuf issu du plateau expérimental n'a éclos. Contrairement au plateau témoin où il y a eu 72% de taux d'éclosion en 24 heures. Ce qui signifie que les mâles transgéniques (DSM) sont stériles.

Cette étude est comparable à celle de Windbichler et al. 2008 ; Klein et al. 2012 qui ont trouvé une stérilité absolue conférée aux mâles DSM modifiés de *Anopheles gambiae* établis dans un patrimoine génétique de « G3 ».

Les résultats de cette étude sont supérieurs à ceux de Munhenga et al. 2016 qui ont utilisés des mâles de *Anopheles arabiensis* modifiés par irradiation avec 73% de stérilité induite, supérieure à ceux de Yamada et al. 2014 qui ont utilisé des moustiques *Anopheles arabiensis* modifié par irradiation tirés par la dieldrine avec 81,3% de stérilité induite.

Ils (les résultats de cette études) sont supérieure aussi à celle de Andreasen et Curtis 2005 avec une stérilité de 99,3% pour les adultes et 99,45% lorsque les nymphes de *Anopheles gambiae* sont irradiées à 120 Gy.

Ces différences pourraient s'expliquer par les techniques de modifications des mâles et aussi par l'utilisation de la dieldrine, un insecticide organochloré.

### **6.2. Compétitivité pour l'accouplement**

Il ressort de cette étude que 15,4% des femelles s'étaient accouplées avec des mâles transgéniques (DSM) avec un nombre égal de mâles transgénique et non transgénique. L'indice C de Fried obtenu qui a été de 0,18 est considérablement inférieur à 1 attendu pour une compétitivité pour l'accouplement entre les mâles transgéniques et non transgéniques. Ce résultat montre une compétitivité d'accouplement pour les mâles transgéniques réduite par rapport aux mâles non transgéniques.

Ces résultats sont comparables à ceux de Facchinelli et al. 2015, Munhenga et al. 2016 et Yamada et al. 2014 qui ont trouvé respectivement des indices de Fried de 0,1 ; 0,1 et 0,205 avec les mâles de *Anopheles arabiensis* modifiés.

Ces résultats sont inférieurs à ceux de Windbichler et al. 2008 et Klein et al. 2012 qui ont trouvé respectivement des indices de Fried de 0,33 et 0,71 en utilisant une souche de moustiques génétiquement modifiés mâles stériles dominants (DSM) de *Anopheles gambiae* établis dans un patrimoine génétique de « G3 ».

Cette différence pourrait être expliquée par le temps d'adaptation de la souche « G3 » aux conditions de l'insectarium car la souche est connue avoir fait plus de 40 ans au laboratoire alors que la souche locale du Mali a été établie en 2013 (Ekechukwu et al. 2015).

Les résultats sont aussi inférieurs à ceux de Maïga et al. 2014 qui ont obtenu un indice de Fried C = 0,53 en utilisant les moustiques *Anopheles coluzzii* partiellement stérilisé par irradiation à 90 Gy.

Cette différence pourrait s'expliquer par la technique de modification utilisées pour stériliser les moustiques.

Statistiquement, ceci n'est pas significativement différent de 50 % des accouplements attendus avec des mâles RIDL si ces derniers étaient aussi compétitifs que ceux des mâles de type sauvage. Cela montre que *A. Aegypti* RIDL-513A a une excellente compétitivité d'accouplement dans des conditions de semi-terrain, vérifiant les tendances antérieures obtenues dans de petites cages de laboratoire. Nous avons également observé une compatibilité d'accouplement élevée entre les mâles RIDL mexicains récemment colonisés et les femelles malaisiennes de type sauvage élevées en laboratoire.

### 6.3 Longévité

Dans cette étude, il n'y a pas eu d'interaction significative entre le sexe et le statut transgénique ( $p= 0,600$  ;  $t= -0,53$  ;  $ddl= 64$ ). En revanche, il est apparu que le sexe a un effet très significatif sur la longévité et que les femelles vivaient plus longtemps que les mâles (MMC : femelles= 23,1 ; mâles= 15,1 ;  $p<0,001$  ;  $t= 10,98$  ;  $ddl= 64$ ). Le statut transgénique influait également de façon significative sur la longévité, avec une durée de vie plus longue pour les moustiques non transgéniques par rapport aux transgéniques de même sexe (MMC : moustiques non transgéniques = 18,8 ; moustiques transgéniques = 18,4 ;  $p= 0,049$  ;  $t= 2,000$  ;  $ddl= 64$ ).

Les résultats de cette étude sont supérieurs à ceux de (McArthur et al.2014) qui ont obtenu une longévité moyenne des femelles adultes de 34,32 jours d'une souche ayant hérité du transgène via le parent paternel et 30,37 jours d'une souche ayant hérité du transgène via le parent maternel. Quant aux mâles, ils ont obtenu une longévité moyenne de 33,16 jours pour la souche ayant hérité du transgène via le parent paternel et 26,24 jours pour la souche ayant hérité du transgène via le parent maternel. Ces résultats ont été obtenue en utilisant une souche transgénique de *Anopheles gambiae* exprimant le peptide Vida3 dans l'intestin de la femelle après un repas de sang, qui présentait une protection significative contre les parasites du paludisme.

Cette longévité réduite chez les moustiques modifiés pourrait s'expliquer par le poids du transgène.

Ces résultats sont aussi supérieurs à ceux de Ickowicz et al. 2021 qui ont obtenu une longévité de 10 jours au maximum sur le terrain en utilisant des moustiques *Anopheles coluzzii*. Cette différence pourrait s'expliquer par le lâcher des moustiques sur le terrain car les moustiques sont soumis à divers paramètres tels que la température, l'humidité, le vent, les prédateurs.

Ces résultats étaient différents de ceux obtenus par Bargielowski et al. 2011 qui ont trouvé une longévité moyenne de 24 jours quel qu'en soit le sexe avec une souche génétiquement modifiée de *Aedes Aegypti* portant un système de rétroaction positive létale répressible à la tétracycline (OX513A). Les moustiques non modifiés vivaient environ 4 jours de plus que les transgéniques OX513A.

Cette différence pourrait s'expliquer par la technique de modification ainsi que l'espèce de moustique utilisée.



# **CONCLUSION et RECOMMANDATIONS**

## **7. Conclusion et recommandations**

### **7.1. Conclusion**

La souche introgressée du Mali a été aussi stérile que la souche importée d'Italie. Aucune éclosion des œufs n'a été observée après une semaine d'observation.

Les mâles modifiés ont été moins compétitifs pour l'accouplement que les mâles non modifiés. L'indice Fried de C obtenue pour les mâles stériles de la souche Ac(DSM)2 était considérablement inférieur à un score de 1 attendu.

Les moustiques modifiés avaient une longévité relativement réduite comparée à celle des moustiques non modifiés.

### **7.2. Recommandations**

A la fin de notre étude et vu nos résultats, nous recommandons aux structures de recherches :

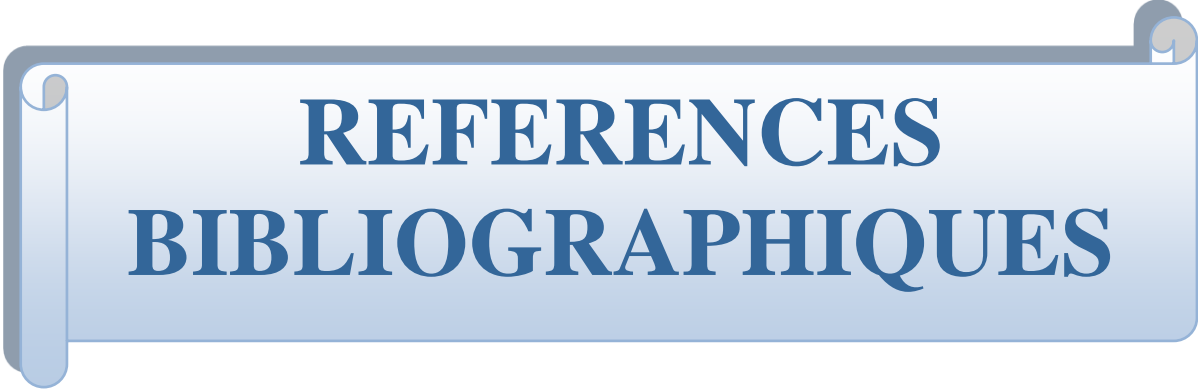
- D'approfondir les recherches afin de rendre le mâle modifié aussi ou plus compétitif et qu'il puisse vivre aussi ou plus longtemps que le mâle non modifié.
- Aux partenaires techniques et financiers de continuer à financer davantage la recherche sur les nouveaux outils de lutte antivectorielle contre le paludisme.

### **7.3 Limite**

L'étude sur la stérilité sexuelle des mâles a été réalisée sur 304 femelles. Il serait intéressant d'augmenter davantage la taille d'échantillon pour le futur.

L'étude sur la compétitivité sexuelle des mâles a été réalisée une seule fois. Il serait important d'augmenter la taille de l'échantillon en répétant l'expérience trois fois au moins.

Quant à l'étude sur la longévité, le jus sucré a été retiré des cages après six semaines mettant de fin de façon volontaire à l'expérience. Il serait également bien de suivre les moustiques jusqu'au dernier jour de retrait du dernier moustique.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## 8. Bibliographie

- Alphey, Luke. 2014. « Genetic control of mosquitoes ». *Annual Review of Entomology* 59 (janvier): 205-24.
- Alphey, Luke, Andrew McKemey, Derric Nimmo, Marco Neira Oviedo, Renaud Lacroix, Kelly Matzen, et Camilla Beech. 2013. « Genetic control of *Aedes mosquitoes* ». *Pathogens and Global Health* 107 (4): 170-79.
- Alphey, Luke, Derric Nimmo, Sinead O'Connell, et Nina Alphey. 2008. « Insect Population Suppression Using Engineered Insects ». In *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease*, édité par Serap Aksoy, 93-103. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer.
- Andreasen, M. H., et C. F. Curtis. 2005. « Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release ». *Medical and Veterinary Entomology* 19 (3): 238-44.
- Andrew M Hammond, Tony Nolan & Andrea Crisanti Kyros Kyrou, Roberto Galizi, Nace Kranjc, Austin Burt, Andrea K Beaghton. 2018. « A crisPr-cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes », septembre.
- Baldini, Francesco, Nicola Segata, Julien Pompon, Perrine Marcenac, W. Robert Shaw, Roch K. Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Elena A. Levashina, et Flaminia Catteruccia. 2014. « Evidence of Natural *Wolbachia* Infections in Field Populations of *Anopheles Gambiae* ». *Nature Communications* 5 (juin): 3985.
- Bargielowski, Irka, Derric Nimmo, Luke Alphey, et Jacob C. Koella. 2011. « Comparison of Life History Characteristics of the Genetically Modified OX513A Line and a Wild Type Strain of *Aedes Aegypti* ». *PLOS ONE* 6 (6): e20699.
- Bhatt, S., D. J. Weiss, E. Cameron, D. Bisanzio, B. Mappin, U. Dalrymple, K. E. Battle, et al. 2015. « The effect of malaria control on



- Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015 ». *Nature* 526 (7572): 207-11.
- Bian, Guowu, Deepak Joshi, Yuemei Dong, Peng Lu, Guoli Zhou, Xiaoling Pan, Yao Xu, George Dimopoulos, et Zhiyong Xi. 2013. « *Wolbachia* Invades *Anopheles Stephensi* Populations and Induces Refractoriness to *Plasmodium* Infection ».
- Blandin, Stephanie, Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, et Elena A. Levashina. 2004. « Complement-Like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* ».
- Boyer, S. 2012. « [Sterile insect technique: targeted control without insecticide] ». *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial* 72 Spec No (mars): 60-62.
- Brelsfoard, Corey L., William St Clair, et Stephen L. Dobson. 2009. « Integration of Irradiation with Cytoplasmic Incompatibility to Facilitate a Lymphatic Filariasis Vector Elimination Approach ». *Parasites & Vectors* 2 (1): 38.
- Buchman Anna, Gamez Stephanie, Li Ming, Antoshechkin Igor, Li Hsing-Han, Wang Hsin-Wei, Chen Chun-Hong, et al. 2019. « Engineered resistance to Zika virus in transgenic *Aedes Aegypti* expressing a polycistronic cluster of synthetic small RNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (9): 3656-61.
- 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* 270 (1518): 921-28.
- . 2014. « Heritable strategies for controlling insect vectors of disease ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society.
- Burt, Austin, et Andrea Crisanti. 2018. « Gene Drive: Evolved and Synthetic ». *ACS Chemical Biology* 13 (2): 343-46.

- Calvitti, Maurizio, Riccardo Moretti, Elena Lampazzi, Romeo Bellini, et Stephen L. Dobson. 2010. « 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* 47 (2): 179-87.
- Caragata, Eric P., Heverton L. C. Dutra, et Luciano A. Moreira. 2016. « Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with *Wolbachia* ». *Trends in Parasitology* 32 (3): 207-18.
- Carballar-Lejarazú, Rebeca, Thai Binh Pham, Vanessa Bottino-Rojas, Adriana Adolphi, et Anthony A. James. 2021. « Small-Cage Laboratory Trials of Genetically-Engineered Anopheline Mosquitoes ». *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n° 171 (mai): e62588.
- Carnevale, Pierre, et Vincent Robert. 2009. « Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle ».
- Carvalho, Danilo O., Andrew R. McKemey, Luiza Garziera, Renaud Lacroix, Christl A. Donnelly, Luke Alphey, Aldo Malavasi, et Margareth L. Capurro. 2015. « Suppression of a Field Population of *Aedes Aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (7): e0003864.
- Catteruccia, Flaminia, Tony Nolan, Thanasis G. Loukeris, Claudia Blass, Charalambos Savakis, Fotis C. Kafatos, et Andrea Crisanti. 2000. « Stable Germline Transformation of the Malaria Mosquito *Anopheles Stephensi* ». *Nature* 405 (6789): 959-62.
- Chen Chun-Hong, Huang Haixia, Ward Catherine M., Su Jessica T., Schaeffer Lorian V., Guo Ming, et Hay Bruce A. 2007. « A Synthetic Maternal-Effect Selfish Genetic Element Drives Population Replacement in *Drosophila* ». *Science* 316 (5824): 597-600.
- Chen, Lin, Changliang Zhu, et Donghui Zhang. 2013. « Naturally Occurring Incompatibilities between Different *Culex Pipiens* Palleus

- Populations as the Basis of Potential Mosquito Control Measures ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (1): e2030.
- Christophides, George K., Dina Vlachou, et Fotis C. Kafatos. 2004. « Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae* ». *Immunological Reviews* 198 (1): 127-48.
- Corby-Harris, Vanessa, Anna Drexler, Laurel Watkins de Jong, Yevgeniya Antonova, Nazzy Pakpour, Rolf Ziegler, Frank Ramberg, et al. 2010. « Activation of Akt Signaling Reduces the Prevalence and Intensity of Malaria Parasite Infection and Lifespan in *Anopheles stephensi* Mosquitoes ». *PLoS Pathogens* 6 (7): e1001003.
- Crompton, Peter D., Susan K. Pierce, et Louis H. Miller. 2010. « Advances and Challenges in Malaria Vaccine Development ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (12): 4168-78.
- Curtis, C. F. 1968. « Possible Use of Translocations to Fix Desirable Genes in Insect Pest Populations ». *Nature* 218 (5139): 368-69.
- Curtis, C. F., et P. M. Graves. 1988. « Methods for replacement of malaria vector populations. » *J Trop Med Hyg* 91.
- Deredec, Anne, H. Charles J. Godfray, et Austin Burt. 2011. « Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (43): E874-80.
- Ekechukwu, Nkiru E, Rowida Baeshen, Sékou F Traorè, Mamadou Coulibaly, Abdoulaye Diabate, Flaminia Catteruccia, et Frédéric Tripet. 2015. « Heterosis Increases Fertility, Fecundity, and Survival of Laboratory-Produced F1 Hybrid Males of the Malaria Mosquito *Anopheles coluzzii* ». *G3 Genes|Genomes|Genetics* 5 (12): 2693-2709.
- Facchinelli, Luca, Laura Valerio, Rosemary S Lees, Clelia F Oliva, Tania Persampieri, C Matilda Collins, Andrea Crisanti, Roberta Spaccapelo, et Mark Q Benedict. 2015. « Stimulating *Anopheles gambiae* swarms

- in the laboratory: application for behavioural and fitness studies ». *Malaria Journal* 14 (juillet): 271.
- Feachem, Richard G. A., Ingrid Chen, Omar Akbari, Amelia Bertozzi-Villa, Samir Bhatt, Fred Binka, Maciej F. Boni, et al. 2019. « Malaria Eradication within a Generation: Ambitious, Achievable, and Necessary ». *The Lancet* 394 (10203): 1056-1112.
- Flores, Heather A., et Scott L. O'Neill. 2018a. « Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes ». *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group.
- Flores, Heather A., et Scott L. O'Neill. 2018b. « Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (8): 508-18.
- Franz, Alexander W. E., Irma Sanchez-Vargas, Zach N. Adelman, Carol D. Blair, Barry J. Beaty, Anthony A. James, et Ken E. Olson. 2006. « Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes Aegypti* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (11): 4198-4203.
- Fu, Guoliang, Rosemary S. Lees, Derric Nimmo, Diane Aw, Li Jin, Pam Gray, Thomas U. Berendonk, et al. 2010. « Female-specific flightless phenotype for mosquito control ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (10): 4550-54.
- Galizi, Roberto, Lindsey A. Doyle, Miriam Menichelli, Federica Bernardini, Anne Deredec, Austin Burt, Barry L. Stoddard, Nikolai Windbichler, et Andrea Crisanti. 2014. « A Synthetic Sex Ratio Distortion System for the Control of the Human Malaria Mosquito ». *Nature Communications* 5 (1): 3977.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms4977>.
- Gantz, Valentino M., et Ethan Bier. 2015. « The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations ». *Science* 348 (6233): 442-44.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa5945>.

- Gesto, João Silveira Moledo, Gabriel Sylvestre Ribeiro, Marcelle Neves Rocha, Fernando Braga Stehling Dias, Julia Peixoto, Fabiano Duarte Carvalho, Thiago Nunes Pereira, et Luciano Andrade Moreira. 2021. « Reduced Competence to Arboviruses Following the Sustainable Invasion of *Wolbachia* into Native *Aedes Aegypti* from Southeastern Brazil ». *Scientific Reports* 11 (1): 10039. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89409-8>.
- Grossman, G. L., C. S. Rafferty, J. R. Clayton, T. K. Stevens, O. Mukabayire, et M. Q. Benedict. 2001. « Germline Transformation of the Malaria Vector, *Anopheles Gambiae*, with the PiggyBac Transposable Element ». *Insect Molecular Biology* 10 (6): 597-604. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00299.x>.
- Hammond, Andrew, Roberto Galizi, Kyros Kyrou, Alekos Simoni, Carla Siniscalchi, Dimitris Katsanos, Matthew Gribble, et al. 2016. « A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito vector *Anopheles gambiae* ». *Nature biotechnology* 34 (1): 78-83. <https://doi.org/10.1038/nbt.3439>.
- Hargreaves, K., B. D. Brooke, M. Coetzee, et L. L. Koekemoer. 2009. « Pyrethroid resistance in a major African malaria vector *Anopheles arabiensis* from Mamfene , northern KwaZulu-Natal , South Africa », n° April: 127-31.
- Harris, Angela F, Andrew R McKemey, Derric Nimmo, Zoe Curtis, Isaac Black, Siân A Morgan, Marco Neira Oviedo, et al. 2012. « Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes ». *Nature Biotechnology* 30 (9): 828-30. <https://doi.org/10.1038/nbt.2350>.
- Hoffmann, A. A., B. L. Montgomery, J. Popovici, I. Iturbe-Ormaetxe, P. H. Johnson, F. Muzzi, M. Greenfield, et al. 2011. « Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission ». *Nature* 476 (7361): 454-59. <https://doi.org/10.1038/nature10356>.

- Ickowicz, Adrien, Scott D. Foster, Geoffrey R. Hosack, et Keith R. Hayes. 2021. « Predicting the spread and persistence of genetically modified dominant sterile male mosquitoes ». *Parasites and Vectors* 14 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04982-1>/FIGURES/5.
- James, A. A., B. T. Beerntsen, M. de L. Capurro, C. J. Coates, J. Coleman, N. Jasinskiene, et A. U. Krettli. 1999. « Controlling Malaria Transmission with Genetically-Engineered, *Plasmodium*-Resistant Mosquitoes: Milestones in a Model System ». *Parassitologia* 41 (1-3): 461-71.
- James, Stephanie, Frank H. Collins, Philip A. Welkhoff, Claudia Emerson, H. Charles J. Godfray, Michael Gottlieb, Brian Greenwood, et al. 2018. « Pathway to Deployment of Gene Drive Mosquitoes as a Potential Biocontrol Tool for Elimination of Malaria in Sub-Saharan Africa: Recommendations of a Scientific Working Group ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (6\_Suppl): 1-49. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0083>.
- Kamareddine, Layla. 2012. « The Biological Control of the Malaria Vector ». *Toxins* 4 (9): 748-67. <https://doi.org/10.3390/toxins4090748>.
- Kandul, Nikolay P., Junru Liu, Hector M. Sanchez C, Sean L. Wu, John M. Marshall, et Omar S. Akbariut. 2018. « Transforming Insect Population Control with Precision Guided Sterile Males ». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/377721>.
- Kim, Won, Hyeyoung Koo, Adam M. Richman, Douglas Seeley, Jacopo Vizioli, Andrew D. Klocko, et David A. O'Brochta. 2004. « 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* 41 (3): 447-55. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.447>.
- Kittayapong, Pattamaporn, Nuanla-ong Kaeothaisong, Suwannapa Ninphanomchai, et Wanitch Limohpasmatee. 2018. « Combined

- 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* 11 (2): 657. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3214-9>.
- Klein, T. A., N. Windbichler, A. Deredec, A. Burt, et M. Q. Benedict. 2012. « Infertility resulting from transgenic I-PpoI male *Anopheles gambiae* in large cage trials ». *Pathogens and Global Health* 106 (1): 20-31. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000003>.
- Kouyaté, Bocar, Ali Sie, Maurice Yé, Manuela De Allegri, et Olaf Müller. 2007. « The Great Failure of Malaria Control in Africa : A District Perspective from Burkina Faso » 4 (6): 997-1000. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040127>.
- Kyrou, Kyros, Andrew M. Hammond, Roberto Galizi, Nace Kranjc, Austin Burt, Andrea K. Beaghton, Tony Nolan, et Andrea Crisanti. 2018. « A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes ». *Nature Biotechnology* 36 (11): 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.
- Lees, Rosemary Susan, Jeremie RL Gilles, Jorge Hendrichs, Marc JB Vreysen, et Kostas Bourtzis. 2015. « 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*, 10 (août): 156-62.
- Maïga, Hamidou, David Damiens, Abdoulaye Niang, Simon P. Sawadogo, Omnia Fatherhaman, Rosemary S. Lees, Olivier Roux, et al. 2014. « Mating competitiveness of sterile male *Anopheles coluzzii* in large cages ». *Malaria Journal* 13 (1): 1-6.

- Marinotti, Osvaldo, Nijole Jasinskiene, Aniko Fazekas, Sarah Scaife, Guoliang Fu, Stefanie T. Mattingly, Karissa Chow, David M. Brown, Luke Alphey, et Anthony A. James. 2013. « Development of a population suppression strain of the human malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi* ». *Malaria Journal* 12 (1): 1-10.
- McArthur, Clare C., Janet M. Meredith, et Paul Eggleston. 2014. « Transgenic *Anopheles gambiae* Expressing an Antimalarial Peptide Suffer No Significant Fitness Cost ». *PLOS ONE* 9 (2): e88625.
- Moreira, Luciano A., Iñaki Iturbe-Ormaetxe, Jason A. Jeffery, Guangjin Lu, Alyssa T. Pyke, Lauren M. Hedges, Bruno C. Rocha, et al. 2009. « A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes Aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium* ». *Cell* 139 (7): 1268-78.
- Munhenga, Givemore, Basil D. Brooke, Jeremie R. L. Gilles, Kobus Slabbert, Alan Kemp, Leonard C. Dandalo, Oliver R. Wood, et al. 2016. « 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* 9 (1).
- Niang, El Hadji Amadou, Hubert Bassene, Patrick Makoundou, Florence Fenollar, Mylène Weill, et Oleg Mediannikov. 2018. « First report of natural *Wolbachia* infection in wild *Anopheles funestus* population in Senegal ». *Malaria Journal* 17 (1): 408.
- Nolan, Tony, Philippos Papathanos, Nikolai Windbichler, Kalle Magnusson, Jason Benton, Flaminia Catteruccia, et Andrea Crisanti. 2011. « Developing Transgenic *Anopheles* Mosquitoes for the Sterile Insect Technique ». *Genetica* 139 (1): 33-39.
- OMS 2020, et Principaux messages. 2020. « 20 années de progrès et de défis mondiaux (paludisme) ».
- Perera, O. P., R. A. Harrell II, et A. M. Handler. 2002. « Germ-Line Transformation of the South American Malaria Vector, *Anopheles*



- Albimanus, with a PiggyBac/EGFP Transposon Vector Is Routine and Highly Efficient ». *Insect Molecular Biology* 11 (4): 291-97.
- Phuc, Hoang, Morten H. Andreasen, Rosemary S. Burton, Céline Vass, Matthew J. Epton, Gavin Pape, Guoliang Fu, et al. 2007. « Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control ». *BMC Biology* 5 (1): 1-11.
- PRINGLE, G. 1965. « A COUNT OF THE SPOROZOITES IN AN OOECYST OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*. » *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 59 (mai): 289-90.
- Rabinovich, Regina N., Chris Drakeley, Abdoulaye A. Djimde, B. Fenton Hall, Simon I. Hay, Janet Hemingway, David C. Kaslow, et al. 2017. « MalERA: An Updated Research Agenda for Malaria Elimination and Eradication ». *PLOS Medicine* 14 (11): e1002456.
- Ricci, I., C. Damiani, P. Rossi, A. Capone, P. Scuppa, A. Cappelli, U. Ulissi, et al. 2011. « Mosquito symbioses: from basic research to the paratransgenic control of mosquito-borne diseases ». *Journal of Applied Entomology* 135 (7): 487-93.
- Rosenberg, R., et J. Rungsiwongse. 1991. « The Number of Sporozoites Produced by Individual Malaria Oocysts. » *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45 (5): 574-77.
- Saridaki, Aggeliki, et Kostas Bourtzis. 2010. « *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals ». *Current Opinion in Microbiology* 13 (1): 67-72.
- Scavarda, N. J., et D. L. Hartl. 1984. « Interspecific DNA Transformation in *Drosophila* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (23): 7515-19.
- Schliekelman, Paul, et Fred Gould. 2000. « Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci ». *Journal of Economic Entomology* 93 (6): 1566-79.
- Shin, Sang Woon, Vladimir A. Kokoza, et Alexander S. Raikhel. 2003. « Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity ». *Journal of Experimental Biology* 206 (21): 3835-43.

- Shretta, Rima, Jenny Liu, Chris Cotter, Justin Cohen, Charlotte Dolenz, Kudzai Makomva, Gretchen Newby, et al. 2017. « Malaria Elimination and Eradication ». In *Major Infectious Diseases*, édité par King K. Holmes, Stefano Bertozzi, Barry R. Bloom, et Prabhat Jha, 3rd éd. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- Thailayil Janis, Magnusson Kalle, Godfray H. Charles J., Crisanti Andrea, et Catteruccia Flaminia. 2011. « Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (33): 13677-81.
- Touré, Yeya T., Ayoade M. J. Oduola, Johannes Sommerfeld, et Carlos M. Morel. s. d. « 6 Biosafety and risk assessment in the use of genetically modified mosquitoes for disease control ».
- Volz, Jennifer, Hans-Michael Müller, Agnieszka Zdanowicz, Fotis C. Kafatos, et Mike A. Osta. 2006. « A Genetic Module Regulates the Melanization Response of *Anopheles* to *Plasmodium* ». *Cellular Microbiology* 8 (9): 1392-1405.
- Waltz, Emily. 2016. « GM Mosquitoes Fire First Salvo against Zika Virus ». *Nature Biotechnology* 34 (3): 221-22.
- . 2021. « First Genetically Modified Mosquitoes Released in the United States ». *Nature* 593 (7858): 175-76.
- Wang, Jiuling, Yue Zhang, Yang O. Zhao, Michelle W. M. Li, Lili Zhang, Srdjan Dragovic, Nabil M. Abraham, et Erol Fikrig. 2013. « *Anopheles gambiae* Circumsporozoite Protein-Binding Protein Facilitates *Plasmodium* Infection of Mosquito Salivary Glands ». *The Journal of Infectious Diseases* 208 (7): 1161-69.
- Wang, Sibao, et Marcelo Jacobs-Lorena. 2013. « Genetic Approaches to Interfere with Malaria Transmission by Vector Mosquitoes ». *Trends in Biotechnology*, Special Issue: Celebrating 30 years of biotechnology, 31 (3): 185-93.

- Wangdi, Kinley, Luis Furuya-Kanamori, Justin Clark, Jan J. Barendregt, Michelle L. Gatton, Cathy Banwell, Gerard C. Kelly, Suhail A. R. Doi, et Archie C. A. Clements. 2018. « Comparative Effectiveness of Malaria Prevention Measures: A Systematic Review and Network Meta-Analysis ». *Parasites & Vectors* 11 (1): 1-13.
- Windbichler, Nikolai, Miriam Menichelli, Philippos Aris Papathanos, Summer B. Thyme, Hui Li, Umut Y. Ulge, Blake T. Hovde, et al. 2011. « A Synthetic Homing Endonuclease-Based Gene Drive System in the Human Malaria Mosquito ». *Nature* 473 (7346): 212-15.
- Windbichler, Nikolai, Philippos Aris Papathanos, et Andrea Crisanti. 2008. « Targeting the X Chromosome during Spermatogenesis Induces Y Chromosome Transmission Ratio Distortion and Early Dominant Embryo Lethality in *Anopheles gambiae* ». Édité par David L. Stern. *PLoS Genetics* 4 (12): e1000291.
- « World malaria report 2018 »
- « World Malaria Report 2021 » Consulté le 19 décembre 2021.
- Yamada, Hanano, Marc Jb Vreysen, Jeremie Rl Gilles, Givemore Munhenga, et David D. Damiens. 2014. « The effects of genetic manipulation, diel treatment and irradiation on the mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* in field cages ». *Malaria journal* 13 (1).
- Yao, Franck Adama, Abdoul-Azize Millogo, Patric Stephane Epopa, Ace North, Florian Noulin, Koulmaga Dao, Mouhamed Drabo, et al. 2022. « Mark-Release-Recapture Experiment in Burkina Faso Demonstrates Reduced Fitness and Dispersal of Genetically-Modified Sterile Malaria Mosquitoes ». *Nature Communications* 13 (1): 796.
- Zhang, Dongjing, Rosemary Susan Lees, Zhiyong Xi, Kostas Bourtzis, et Jeremie R. L. Gilles. 2016. « Combining the Sterile Insect Technique with the Incompatible Insect Technique: III-Robust Mating Competitiveness of Irradiated Triple *Wolbachia*-Infected *Aedes*

*Albopictus* Males under Semi-Field Conditions ». *PLOS ONE* 11 (3): e0151864.

Zhang, Dongjing, Rosemary Susan Lees, Zhiyong Xi, Jeremie R. L. Gilles, et Kostas Bourtzis. 2015. « Combining the Sterile Insect Technique with *Wolbachia*-Based Approaches: II- A Safer Approach to *Aedes Albopictus* Population Suppression Programmes, Designed to Minimize the Consequences of Inadvertent Female Release ». *PLOS ONE* 10 (8): e0135194.



# ANNEXES

## **9. Annexes**

### **9.1. Maintien de la colonie de moustique mâle stérile génétiquement modifié**

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 ou 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 :** KEITA

**Prénom :** Yahaya

**Tel :** 00223 62287387 E-mail: y.keitafaph@gmail.com

**Titre :** Stérilité, Compétitivité pour l'accouplement et Longévité d'une souche mâle stérile de *An. Coluzzii* génétiquement modifié au Mali.

**Année universitaire :** 2021-2022

**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 la stérilité, la compétitivité pour l'accouplement ainsi que la longévité d'une souche mâle stérile Ac(DSM)2 au laboratoire au Mali. Les paramètres ont été évalués en réalisant des croisements des moustiques modifiés et non modifiés. La souche de mâle stérile Ac(DSM)2 s'est révélée stérile, moins compétitif pour l'accouplement, et vivant moins longtemps. Il est important de mener ces expériences sur d'autres espèces de moustiques.

**Mots clés :** Moustique génétiquement modifié, stérilité, compétitivité, longévité



## **INSTRUCTIONS**

**Last name :** KEITA

**First Name :** Yahaya

**Phone:** 00223 62287387 E-mail: y.keitafaph@gmail.com

**Title:** Sterility, mating competitiveness and longevity of a male sterile strain of *An. coluzzii* in Mali.

**Academic year:** 2021-2022

**City of defense:** Bamako

**Country of origin :** 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 objective of this study was to evaluate the sterility, mating competitiveness and longevity of a sterile male Ac(DSM)2 strain in the laboratory in Mali. The parameters were evaluated by performing crosses of modified and no-modified mosquitoes. The sterile male Ac(DSM)2 strain was observed to be sterile, less competitive for mating, and living less long. It is important to conduct these experiments on other mosquito species.

**Key words:** Genetically modified mosquito, sterility, competitiveness, longevity

## *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 instruit 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, la probité et du Désintéressement.*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers les Malades et de sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et Mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes Criminels.*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes Promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

*Je le Jure.*