



HAL
open science

Étude des déterminants génétiques, physiologiques et environnementaux des rythmes journaliers d'activité chez les anophèles vecteurs du Plasmodium

Amadou Sékou Traore

► **To cite this version:**

Amadou Sékou Traore. Étude des déterminants génétiques, physiologiques et environnementaux des rythmes journaliers d'activité chez les anophèles vecteurs du Plasmodium. Maladies infectieuses. AgroParisTech, 2020. Français. NNT : 2020AGPT0005 . tel-03191602

HAL Id: tel-03191602

<https://pastel.hal.science/tel-03191602>

Submitted on 7 Apr 2021

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE
L'ENVIRONNEMENT - AGROPARISTECH

N° : 2020 AGPT 0005

Spécialité : Écologie de la santé

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau – n°584
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche MIVEGEC

Étude des déterminants génétiques, physiologiques et
environnementaux des rythmes journaliers d'activité
chez les anophèles vecteurs du *Plasmodium*

Présentée par Amadou Sékou TRAORE

Le 17 décembre 2020

Sous la direction de Frédéric SIMARD
et Carlo COSTANTINI

Devant le jury composé de

M. Frédéric SIMARD, Directeur de recherche, IRD Montpellier, France	Directeur de thèse
M. Carlo COSTANTINI, Directeur de recherche, IRD Montpellier, France	Co-Directeur de thèse
Mme Chloé LAHONDERE, Associate Professor, Department of Biochemistry – Virginia Tech, USA	Rapporteur
M. Clément VINAUGER, Associate Professor, Department of Biochemistry – Virginia Tech, USA	Rapporteur
M. Claudio LAZZARI, Professeur des Universités, Université de Tours, France	Membre du jury
M. Philippe SOLANO, Directeur de recherche, IRD Montpellier, France	Président du jury
Mme Karine MOULINE, Chargée de recherche, IRD Montpellier, France	Invitée

DEDIDACE

A feu mon père,

A feu mon ainée Fatoumata (Bantè)

A feu mon premier né.

A tous ceux qui ont perdu des proches étant loin d'eux et impuissants.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à l'endroit de Dieu le Tout Miséricordieux et le Très Miséricordieux, Celui qui se suffit à Lui-même.

Je tenais à remercier ceux sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour à savoir mes directeurs de Thèse Drs Frédéric Simard, Karine Mouline et Carlo Costantini qui ont accepté de m'encadrer, de me guider, de me supporter et de partager sans réserve leurs savoirs avec moi.

Dr Simard, vous m'avez présenté à Dr Mouline, puis vous n'avez jamais été loin de moi malgré vos responsabilités administratives très chargées. Toujours prêt à m'encourager, à me guider lorsqu'il le fallait afin de boucler cette thèse. Merci pour votre rigueur, votre patience et votre compréhension.

Dr Mouline, vous avez cru en moi et avez tout mis à ma disposition afin que cette thèse, malgré la complexité, se fasse dans de meilleures conditions. Merci pour cette confiance, votre patient et cette formation.

Dr Costantini, apprendre à vos côtés a été une expérience très enrichissante pour moi. Votre modestie malgré votre savoir m'a fortement marqué. Merci pour les cours de R et votre disponibilité malgré vos multiples occupations.

A vous trois, sachez que je suis fier d'avoir été votre étudiant.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail à savoir : Prof Claudio Lazzari, Dr Chloé Lahondère, Dr Clément Vinauger et Dr Philippe Solano.

Merci aux membres de mon comité de thèse : Dr Vincent Robert, Prof. Claudio Lazzari, Dr François Rouyer, Prof. Yehya Touré et ma référente, Dr Nathalie Charbonnel.

Un grand merci au Prof. Claudio Lazzari qui m'a accueilli à Tours et avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la mesure du rythme des insectes. Ce fut un honneur d'apprendre de vous et de vous avoir dans mon comité de thèse.

Merci à Dr François Rouyer qui m'a initié à l'analyse du rythme d'activité des insectes. Merci également pour vos apports lors de mes différents comités de thèse.

Merci au Prof. Yehya Touré pour son soutien, sa disponibilité et le partage d'expérience lors de mes séjours à Bamako.

Au Burkina, le travail de terrain et de laboratoire n'aura pas été possible sans l'équipe de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso (IRSS). Ainsi, je tenais à remercier le Prof. Roch Dabiré, directeur de l'IRSS de Bobo-Dioulasso, pour m'avoir accueilli pendant deux longues années. Mes remerciements vont aussi à toutes ces personnes qui durant mon accueil à l'IRSS de Bobo-Dioulasso ont participé de près ou de loin à mes travaux de laboratoire et de terrain : Abdoulaye Diabaté, Serge Yerbanga, Da Dari, François Hien, Janvier Tapsoba, Boubacar Nikiéma, Aida Ouattara, Rodrigue Dah Sié, Bienvenu Ouattara, Dieudonné Soma, Simon Sawadogo.

Un grand merci aux amis chercheurs, techniciens, doctorants et mastériens, avec qui j'ai passé de très bons moments à Bobo-Dioulasso : Bahili Zoma, Edwige Guissou, Serge Poda, Hermann Pooda, Aminata Fofana, Bienvenu Yameogo, Etienne Bilgo, Hamidou Maiga, Ibrahim Sangaré.

Merci à l'Antenne IRD de Bobo-Dioulasso à travers les Drs Thierry Lefèvre, Nicolas Moiroux, Olivier Roux sur qui j'ai pu m'appuyer à chaque fois que cela était nécessaire ; de même aux personnels administratifs Adama Ouattara et Didier Zio.

A Montpellier, je tiens à remercier Dr Pierre-Yves Vion, le point focal d'Agro Paris Tech pour la facilitation des démarches administratives à l'École Doctorale et à l'université, ainsi qu'à la Banque Islamique de Développement (BID) pour le financement.

Un grand merci à l'Unité Mixte de Recherche MIVGEC-IRD à travers son Directeur Dr Frédéric Simard pour avoir accepté que je fasse cette thèse au sein de son unité.

Mes remerciements vont au personnel administratif de MIVGEC : Valérie Delplanque, Katia Grucker, Audrey Ravat, Julie Pla et Céline Collin pour avoir facilité mes accès et les renouvellements des contrats avec l'IRD Occitanie.

Un grand merci à l'équipe ESV de MIVGEC et particulièrement à Vincent Robert et Florence Fournet qui ont lu et critiqué des chapitres de cette thèse et ont été toujours disponibles dans la

dernière ligne droite de cette thèse ; à Didier Fontenille, Diégo Ayala, Gilbert LeGoff, Nini LeGoff, et Christophe Paupy pour les avis scientifiques et les échanges enrichissants ; à Nicolas Moiroux dont les bureaux de Bobo-Dioulasso puis de Montpellier peuvent témoigner de mes fréquents aller-retours ; à Angélique Porciani-Lemire pour son aide précieuse pour les analyses sur R et ses conseils ; à Bethsabée Scheid, Marie Rossignol, Carole Ginibre et Fabrice Chandre pour l'accès et leur aide lors de mes manip au Vectopole.

A mes collègues de bureau : Frédéric Jourdain, Anaïs Appelgren, David Carrasco, Marie-Marie Olive et Vanina Boué, merci pour les moments de partage.

A mes amis mastériens, doctorants et post-doctorants : Paul Taconet, Cyrille Czeher, Lison Laroche et ceux de *Team Black Excellence* : Ghislain Aka, Michèle Bengue, Aby Cissé, Barnabas Zogo, Dorgeles Dje Kouadio, Bi Zamblé Hubert, Cheick Diagne, Mariano Kpatenon, Mohamed Lemrabott, Lemonde Bouaffou, Dachel Eyenet, Claire Sangbakembi, Ousmane AKone, Michaëlle Touré, Krystel Ngou, Boni Yogom, Branly Effa-Effa, Gaëlle Aline, Cheick Tékété, merci pour ces moments fraternels que nous avons passés ensemble.

Un merci infini à Dr Cédric et Aïcha Pennetier pour m'avoir accueilli chez eux à Grabels (A BARIKA AW YÉ).

Mes remerciements vont à ma famille, particulièrement à ma MÈRE pour ses bénédictions et prières nuits et jours, mes sœurs Sira et Bintou, mon frère Moussa Balla, mes neveux et nièces Mariam, Solo, Cheick, Matou, Oumou, Sira, Ousmane, Soumaila, Djibril et à mes cousins et cousines, Boua, Oumou, Tina.

Un grand merci à mon EPOUSE Zita Habibatou et à ma princesse MaKaba pour leur patience, leur soutien et leur résilience malgré ma longue absence et mes visites furtives.

Enfin, je tenais à dire merci à toute personne m'ayant un jour tenu la main, appris quelque chose ; égayé une de mes journées et cherché à me rendre meilleur qu'hier. A tous ceux et celles que j'ai omis par oubli leurs noms, JE VOUS REMERCIE AUSSI.

TABLE DE MATIERES

DEDIDACE	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DE MATIERES.....	vii
LISTE DES FIGURES	xi
Chapitre 1 et Méthodologie générale	xi
Chapitre 4	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
SIGLES ET ABREVIATIONS	xvi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1	5
Les anophèles vecteurs du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	5
1. Composition du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	6
2. Biologie et écologie des anophèles du complexe <i>An. gambiae</i>	8
3. Activité de vol et cycle d'agressivité des femelles vectrices complexe <i>Anopheles gambiae</i>	16
4. Méthodes de lutte et de prévention contre les piqûres d'anophèles	17
5. Les différentes méthodes et dispositifs de mesure des rythmes d'activité des anophèles .	20
Chapitre 2	25
Changement des rythmes journaliers des insectes face à une pression de sélection.....	25
(Ce chapitre fera l'objet d'un article ultérieurement).....	25
1. Introduction	25
1.1. Rappel des notions	25
1.2. Rôle adaptatif des rythmes circadiens	27
2. Causes des changements des rythmes journaliers	36
2.1. Rappels des principaux facteurs abiotiques pouvant modifier les rythmes journaliers : cycles lumière/obscurité, température, pluviométrie et humidité	36
2.2. Facteurs biotiques pouvant moduler le rythme journalier.....	41
Influence des interactions intra/interspécifiques et de la constitution intrinsèque des insectes sur leurs rythmes journaliers	44
3. Conséquences des changements de rythmes journaliers	46
3.1. Conséquences intrinsèques.....	46

3.2. Conséquences extrinsèques	49
4. Conclusion et perspectives	51
Références	51
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	63
METHODOLOGIE GENERALE.....	64
1. Matériel biologique : les anophèles vecteurs du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	64
2. Matériel d'enregistrement des rythmes circadiens.....	67
3. Dissection et mesure des ailes et des spermathèques	71
4. Analyse des données	74
Chapitre 3	76
Effets de l'insémination sur l'activité locomotrice postprandiale d' <i>Anopheles coluzzii</i> ¹	76
Résumé	77
Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity and endogenous circadian clock of the wild malaria mosquito <i>Anopheles coluzzii</i>	79
Abstract	80
Introduction	81
Materials and methods	84
Results	90
Discussion	98
Conclusion.....	100
Ethics approval and consent to participate	100
Consent for publication	101
Availability Data and materials.....	101
Competing interests.....	101
Funding.....	101
Authors' contributions.....	101
Acknowledgements	101
Authors' information (optional)	102
Supplementary information.....	102
References	102
Chapitre 4	107
Effet de l'allèle de résistance aux insecticides L1014F du gène VGSC (kdr) sur le rythme d'activité d' <i>Anopheles coluzzii</i>	107
Introduction	107
Matériels et méthode	109

<i>Collecte des anophèles</i>	109
<i>Élevage des anophèles à l'insectarium</i>	109
<i>Préparation des tubes pour l'enregistrement</i>	110
Enregistrement de l'activité locomotrice	111
<i>Détermination des statuts d'espèces et de résistance</i>	112
<i>Analyses statistiques</i>	112
Résultats	113
Effet de la mutation KDR sur l'activité totale.....	114
Effet de la mutation KDR sur Activité crépusculaire.....	122
<i>Début de l'activité crépusculaire en LD</i>	122
<i>Début de l'activité crépusculaire en DD</i>	123
Effet de la mutation KDR sur Heure du pic d'activité crépusculaire en régime LD et DD.	123
Discussion	128
Références	130
DISCUSSION GENERALE	135
<i>Changement de comportement en relation avec les insecticides</i>	136
<i>Changement de comportement en relation avec l'état physiologique des moustiques</i>	138
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	141
Conclusion.....	141
Perspectives	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	143
RESUMÉS	153



“Celui qui ne doute pas, ne peut être certain de rien”

Johannes Kepler

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 et Méthodologie générale

<i>Figure 1 : Anopheles gambiae s.l. femelle (à gauche) et mâle (à droite) (Source : Duvallet et al. (2017)</i>	<i>6</i>
<i>Figure 2 : Distribution des espèces du complexe Anopheles gambiae en Afrique (d'après Carnevale & Robert (2009), actualisé)</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3 : Dimorphisme sexuel chez les nymphes d'Anopheles gambiae s.l. Les cercles indiquent la différence entre les genitalia de la femelle (A) et du mâle (B) (Source Photo : M. Fraiture)...</i>	<i>10</i>
<i>Figure 4 : Cycle biologique des anophèles (Source : http://www.biographix.cz/portfolio/schemes-models/life-cycle-of-the-mosquitoanopheles-gambiae/Date de consultation : 17/04/2020).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 5 : Abondance relative des membres du complexe Anopheles gambiae (avec An. coluzzii et An. gambiae anciennement appelées respectivement forme M et forme S) au Burkina Faso (d'après Costantini et al. (2009))</i>	<i>15</i>
<i>Figure 6 : Dispositif d'enregistrement en bouteille (d'après Jones et al. (1967))</i>	<i>21</i>
<i>Figure 7 : Photographie d'un Moniteur d'activité locomoteur (LAM) vide : A) vue de face, B) vu de profil avec un zoom sur le jeu circulaire de sources/détecteurs infrarouge</i>	<i>23</i>
<i>Figure 8 : Schéma d'un Flybox (d'après Araujo et al. (2020))</i>	<i>24</i>
<i>Figure 9 : Carte du Burkina Faso avec les différents sites de collecte des anophèles (Source : Centre Muraz, modifié)</i>	<i>65</i>
<i>Figure 10 : Tubes à hémolyse : A) nu contenant une femelle anophèle ; B) recouvert de ruban adhésif</i>	<i>69</i>
<i>Figure 11 : Photographie d'un Moniteur d'activité locomoteur (LAM) chargé de tubes contenant les anophèles</i>	<i>70</i>

Figure 12 : Schéma du mode d'enregistrement de l'activité de vol locomoteur à l'échelle d'un tube du Moniteur d'activité locomoteur (LAM).....70

Figure 13 : Mesure d'une aile d'An. gambiae s.l. à l'aide du logiciel Image J.....72

Figure 14 : Spermathèque rompue présentant des filaments de spermatozoïdes74

Chapitre 3 – Article 1

Figure 1: Mean activity score (beam-breaks min⁻¹) of Anopheles coluzzii females for each of the four physiological conditions tested under two light regimens (A) Light:Dark 12:12 (LD) (B) Dark-Dark (DD).92

Figure 2: Mean nightly activity predicted by the models (A) under Light/Dark and (B) under Dark/Dark photoperiods. Point correspond to model estimated marginals means and color shades 95% confidence interval.....94

Figure 3: Mean hourly activity during the 3rd night for (A, C) Glucose-fed females and (B, D) inseminated females under LD (A,B) and DD (C, D) photoperiods.95

Figure 4: Mean circadian period lengths ($\pm 95\%CI$) under LD (A) and free-running DD (B) photoperiods. Circles indicate individual circadian periods as identified using chi-square periodograms.96

Figure 5: Onset time (A&C) and time of peak activity (B&D) under both LD and DD photoperiod. Mean $\pm 95\% CI$. Circles indicate individual data.98

Chapitre 4

Figure 1: Courbes brutes de l'activité journalière de vol spontané d'Anopheles coluzzii en régime LD 12 : 12 des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre la moyenne minutaire de l'activité journalière. L'activité locomotrice est mesurée toutes les minutes en continu

pendant toute la période d'enregistrement et correspond au nombre de passages par minute. Le graphique ne met en évidence aucune différence significative de l'activité locomotrice entre les différents génotypes au cours des mois. Les espaces vides (interruptions de courbes) présents aux mois de juillet (July) et d'octobre (October) représentent les périodes d'absence de données due à une coupure d'électricité..... 115

Figure 2: Comparaison des moyennes d'activité journalière de vol spontané en régime LD 12 : 12 entre des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre une différence significative de l'activité locomotrice entre tous les mois chez le génotype homozygote résistant RR à l'exception des mois d'août et septembre en LD ($RR_{RRaoût-septembre} = 1,07 [0,74 - 1,54], p = 0,97$). 116

Figure 3: Courbes brutes de l'activité journalière de vol spontané d'*Anopheles coluzzii* en régime DD des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre la moyenne minutaire de l'activité journalière. L'activité locomotrice est mesurée toutes les minutes en continue pendant toute la période l'enregistrement et correspond au nombre de passage par minute. Le graphique ne met en évidence aucune différence significative de l'activité locomotrice entre les différents génotypes au cours des mois. Les espaces vides (interruptions de courbes) présents aux mois de juillet (July) et d'octobre (October) représentent les périodes d'absence de données due à une coupure d'électricité. 119

Figure 4: Comparaison des moyennes d'activité journalière de vol spontané en régime DD entre des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre une différence significative de l'activité locomotrice entre le génotype homozygote résistant RR et les deux autres SS et RS

pour le mois de juillet (RR.JuilletRS-RR = 2.00 [1,12 - 3,57], p = 0.014 ; RR.JuilletRR-SS = 0,43 [0,22 - 0,85], p = 0,011 ; RR.JuilletRS-SS = 0,86 [0,43 - 0,88], p = 0,87)..... 120

Figure 5: Heures du démarrage de l'activité de vol crépusculaire en régime LD 12 : 12 des trois génotypes. Le graphique montre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Le graphique montre une différence significative entre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire entre le génotype homozygote sensible SS et les deux autres génotypes RR et RS pour les mois de septembre (activité des SS commençant 2,80 min après celle des RR qui commençait à 18:04:50, p = 0.03 et 2,91 min après celle des RS débutant à 18:04:43, p = 0.03) et octobre (activité des SS commençant 2,06 min (p = 0.03) et 2,35 min (p = 0.01) respectivement après de celle des RR commençant à 18:03:36 et des RS débutant à 18:03:19). 124

Figure 6: Heures du démarrage de l'activité de vol crépusculaire en régime DD des trois génotypes. Le graphique montre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative des heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative des heures du démarrage de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes. 125

Figure 7: Heure du pic de l'activité de vol crépusculaire en régime LD 12 : 12 des trois génotypes selon le mois. Le graphique montre les heures du pic l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative de l'heure du pic de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes. 126

Figure 8: Heure du pic de l'activité de vol crépusculaire en régime DD des trois génotypes selon le mois. Le graphique montre les heures du pic l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative de l'heure du pic de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes. 127

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 3

Table 1: Total number n of individuals included in the analysis according to treatment and photoperiod. The "Arrhythmic" column shows the number of individuals in each category that were discarded because they did not display significant rhythmic activity according to chi-square periodograms.91

Chapitre 4

Tableau 1 : Effectifs des génotypes RR (résistants homozygotes), RS (résistants hétérozygotes) et SS (sensibles homozygotes) par mois en régime LD et DD 114

Tableau 2 : Comparaison des ratios d'activité journalière par mois entre les génotypes RR, RS et SS en condition LD..... 117

Tableau 3 : Comparaison des ratios d'activité journalière entre les mois pour un même génotype en condition LD..... 118

Tableau 4 : Comparaison des ratios d'activité journalière par mois entre les génotypes RR, RS et SS en condition DD 121

Tableau 5 : Comparaison des ratios d'activité journalière entre les mois pour un même génotype en condition DD 122

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ace 1 ^R :	Nom du gène codant pour la mutation de l'acétylcholinestérase insensible
ADN :	Acide désoxyribonucléique
An. :	<i>Anopheles</i>
DD :	Dark-Dark (ou cycle d'obscurité constante)
glmmTMB :	Generalized Linear Mixed Models using Template Model Builder
Kdr :	Nom du gène codant pour la mutation du Knockdown résistance du canal sodium voltage dépendant
LAM :	Locomotor Activity Monitor (ou Moniteur d'activité locomotrice)
LD :	Light-Dark (ou cycle lumière obscurité)
MILD :	Moustiquaire imprégnée d'insecticide de longue durée
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
RDL :	Nom du gène codant pour la mutation de la résistance à la dieldrine
RR. :	Rate Ratio (taux)
RR :	Génotype homozygote résistant pour l'allèle kdr
RS :	Génotype hétérozygote résistant pour l'allèle kdr
SS :	Génotype homozygote sensible pour l'allèle kdr
txt :	Extension de nom de fichier pour les fichiers textes en informatique
VGSC :	Voltage-Gated Sodium Channel (ou Canal sodium voltage dépend

INTRODUCTION GENERALE

Notre planète est peuplée de nombreux êtres vivants occupant des espaces variés. Certains vivent uniquement dans les profondeurs marines, sur la terre, en plein air ou dans les grottes. D'autres combinent leur vie entre ciel et terre. Malgré cette grande différence, ils partagent presque tous un point commun, une vie rythmée, conséquence de leur adaptation aux cycles d'alternance de lumière et d'obscurité associés aux mouvements de rotation de la terre autour de son axe et de sa révolution autour du soleil, mais aussi à des variations de leur niche écologique (Luce 1970 ; Aschoff 1989 ; Koukkari & Sothorn 2006). Ainsi, pour maximiser leur chance de survie et de persistance, ils s'adaptent à tout changement à court ou long terme afin d'exploiter au maximum l'environnement dans lequel ils vivent. Cette vie rythmée est soutenue par une horloge biologique interne (Saunders 1982) permettant de réguler les processus physiologiques ou comportementaux chez les êtres vivants selon des périodes variées, certes en fonction du processus biologiques, mais qui dans leur ensemble sont stables. Les anophèles vecteurs à l'instar des autres insectes, présentent un bon nombre d'activités cycliques et circadiennes sous la gouverne d'horloges circadiennes allant de la ponte (Gillett et al. 1961 ; Minis & Pittendrigh 1968 ; Saunders 1982), à la piqûre (Robert et al. 1985) en passant par l'éclosion (Neumann 1986), la mue larvaire et la pupaison (Kyriacou et al. 1990 ; Clements 1999), l'émergence (Kaiser et al. 2011) et l'accouplement (Sawadogo et al. 2013b). Ainsi, la compréhension du comportement des populations vectrices de *Plasmodium* (agent responsable du paludisme) comme les anophèles a été cruciale dans l'élaboration de stratégies de lutte aboutissant, à l'absence de vaccin contre le paludisme humain, à la mise en place d'outils de prévention comme les moustiquaires imprégnées d'insecticides et de la pulvérisation d'insecticide intra domiciliaire (Darriet et al. 1984). En effet, le paludisme est endémique dans 90 pays et responsable chaque année de plus de 400.000 décès dans le monde dont plus de 90% sont concentrés en Afrique au sud du Sahara (WHO 2019). Cette maladie se transmet à travers la piqûre infectante des femelles anophèles, et c'est justement cette piqûre qui entraîne la transmission que les moustiquaires imprégnées cherchent à arrêter. Et depuis la recommandation par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de leur utilisation comme outils de prévention dans les programmes nationaux de lutte contre le paludisme, l'utilisation des moustiquaires imprégnées a contribué à faire chuter le nombre de cas et de décès associés (Schellenberg et al. 2001 ; Binka et al. 2002 ; Bhatt et al. 2015). Mais cette efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide comme moyen

de prévention du paludisme est menacée non seulement par la résistance croissante des moustiques aux insecticides, mais plus récemment par l'apparition d'un changement du comportement de piqûre des moustiques, qui passe de nocturne et endophagique, à crépusculaire et exophagique. En effet, ce changement de comportement leur permet d'éviter le contact avec l'insecticide en piquant de plus en plus à l'extérieur et ou à des heures inhabituelles, c'est-à-dire très tôt en début de soirée ou à l'aube lorsque les populations ne sont pas sous leurs moustiquaires (Russell et al. 2011 ; Moiroux et al. 2012 ; Briet & Chitnis 2013 ; Sherrard-Smith et al. 2019). L'apparition de ces piqûres crépusculaires ou matinales soulève de nombreuses questions et des inquiétudes dû au fait que les bases sous-jacentes de ces changements de comportements ne sont pas connues. Ainsi, le risque de sélection de sous-populations piquant au crépuscule ou à l'aube en réponse à une pression environnementale ne tuant que les populations sensibles à cette pression, est présent. Coluzzi et al. (1979) ont montré que la diversité comportementale au sein du complexe *Anopheles gambiae* était associée à un polymorphisme génétique intra spécifique. De même, Smits et al. (1996) soutiennent chez *An. gambiae* s.s. l'hypothèse d'une structuration comportementale, c'est-à-dire que le choix du lieu de piqûre ou de repos est associé à une variation génétique. Si l'effet des facteurs abiotiques comme la température et les cycles jour-nuit a été montré à de multiples reprises sur les modifications du rythme journalier, très peu d'études se sont intéressées aux facteurs biotiques tels que le portage de pathogènes et encore moins à la constitution ou à la physiologie des insectes et de leur conséquence surtout chez les insectes d'intérêt médical. Dans le cas des anophèles vecteurs de parasites du paludisme, l'étude du comportement de piqûre est un élément clé de la transmission et de la propagation de la maladie (Macdonald 1957). Ainsi, les changements de comportements de piqures rapportés dans de nombreux pays (Russell et al. 2011 ; Moiroux et al. 2012 ; Briet & Chitnis 2013 ; Sherrard-Smith et al. 2019) avec les distributions universelles de moustiquaires imprégnées d'insecticides méritent une attention particulière de la communauté des chercheurs. Par conséquent, nous proposons à travers cette présente thèse de déterminer les bases génétiques, physiologiques et environnementales des rythmes journaliers d'activité chez les anophèles vecteurs des parasites du paludisme. Ainsi, cette thèse, après une introduction, s'articulera en deux parties. La première partie présentera de manière synthétique les anophèles vecteurs du *Plasmodium* en Afrique, et à travers une revue de littérature l'état des connaissances scientifiques sur les principaux changements de rythmes journaliers chez les insectes face à une pression de sélection, leurs causes et les conséquences éventuelles. Dans la seconde partie, après la présentation de la méthodologie

générale, nous exposerons les résultats de nos études expérimentales réalisées en condition de laboratoire à travers deux articles. Le premier, porte sur l'effet des statuts d'insémination et de réplétion sur le rythme d'activité circadien d'*Anopheles coluzzii* femelle vecteur du parasite du paludisme et le second sur l'effet du portage du gène KDR sur le rythme d'activité circadien des anophèles femelles vecteurs du *Plasmodium* au Burkina Faso avant de discuter de leurs apports dans la compréhension des changements du rythme d'activité locomotrice en général et dans les changements de comportements de piqûre en particulier.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Les anophèles vecteurs du complexe *Anopheles gambiae*

L'étude des vecteurs du complexe *An. gambiae* a pris de l'importance depuis la mise en évidence du rôle des moustiques anophèles comme vecteurs biologiques dans la transmission du *Plasmodium* (agent responsable du paludisme) par Ronald Ross (Ross 1897) en Inde et Battista Grassi en Italie (Grassi et al. 1899). De plus, leur intérêt médical est aussi dû au fait qu'en dehors du paludisme, ils sont impliqués dans la transmission de plusieurs autres pathogènes comme la filaire de Bancroft (Lamontellerie 1972 ; Brengues 1975 ; Appawu et al. 2001 ; Boakye et al. 2004), des virus (Corbet et al. 1961 ; Gratz 1999 ; Lutwama et al. 1999 ; Brault et al. 2004) dont certains peuvent être co-transmis avec le *Plasmodium* (Kelly-Hope et al. 2006 ; Rao et al. 2009 ; Manguin et al. 2010 ; Derua et al. 2012).

Les anophèles appartiennent au règne animal, à l'embranchement des Arthropodes, au sous-embranchement des Mandibulates, à la classe des Insectes, à la sous-classe des Ptérygotes (Holométaboles), à l'ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et aux trois genres *Anopheles*, *Bironella* et *Chagasia*. Il existe plus de 440 espèces d'anophèles dans le monde dont une soixantaine sont impliquées dans la transmission d'agents de maladies humaines ou animales (Harbach 2004). L'alimentation sanguine des anophèles a essentiellement lieu la nuit, juste après le coucher du soleil et jusqu'à l'aurore (Hamon 1963). L'intensité de la transmission dépend des facteurs liés au parasite, au vecteur, à l'hôte humain et à l'environnement. Le sang ingéré par les femelles est principalement utilisé pour la production des œufs même s'il y a des évidences que le repas de sang peut aussi servir de source d'énergie (Clements 1999). Il existe des pics de piqûre ou pics d'agressivité à une ou plusieurs périodes au cours de la nuit. Ces pics de piqûre, en général identiques au sein d'une même espèce, sont toutefois variables entre des espèces différentes. Ainsi, Hamon (1963) relevait que chaque espèce de moustiques possède un cycle nocturne d'activité qui lui est propre et qui est probablement sous la dépendance de nombreux facteurs endogènes et exogènes, le plus important d'entre eux semblant être l'intensité lumineuse. En ce qui concerne les vecteurs du complexe *Anopheles*

gambiae classés parmi les principaux vecteurs de la transmission du paludisme en Afrique (Gillies & Coetzee 1987), le cycle d'agressivité est constant dans toute l'Afrique continentale. Leur activité journalière est nulle, et augmente de manière continue du crépuscule jusqu'à peu avant l'aube, avec, à ce moment moment-là un arrêt presque complet de l'activité (Hamon 1963).



Figure 1 : *Anopheles gambiae* s.l. femelle (à gauche) et mâle (à droite) (Source : Duvallet et al. (2017))

1. Composition du complexe *Anopheles gambiae*

La majorité des espèces anophèles vecteurs de *Plasmodium* sont membres d'un complexe ou d'un groupe d'espèces jumelles (Sinka et al. 2010). En Afrique, plusieurs vecteurs majeurs du paludisme appartiennent au complexe *An. gambiae* (Gillies & Coetzee 1987 ; Sinka et al. 2010). Décrite en 1902 par Giles, l'espèce *Anopheles gambiae* a longtemps été pensée comme unique espèce jusqu'à la découverte de l'existence d'une forme d'eau saumâtre puis de deux formes d'eau douce pour la première fois à partir de croisements entre des souches résistantes à la dieldrine et des souches sensibles de cette espèce provenant du Nigeria dans des études sur le mode de transmission de la

résistance (Davidson 1956). Depuis cette époque, des études ont tenté de d'identifier les différentes formes d'*An. gambiae*. Ainsi, les premiers travaux de description des différentes formes d'*An. gambiae* vont permettre d'établir l'existence de deux (Davidson 1956) à plusieurs formes (Davidson 1962 ; Davidson & Jackson 1962), et plus tard celle d'un complexe d'espèces (Paterson 1963 ; Davidson 1964). Depuis, plusieurs membres ont été ajoutés au complexe grâce à la mise au point de nouvelles techniques d'identification de cytogénétique se basant sur les inversions chromosomiques dans les chromosomes polytènes (Coluzzi & Sabatini 1967, 1968, 1969 ; Davidson & Hunt 1973), ou de biologie moléculaire (Scott et al. 1993 ; Favia et al. 1997) jusqu'à atteindre huit espèces cryptiques avec à la clé des espèces renommées (Coetzee et al. 2013). Récemment, un nouveau membre de ce complexe a été découvert au Gabon (Barron et al. 2019), laissant penser que d'autres espèces de ce complexe restent à découvrir à cause des échanges de gènes (flux de gènes) et des introgressions entre les hybrides et les membres du complexe. Cette récente découverte porte actuellement à neuf le nombre des membres du complexe *An. gambiae* :

- *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013
- *An. arabiensis* Patton, 1904
- *An. bwambae* White, 1985
- *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013
- *An fontenillei* Barrón, Paupy & Rahola, 2019
- *An. gambiae* Giles, 1902
- *An. melas* Theobald, 1903
- *An. merus* Dönitz, 1902
- *An. quadriannulatus* Theobald, 1911.
- Les principaux vecteurs du complexes *An. gambiae* sont : *An. arabiensis* Patton, 1904 ; *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 ; *An. gambiae* Giles, 1902.

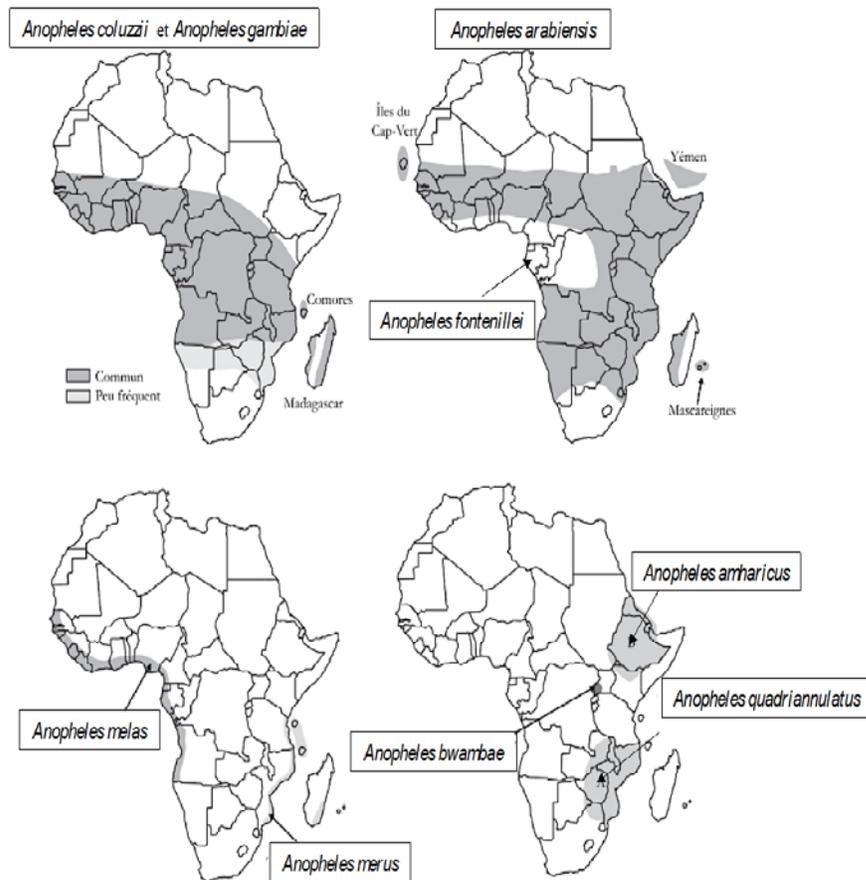


Figure 2 : Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* en Afrique (d'après Carnevale & Robert (2009), actualisé)

2. Biologie et écologie des anophèles du complexe *An. gambiae*

La bioécologie des membres du complexe *An. gambiae* est semblable à celle des autres anophèles avec de légères variations propres à chaque espèce. Cette bioécologie est liée au cycle de vie des anophèles et se divise en deux grandes phases : la phase aquatique regroupant les stades jeunes ou préimaginaux (œufs, larves et nymphes), et la phase aérienne pour les adultes (imagos).

2.1. Morphologie des anophèles

2.1.1. Morphologie des stades préimaginaux (aquatiques)

Morphologie des œufs

Les anophèles sont des espèces ovipares. Les femelles après l'accouplement et la prise d'un repas de sang diminuent grandement leur activité de vol afin de digérer le repas de sang et permettre par l'apport des protéines contenues dans celui-ci, la maturation des œufs. Pondus un à un à la surface de l'eau, les œufs flottent individuellement grâce à la présence de flotteurs latéraux (qui appartiennent à la couche la plus externe de la coquille de l'œuf, ou chorion) rempli d'air (Mullen & Durden 2002). Les œufs sont de couleur blanche juste après la ponte, puis ils noircissent. Une femelle anophèles peut pondre entre 50 et 200 œufs en une seule ponte (Carnevale & Robert 2009). D'environ 0,16 mm x 0,48 mm (Holstein 1952), les œufs sont de forme allongée et ovoïde. Les œufs d'anophèles sont très sensibles à la chaleur, à la dessiccation et au froid (Rodhain & Perez 1985 ; Mullen & Durden 2002 ; 2017). Les œufs éclosent généralement au bout de 48 à 72 heures en milieu tropical. Cependant, la durée de l'éclosion peut varier selon la température du milieu (Holstein 1952).

Morphologie des larves

Après l'éclosion, les œufs libèrent les larves qui passent par quatre stades. Les larves des quatre stades se ressemblent beaucoup à part leur taille qui augmente progressivement entre le premier et le quatrième stade. La larve est composée trois parties (la tête, le thorax et l'abdomen) comme les adultes à la seule différence que les pattes sont absentes. La tête porte les pièces buccales, des antennes primitives et des soies (Rodhain & Perez 1985) Le thorax est formé d'une masse aplatie dorso-ventralement, comportant trois segments non individualisés avec des soies symétriques servant à les différencier d'avec d'autres espèces. L'abdomen est formé par neuf segments dont les sept premiers sont semblables et diffèrent des deux restants sur le plan ornemental. Le huitième segment porte deux orifices respiratoires appelés stigmates. Les huit premiers segments sont toutefois alignés et forment avec le 9ème (segment anal) un angle. Au repos, les larves d'anophèles se différencient des larves des autres culicidés par leur position parallèle à la surface de l'eau (face ventrale vers le bas). Les larves se nourrissent de micro-organismes végétaux et animaux. La durée de vie larvaire dans les conditions favorables varie entre 6 et 8 jours à l'issue de laquelle les larves

de stade quatre (dernier stade) effectuent une mue particulière appelée nymphose et deviennent des nymphes aquatiques mobiles (Holstein 1952).

Morphologie des nymphes

La nymphe constitue le dernier stade immature avant la vie adulte. Elle a une forme de virgule et est composée de deux parties, le céphalothorax et l'abdomen qui est recourbé. Toute la nymphe est à l'intérieur d'une membrane. A travers cette membrane, il est possible d'observer les yeux et les ailes. Deux trompettes respiratoires fixées sur le céphalothorax permettent une respiration aérienne de la nymphe (Carnevale & Robert 2009). A ce stade, l'abdomen comporte huit segments qui sont terminés par deux palettes natatoires en-dessous desquelles se trouvent les *genitalia* mâles (longs) ou femelles (plus courts). Durant ce stade, la nymphe ne se nourrit pas. Elles sont la plupart du temps immobiles. Le stade nymphal dure 1 à 2 jours puis commence l'émergence. Au moment de l'émergence, la cuticule de la nymphe se fend dorsalement et longitudinalement au niveau du céphalothorax par une pression du futur anophèle adulte qui commence sa sortie par le scutum thoracique. A la fin de l'émergence, l'imago reste à la surface de l'eau afin, de déployer complètement puis sécher ses ailes avant de prendre son envol. Cette phase est critique chez les moustiques à cause d'une forte mortalité par noyade et par l'action des prédateurs.

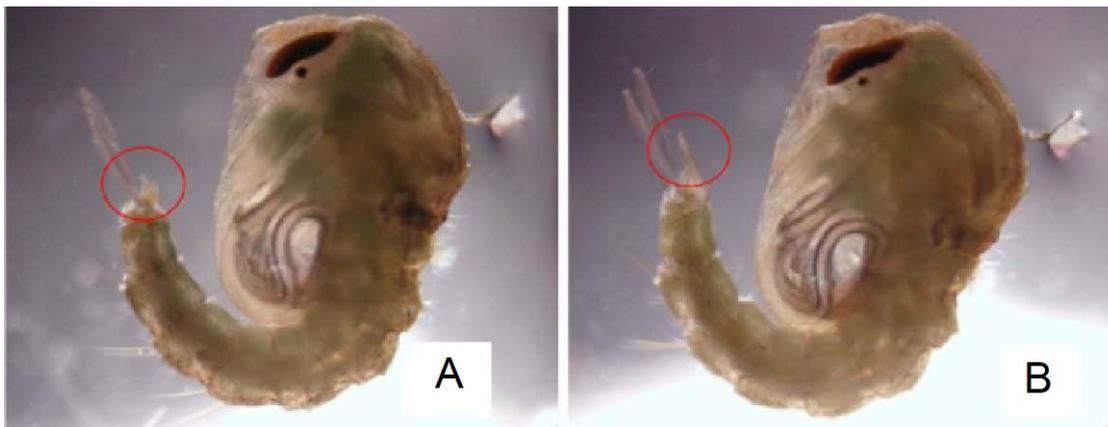


Figure 3 : Dimorphisme sexuel chez les nymphes d'*Anopheles gambiae* s.l. Les cercles indiquent la différence entre les genitalia de la femelle (A) et du mâle (B) (Source Photo : M. Fraiture)

2.1.2. Morphologie des adultes

Les anophèles adultes sont minces, avec des pattes fines et des ailes étroites et allongées. Le corps des anophèles adultes est composé de trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen, et est recouvert d'écailles, de soies et de fines soies, créant les marques et les couleurs caractéristiques à chaque espèce (Mullen & Durden 2002). Les adultes ont une position de repos oblique par rapport au support formant un angle autour de 45°.

Tête

C'est la section antérieure du corps de l'anophèle, portant deux yeux composés de nombreuses ommatidies, une paire d'antennes fixée sur le front entre les deux yeux, longues, filamenteuses et présentant un dimorphisme sexuel (soies nombreuses, longues et « plumeuses » chez le mâle ; rares, courtes et « glabres » chez la femelle), un proboscis (ou trompe) constitué par l'ensemble des pièces buccales, une paire de palpes ayant à peu près la même longueur que la trompe. La tête est séparée du thorax par le *cervix* (cou).

Thorax

Deuxième division ou division intermédiaire du corps de l'anophèle, l'abdomen se subdivise en trois segments soudés : pro, méso et métathorax portant chacun une paire de pattes minces. Chaque patte comporte cinq parties : la coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse qui est composé de cinq articles appelés tarsomères. Le premier tarsomère est le plus proche du tibia et le plus long tandis que le tarsomère terminal est le plus court et porte une paire de griffes enserrant deux pulvilles et une soie médiane appelée *empodium*. Chaque patte est recouverte d'écailles et proche l'une de l'autre sur la face inférieure du thorax par la *coxa* ou hanche (Rodhain & Perez 1985). Le thorax constitue l'unité locomotrice unique, relativement rigide et remplie de muscles, dont la segmentation est obscurcie. Les ailes permettant à l'anophèle de voler sont étroites, présentent un motif de nervures distinctif et portent des écailles le long des nervures et du bord postérieur, ce dernier formant une frange. Juste derrière les insertions des ailes est située une paire de minuscules ailes postérieures modifiée, appelée haltères ou balanciers qui sont utilisées pour le contrôle et l'ajustement du vol (Mullen & Durden 2002 ; Carnevale & Robert 2009).

Abdomen

Chez les moustiques adultes, l'abdomen est la (troisième) partie postérieure du corps. De forme cylindrique, il est constitué de dix segments dont sept sont bien visibles (Mullen & Durden 2002). Les segments abdominaux 5 à 8 sont progressivement plus petits, de sorte que l'abdomen s'amincit vers l'extrémité postérieure. Chaque segment comporte une partie dorsale (tergite) et une partie ventrale (sternite) reliées entre elles par une zone membranaire (pleurite) permettant l'expansion de la paroi abdominale lors de la prise de gros repas de sang ou de liquide sucré mais aussi lors du développement des œufs pour la ponte. Le segment 9, très petit, porte chez la femelle le *cerci* et le lobe postgénital, et chez le mâle les crochets et autres structures génitales, ou *terminalia*.

2.2. Cycle de vie des anophèles

Divisé en deux parties aquatique et aérienne, le cycle de vie des anophèles est un élément clé dans le contrôle des anophèles vecteurs. Les femelles anophèles comme beaucoup de culicidés pondent généralement à la tombée de la nuit. Les œufs, sont pondus individuellement. Chaque œuf va générer une larve d'environ 1 mm (Rodhain & Perez 1985) au bout de 48 à 72 heures. Les larves vont passer au stade suivant en augmentant de taille presque tous les deux jours jusqu'à atteindre le stade quatre où elle se nourrissent beaucoup plus avant de subir une métamorphose pour devenir des nymphes. Au bout d'un à deux jours, de la nymphe émerge un adulte qui après un court instant à la surface de l'eau (pour sécher son corps et déployer ses ailes), s'envole pour prendre un repas sucré à base de nectar qui lui servira de source d'énergie. Le temps entre la ponte des œufs et l'émergence des adultes dure une dizaine de jours et est positivement corrélé avec la température jusqu'à certaines valeurs critiques. Le développement complet de l'adulte varie selon qu'il soit un mâle (3 jours nécessaires post-émergence pour le bon fonctionnement des organes reproducteurs, qui opèrent une rotation définitive de 180° avec l'extrémité abdominale) ou une femelle (2 à 3 jours) (Carnevale & Robert 2009). Le mâle passera le reste de sa vie entre la formation d'essaims avec d'autres mâles au crépuscule et la recherche de repas sucré. Les femelles matures (dont le corps est développé) sont attirées par les essaims grâce aux stimuli d'ordre optique, olfactif (phéromones) et auditif dégagées par les mâles (Carnevale & Robert 2009). Une fois à l'intérieur de l'essaim, la femelle choisit un mâle pour s'accoupler. Les femelles anophèles copulent en général une seule fois au cours de leur vie même si des femelles ont été retrouvées inséminées par des spermatozoïdes de mâles différents (Tripet et al. 2003). Au cours de l'accouplement, la femelle

recueille les spermatozoïdes du mâle dans une poche appelée spermathèque où ils seront stockés et utilisés lors de la fécondation. Après l'accouplement, la femelle cherche un repas de sang indispensable à la maturation des œufs. Après la prise de sang, la femelle, alourdie, va se reposer afin de digérer le sang le repas et faciliter la maturation des œufs. Une fois gravide, la femelle sort au crépuscule pour la recherche d'un gîte afin de pondre ses œufs. Un nouveau cycle peut donc reprendre. La femelle ayant pondu va passer le rester de sa vie entre la recherche d'un hôte pour la prise de son repas de sang, la digestion et la ponte ; ce nouveau cycle est appelé cycle gonotrophique. Il dure trois à cinq jours chez les femelles nullipares et de deux à trois jours chez les pares (Robert & Carnevale 1984).

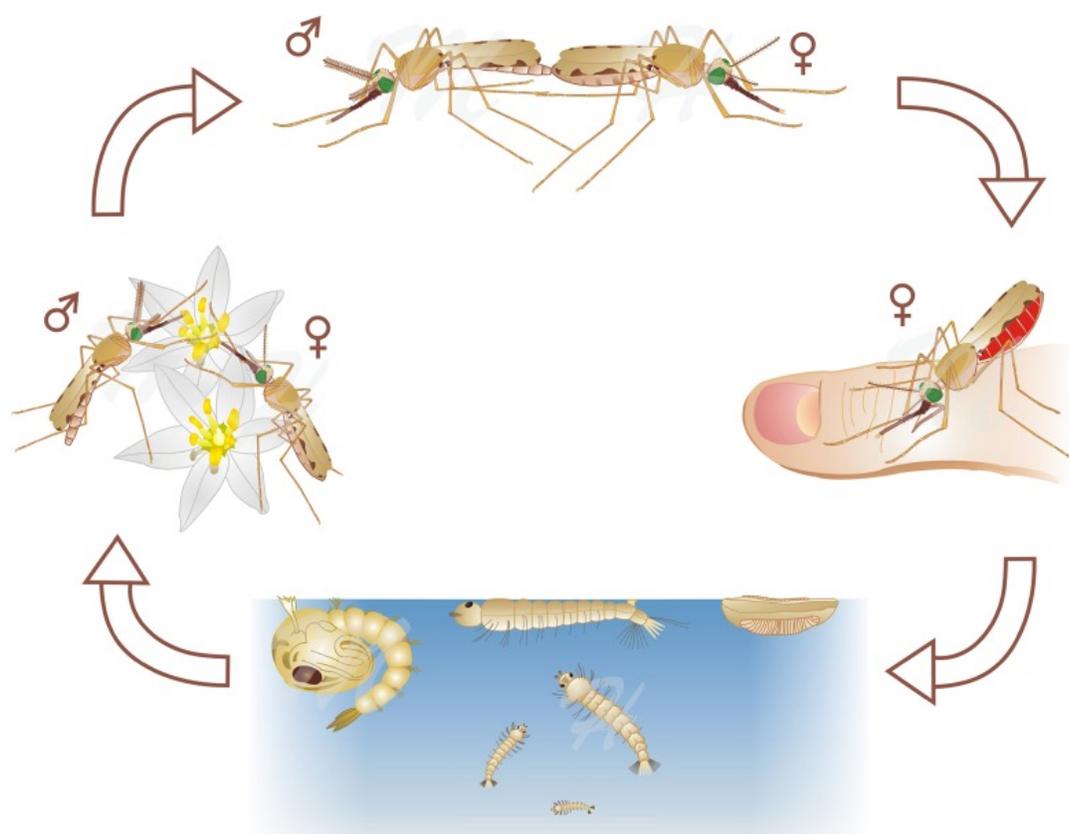


Figure 4 : Cycle biologique des anophèles (Source : <http://www.biographix.cz/portfolio/schemes-models/life-cycle-of-the-mosquitoanopheles-gambiae/>Date de consultation : 17/04/2020)

2.3. Écologie des anophèles vecteurs du complexe *An. gambiae* au Burkina Faso

Le Burkina Faso, situé en Afrique occidentale, est un pays intertropical à caractère soudano-sahélien. Il est constitué d'un réseau hydrographique important constitué de trois bassins

principaux (Volta noire, appelée Mouhoun au Burkina Faso, Comoé et Niger). Le climat est de type sahélien dans le Nord et soudanais dans le reste du pays. De novembre jusqu'en mars s'étend une saison sèche et fraîche, durant laquelle souffle l'harmattan, vent originaire du Sahara, qui se caractérise par une grande amplitude thermique entre le jour et la nuit. De mars jusqu'en mai règnent chaleur et humidité. Le niveau des pluies (commençant en juin) varie de plus de 1 300 mm dans le Sud-Ouest, région la plus productive du pays, à moins de 254 mm dans le Nord. L'amplitude thermique est élevée dans le Nord (15 à 45 °C) ; ailleurs, les températures varient de 21,1 à 36,7 °C.

Anopheles arabiensis, *An. coluzzii* et *An. gambiae* font partie des six vecteurs majeurs de *Plasmodium* humain, les plus anthropophiles et plus répandus en Afrique. Ces trois espèces constituent un système vectoriel extrêmement efficace à cause de leur adaptation rapide et facile aux modifications de l'environnement causées par l'homme (Coluzzi et al. 1979 ; Simard et al. 2009). Même si elles peuvent vivre en sympatrie, ces espèces présentent tout de même des préférences écologiques (contribuant à un isolement reproductif) qui peuvent être utilisées pour les "différencier".

Au Burkina Faso, ces trois principaux vecteurs de *Plasmodium* sont présents, vivent en sympatrie mais sont inégalement réparties sur l'ensemble du territoire (Coz 1973a, 1973b ; Costantini et al. 2009) comme observé dans la plupart des milieux arides de l'Afrique de l'Ouest (Coluzzi et al. 1979 ; Toure et al. 1994, 1998 ; Coluzzi 1999).

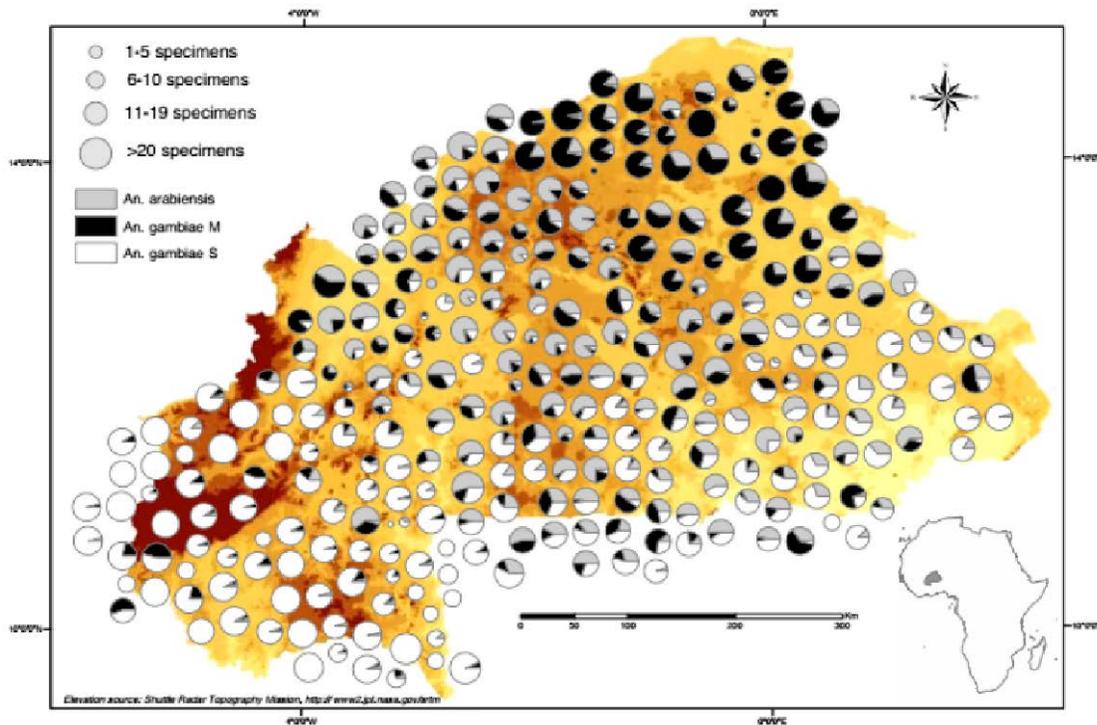


Figure 5 : Abondance relative des membres du complexe *Anopheles gambiae* (avec *An. coluzzii* et *An. gambiae* anciennement appelées respectivement forme M et forme S) au Burkina Faso (d'après Costantini et al. (2009))

2.3.1. *Anopheles arabiensis*

Anopheles arabiensis est un moustique de savane exploitant des mares temporaires dans les zones de savane et les villages situés loin du périmètre des rizières. Son type d'habitat préféré est généralement dépourvu de végétation, indiquant une préférence pour des habitats aquatiques temporaires simples dépendant de la pluie (Gimonneau et al. 2012). Il est plus répandu dans le nord-ouest et sur le plateau central du Burkina Faso entre 11°30'N et 13°30'N avec une diminution de son abondance lorsqu'on s'éloigne de cette zone (Costantini et al. 2009). Dans la partie du sud-ouest du Burkina Faso comme Bobo-Dioulasso, *An. arabiensis* est beaucoup plus présente vers le mois d'août correspondant à la fin de saison des pluies (Diabate et al. 2002). *Anopheles arabiensis* s'adapte bien aussi à différents contextes anthropiques (Gimonneau et al. 2012) et a été récemment trouvée dans des gîtes larvaires pollués des zones périurbaines et urbaines (Fournet et al. 2010). A l'échelle du pays, elle est l'espèce la mieux représentée du complexe au Burkina (49,2%) d'après une étude réalisée par Costantini et al. (2009).

2.3.2. *Anopheles coluzzii*

Au Burkina Faso, *Anopheles coluzzii* domine dans les zones arides les plus septentrionales et ses larves sont plus répandues dans les grands gîtes anthropiques tels que les lacs artificiels et les rizières, et de longue durée (Diabate et al. 2005 ; Costantini et al. 2009) avec des plantes flottantes (Gimonneau et al. 2012). Elle est bien adaptée aux conditions anthropiques.

2.3.3. *Anopheles gambiae*

L'espèce *Anopheles gambiae* est généralement plus abondante dans les régions méridionales plus humides. Elle est principalement retrouvée dans les zones de savane et prédomine dans les petits habitats éphémères tels que les flaques d'eau et les carrières qui sont fortement dépendant de la pluie (Diabate et al. 2005 ; Costantini et al. 2009 ; Gimonneau et al. 2012).

3. Activité de vol et cycle d'agressivité des femelles vectrices complexe *Anopheles gambiae*

3.1. Activité de vol

En condition naturelles, les vecteurs du complexe *Anopheles gambiae* présentent tous une activité essentiellement nocturne (avec un repos en journée) et la lumière semble avoir un effet inhibiteur. De plus, cette activité a été montrée comme étant sous la gouverne d'une horloge endogène circadienne (Jones et al. 1967, 1972a, 1972b, 1974a ; Jones & Gubbins 1977). Cependant il faut noter tout de même l'existence de certaines activités diurnes qui sont certes brèves mais vitales pour l'anophèle ; ces activités se résument généralement au premier vol après l'émergence pour quitter le gîte, rechercher le repas sucré et s'abriter. L'activité de vol varie selon le sexe, l'état physiologique et nutritionnel de l'anophèle et serait probablement associée normalement à un comportement de recherche de partenaire sexuel, d'hôte ou, une fois que les moustiques se sont nourris de sang, de gîte repos ou de ponte. Chez les mâles, l'activité de vol se résume essentiellement à la recherche de partenaire sexuel dans les essaims, de repas de jus sucré et de gîte de repos (Jones et al. 1974a). A la différence des mâles, l'activité chez les femelles varie énormément selon que la femelle soit vierge, inséminée, gorgée ou gravide (Jones & Gubbins 1977, 1978). Ainsi chez les femelles vierges, l'activité de vol se résume soit à la recherche d'un essaim pour l'accouplement, suivie de la recherche du repas de sang ou vice-versa alors que chez les

femelles inséminées, la recherche de partenaire sexuel est exclue. Quant aux femelles gorgées, leur activité quotidienne est presque nulle ; la femelle diminue drastiquement son activité nocturne suivant les deux à trois jours après la prise de repas de sang (Jones & Gubbins 1978). Une fois gravide, l'activité reprend progressivement, ce qui a été suggérée par Jones & Gubbins (1978) comme une recherche de gîtes de ponte, et après la ponte comme une recherche de nouveau repas de sang.

3.2. Cycle d'agressivité sur les hôtes humains

L'agressivité ou comportement de piqûre est une composante de l'activité de vol de des femelles anophèles et a essentiellement lieu pendant la nuit (Haddow & Ssenkubuge 1962). Chez les anophèles vecteurs du complexe *Anopheles gambiae*, elle commence juste après le coucher du soleil vers 18 heures, pour croître au cours de la nuit, atteindre son maximum au cours de la seconde partie de la nuit entre 1 heure et 3 heures et décroître rapidement ensuite pour cesser avant lever du soleil à 6 heures (Hamon 1963). Sa bonne compréhension est à la base des méthodes et outils de prévention contre les piqûres. L'agressivité tout comme l'activité de vol varient aussi chez les femelles selon leur état physiologique. Ainsi, les femelles nullipares ou unipares piquent préférentiellement en début de nuit et les multipares au cours de la seconde moitié de la nuit (Carnevale & Robert 2009).

4. Méthodes de lutte et de prévention contre les piqûres d'anophèles

Le *Plasmodium*, parasite du paludisme humain est principalement transmis par l'anophèle, ce qui sous-entend que sans piqûre de moustique, il n'y a pas transmission de parasite, voire pas de cas de paludisme autochtone. Ainsi la plupart des mesures de lutte contre les anophèles vecteurs consiste soit à tuer ces derniers, soit à empêcher leur contact avec leurs hôtes ou les deux à la fois. Ces méthodes vont donc concerner les deux stades de vie du moustique (prémaginaires et adultes) et exigent nécessairement des connaissances extrêmement poussées et pluridisciplinaires dans les domaines de l'écologie et l'éthologie des vecteurs, de la génétique, de la biologie et des mathématiques. Les principales méthodes de lutte peuvent se résumer en trois types à savoir physique, chimique, biologique/génétique.

4.1. Méthodes de lutte physique

Elles visent généralement à la suppression intentionnelle par l'aménagement des habitats des stades imaginaires avec pour objectif d'empêcher l'obtention des adultes, ou chez les adultes d'empêcher leur contact avec les hôtes humains. Chez les stades aquatiques, les principales techniques sont :

- **le comblement** qui consiste à remplir par le biais de pierres, de sable ou autres débris les collections d'eau ou des emplacements creux pouvant servir de gîtes aux larves d'anophèle ;
- **le drainage** permettant d'évacuer les eaux pouvant servir de gîte à l'aide d'un drain vers des récepteurs naturels tel que les fleuves, les mers, les cours d'eau ou à défaut vers des terres perméables pour absorber rapidement ces eaux avec pour objectif final d'entraîner les œufs et les larves vers des milieux défavorables à leur développement pour les éliminer rapidement ;
- **la mise en boîte des eaux** qui consiste à regrouper les eaux de gîtes potentiels vers un grand bassin afin d'empoisonner cette grande collection d'eau grâce à des larvicides tout en limitant par ce fait la surface à empoisonner.

En ce qui concerne la lutte physique chez les adultes, elle consiste en l'utilisation de moustiquaires et ou d'écrans de fenêtres pour empêcher tout contact entre l'Homme et les anophèles.

4.2. Méthode de lutte chimique

Ce sont de loin les méthodes les plus utilisées et les plus visibles avec des outils phares comme la moustiquaire imprégnée d'insecticides (qui est aussi une méthode de lutte physique) et la pulvérisation intra domiciliaire (PID ou aérosol à usage individuel) à côté desquelles se trouvent les serpentins fumigènes et autres répulsifs (lotion, crème, savon). Si différents insecticides sont utilisés depuis l'abandon du DDT, ils appartiennent presque tous à la famille des pyréthrinoïdes à cause d'un risque de toxicité très faible de ces derniers sur les mammifères. Cependant, avec l'avènement des résistances de plus en plus fréquentes des anophèles aux pyréthrinoïdes, les recherches se tournent vers de nouvelles familles dont la plus connue est celle des carbamates. Dans cette méthode de lutte, l'insecticide est généralement pulvérisé sur un support (mur, moustiquaire, supports), ou dans l'air s'il s'agit d'un espace clos, ou ajouté au matériau de protection dès la synthèse de ce dernier. En plus des moustiquaires imprégnées d'insecticides, il

existe d'autres supports imprégnés tels que les rideaux, les plastiques ou les écrans. Les insecticides utilisés dans la lutte chimique sont dotés de propriétés insecticides et ou répulsive.

4.3. Méthodes de lutte biologique

Ces méthodes ciblent principalement les stades aquatiques des anophèles (œufs, larves et nymphes) en introduisant dans leur biotope leurs prédateurs naturels comme des poissons (*Gambusia affinis* et *Tilapia azillui*) pour les gîtes permanents ou des micro-organismes telles les bactéries (*Bacillus sphaericus* ; *Bacillus thuringiensis* ; *Clostridium bifermentans*) ou des champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium pingshaense*) qui produisent des toxiques très spécifiques. Il faut retenir que les méthodes de lutte biologique sont proposées dans les nouvelles stratégies de lutte intégrées face à la résistance de plus en plus grandissante des vecteurs aux insecticides utilisés dans la confection des moustiquaires imprégnées et dans les aspersion intra domiciliaires

4.4. Méthodes de lutte génétique

La lutte génétique a connu un grand intérêt avec la conception de moustiques génétiquement modifiés (Davidson 1969a, 1969b ; Davidson et al. 1970) dans les années 60 en lien avec la découverte de nombreuses techniques de biologie moléculaire, de chimie, de biochimie et de progrès dans la génétique. Depuis peu, elle revient en force avec la promotion pour le développement de nouveaux outils pour compléter les programmes de contrôle et de prévention classiques. Le concept de la lutte génétique est basé sur la manipulation du patrimoine génétique du moustique afin de supprimer, modifier ou insérer des gènes ou famille de gènes afin d'obtenir des moustiques transgéniques qui peuvent perdre certaines capacités (stériles), en acquérir d'autres (moustiques réfractaires aux parasites) ou qui présentent une disproportion dans le ratio entre les sexes (*Gene drive* qui entraînerait l'élimination de l'espèce cible dans certaines régions et sa suppression dans d'autres) (North et al. 2019). Jusque-là, la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme reste expérimentale à de petites échelles et n'a pas encore été utilisée dans des programmes de lutte antivectorielle de grande envergure.

5. Les différentes méthodes et dispositifs de mesure des rythmes d'activité des anophèles

Le principe général de la mesure du rythme d'activité d'un anophèle consiste à détecter si ce dernier se déplace (vole) ou pas au cours d'un laps de temps d'observation allant de la minute à plusieurs jours et à des intervalles de temps réguliers générant ainsi une variable de type binaire (0 pour absence de mouvement et 1 pour mouvement). Avec le développement des méthodes automatiques d'enregistrement de l'activité de vol des insectes lié généralement à des connaissances continues sur les rythmes circadiens, il existe de nombreuses méthodes d'enregistrement des rythmes d'activité chez les anophèles qui peuvent être acoustiques (Jones 1964 ; Jones et al. 1967), infrarouge (Rund et al. 2012), photographiques ou par vidéo (Araujo et al. 2020). Ces méthodes ont toutes été inventées dans le but non seulement de soulager des expérimentateurs (humains) d'une observation continue lors des tests étalés sur plusieurs jours et nuits, ce qui, outre l'inconvénient évident de l'ennui, introduit des sources d'erreurs possibles, mais aussi d'éviter les biais dans l'activité (influences) dus à la présence même de l'observateur (Jones 1964). Ces méthodes permettent une surveillance constante et procurent des enregistrements fiables avec un instrument d'écriture automatique de l'activité locomotrice (Jones 1964).

5.1. Mesures par actographe acoustique (Jones et al. 1967)

Le développement de l'actographe acoustique pour la mesure du rythme d'activité découle de l'observation selon laquelle les anophèles lors de leur vol émettent des sons dus à la vibration créée par le battement de leurs ailes. Ces sons pourraient mieux caractériser l'activité de vol locomoteur de ces derniers (Jones 1964). L'actographe acoustique (Fig. 6) est simplement constitué d'une chambre d'enregistrement fabriquée à partir de la moitié supérieure d'une bouteille de 200 ml bouchée contenant l'anophèle. Un morceau de papier filtre avec une fine feuille de polyéthylène à l'extérieur forme le fond de cette chambre séparant ainsi le moustique du haut-parleur de 35 ohms de 2,5 pouces qui sert de microphone. Un petit tube de verre contenant une solution sucrée, muni d'une "mèche" en coton, sert de réserve de nourriture et maintient une humidité relative d'environ 80 % dans la chambre. La feuille de polyéthylène empêche l'humidité d'affecter le "microphone". Les moustiques pouvaient survivre pendant au moins une semaine dans ces chambres sans effets néfastes apparents. Une chambre similaire mais vide était utilisée dans les expériences comme contrôle contre les bruits extérieurs qui pourraient activer l'appareil. La chambre d'enregistrement

était placée dans un “nid” de coton à l’intérieur d’une première boîte cubique en bois (petite boîte) avec un couvercle en plexiglas. Cette boîte était ensuite placée à l’intérieur d’une boîte cubique similaire (boîte moyenne) doublée d’un absorbant acoustique. La boîte moyenne était enfin placée dans une boîte plus grande, étanche à la lumière extérieure et revêtue d’un matériau insonorisant, dans une pièce à température constante de 25° C. La grande boîte était éclairée par une ampoule de 15W (intensité lumineuse d’environ 100 lux). L’ampoule se trouvait à plusieurs mètres au-dessus du couvercle en plexiglas de la boîte moyenne en bois et des ventilateurs en haut et en bas de la chambre étanche à la lumière extérieure permettaient de dissiper la chaleur produite par l’ampoule. La température à l’intérieur de petite boîte fluctuait de moins de 1°C. L’enregistrement de l’activité de vol effectuée était noté en binaire au cours d’une minute. L’anophèle recevait une note de 1 pour toute activité de vol indiquée dans une minute et 0 s’il n’y avait pas d’activité dans la minute de sorte que chaque moustique avait une note entre 0 et 30 pour chaque demi-heure. Le régime de lumière était contrôlé depuis une pièce voisine par une minuterie Venner®.

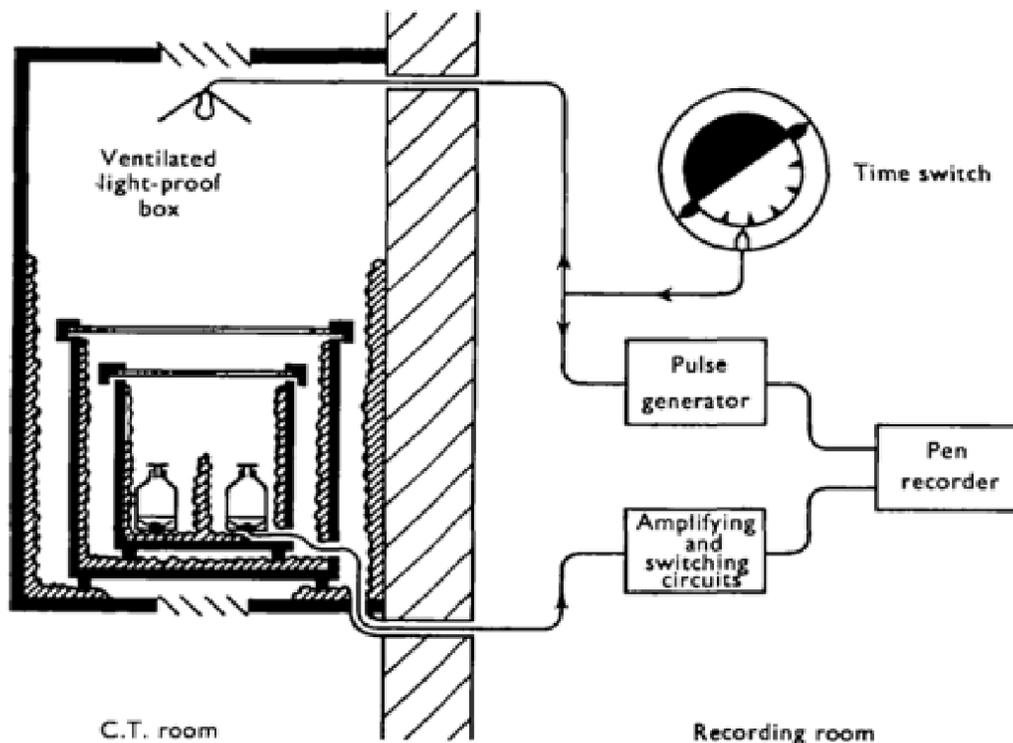


Figure 6 : Dispositif d’enregistrement en bouteille (d’après Jones et al. (1967))

5.2. Mesures par actographe infrarouge : le moniteur d'activité locomotrice (LAM)

Le *Locomotor Activity Monitor* LAM system, TriKinetics, Waltham, MA system (ou Moniteur d'Activité Locomotrice en français) est un dispositif conçu pour enregistrer les données de locomotion individuelle des anophèles (disposés individuellement dans des canaux) et selon les conditions définies par l'expérimentateur (Gentile et al. 2006). Le LAM est composé de trente-deux canaux (4 x 8) recevant chacun un tube. Autour de chaque canal, il y a un jeu circulaire de sources/détecteurs infrarouge. A l'allumage du LAM, chaque source infrarouge émet un faisceau qui est détecté par un détecteur opposé créant ainsi un réseau circulaire de faisceaux infrarouges. Le diamètre de chaque canal est de 2,5 cm et porte 9 sources et 9 détecteurs infrarouges (Fig. 7). Le LAM permet ainsi de mesurer l'activité individuelle de moustiques maintenus dans des tubes à hémolyse scellés par un bouchon en coton hyper enroulé placé dans ces canaux. Chaque tube est disposé horizontalement de sorte que le réseau circulaire de faisceaux infrarouges produit soit dirigé à travers son milieu. À chaque fois que le moustique traverse ce réseau circulaire de faisceaux infrarouges dans un sens comme dans l'autre, ce dernier est interrompu et cela constitue un "événement d'activité" qui est compté comme une activité locomotrice. Cette activité locomotrice est enregistrée par le logiciel *DAMSystem3TriKinetics* installé sur un ordinateur connecté au LAM par un câble téléphonique. Les événements détectés au cours de chaque intervalle d'échantillonnage sont additionnés et enregistrés au cours de l'expérience pour chaque anophèle. L'avantage du LAM est qu'il utilise des faisceaux infrarouges pour caractériser le schéma de mouvement dans chacun des 32 tubes individuels permettant ainsi de tester plusieurs individus ou génotypes en même temps. Dans toutes les expériences au cours de notre étude, les mesures du rythme des anophèles ont été réalisées avec le LAM

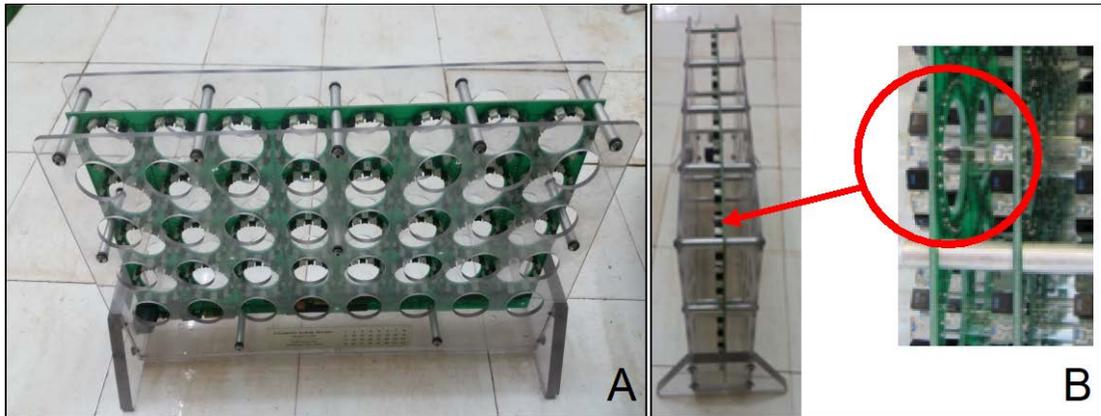


Figure 7 : Photographie d'un Moniteur d'activité locomoteur (LAM) vide : A) vue de face, B) vu de profil avec un zoom sur le jeu circulaire de sources/détecteurs infrarouge

5.3. Mesures par actographe par image vidéo (*Flybox*) (Araujo et al. 2020)

C'est un dispositif de mesure du rythme d'activité locomoteur des anophèles baptisé *Flybox* qui utilise l'enregistrement vidéo automatisé au lieu du son ou de l'infrarouge. Le *FlyBox* est une boîte cubique de 11 pouces fabriquée en acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS), noire et indépendante, entièrement étanche à la lumière pour éviter toute pollution lumineuse externe et connectée à un ordinateur contrôlant ses paramètres et enregistrant les données générées. Il contient trois caractéristiques principales : (i) une lumière d'entraînement (LED blanche pour imiter totalement la lumière du jour), (ii) une caméra infrarouge pour détecter et enregistrer les schémas d'activité et de repos (activité locomotrice) des anophèles et (iii) une plate-forme sous la forme d'une plaque de 24 puits dans lesquels sont disposés individuellement les anophèles qui est recouverte d'un film plastique transparent et percé de cinq trous sur chaque puits pour favoriser la circulation de l'air (Fig. 8). C'est donc un système permettant d'analyser automatiquement et simultanément 24 moustiques individuels sur une période donnée qui peuvent atteindre plusieurs jours complets dans des conditions de régime lumineux changeant ou constant.

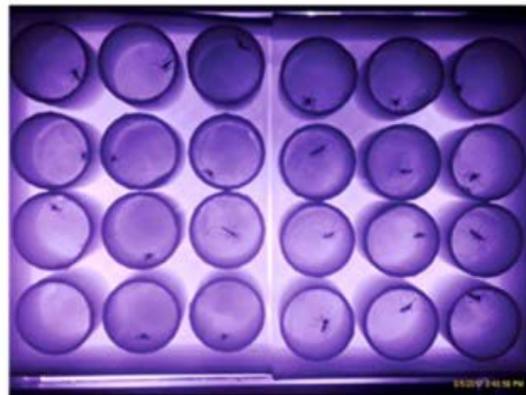
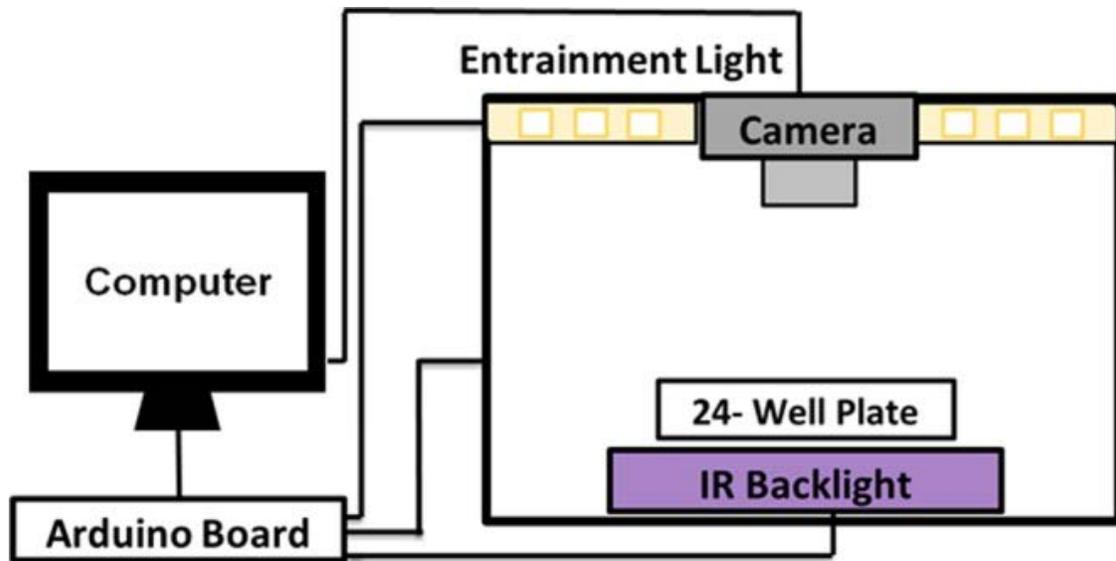


Figure 8 : Schéma d'un Flybox (d'après Araujo et al. (2020))

Chapitre 2

Changement des rythmes journaliers des insectes face à une pression de sélection

(Ce chapitre fera l'objet d'un article ultérieurement)

1. Introduction

1.1. Rappel des notions

La rotation de la terre sur elle-même et sa révolution autour du soleil ont donné naissance à des phases de jour (exposition d'une partie de la terre au soleil) et de nuit (absence d'exposition solaire) entraînant ainsi des rythmes de par leur durée, de même que les saisons. Un rythme se définit comme un changement répété avec un motif similaire (Koukkari & Sothorn 2006). Les rythmes découlant de la rotation terrestre impactent la biologie des êtres vivants et l'ensemble de ces rythmes chez les êtres vivants est appelé rythmes biologiques. De par leur période (temps nécessaire pour répéter un rythme biologique), on distingue trois principaux groupes de rythmes biologiques : (i) les rythmes ultradiens qui ont des périodes inférieures à 20 heures ; (ii) les rythmes circadiens avec une durée d'environ 24 heures (période variant généralement entre 20 et 28 heures) et (iii) les rythmes infradiens ayant une période supérieure à 28 heures. Parmi les rythmes infradiens, nous avons : a) les rythmes circatidaux, circasemilunaires se faisant en environ 14 jours (e.g. marrées), b) les rythmes circalunaires de 28 jours et c) les rythmes circannuels ou saisonniers durant une année approximativement.

Les rythmes circadiens sont omniprésents chez presque tous les êtres vivants (Luce 1970 ; Aschoff 1989 ; Dunlap 1999). Les premiers travaux sur le rythme circadien chez les êtres vivants sont attribués au botaniste et astrologue français Jean-Jacques de Mairan (Bünning 1964 ; Dunlap et al. 2004 ; Foster & Kreitzman 2004) grâce à sa démonstration selon laquelle les rythmes quotidiens des plantes sensibles (*Mimosa pudica*) placées en condition constante d'obscurité (Dark-Dark : DD) pouvaient être générés de manière endogène (Mairan 1729). Cependant, il faut attendre les années 1930 pour voir de grandes avancées grâce aux apports de Bünning sur la synchronisation

des rythmes circadiens avec le cycle environnement-lumière par le biais du photopériodisme chez les plantes, sa découverte de l'horloge biologique et de l'aspect héréditaire des rythmes circadiens (Bünning 1936). L'appellation *rythme circadien* avec “*circa*” pour “environ” et “*dies*” pour “jour”, est due au fait que les études pionnières sur les rythmes biologiques se sont majoritairement concentrées sur les cycles d'une durée de 24 heures (Koukkari & Sothorn 2006). Plusieurs rythmes comportementaux ont été rapportés chez les insectes (Saunders 1982) Et un nombre important parmi eux sont maintenus chez les insectes grâce à des horloges biologiques endogènes dites horloges circadiennes (Bünning 1936 ; Pittendrigh 1967 ; Moore-Ede et al. 1982). Ainsi, les insectes à l'instar des autres êtres vivants ont révélé qu'un nombre diversifié de leurs comportements est contrôlé par une horloge endogène, dite circadienne, déterminant l'occurrence de tel ou tel événement dans le temps, afin qu'il ait lieu dans un timing optimal. L'essaimage (Jones & Gubbins 1978), la pupaison (Clements 1999), la recherche de repas sanguin chez les insectes vecteurs (Bodin et al. 2008) et la ponte (Saunders 1982 ; Lazzari 1991) en sont des exemples.

De plus, les insectes sont capables d'adapter leurs rythmes biologiques circadiens en synchronisant leurs horloges endogènes avec les variations « nuit-jour » quotidiennes (Pittendrigh & Minis 1964 ; Saunders et al. 1994 ; Hardin 2011 ; Edgar et al. 2012). Lorsque les changements environnementaux (climat ou actions humaines) sont drastiques ou s'étendent sur une longue période, cette adaptation (alignement temporel entre les rythmes circadiens endogènes et les rythmes environnementaux) nécessite un effort supplémentaire qui peut être nuisible aux insectes. Ainsi, si cette adaptation est vitale pour ces insectes, ses causes pourraient être utilisées pour lutter contre les insectes nuisibles ou vecteurs d'agents pathogènes à cause de son coût sur leurs traits de vie. Cependant, il est alors impératif de connaître les causes des changements de rythmes journaliers ou comportementaux, en se concentrant sur la manière dont ils sont maintenus dans un environnement changeant par l'adaptation.

Dans cette revue, nous examinons l'état actuel des connaissances sur les changements des rythmes journaliers ou comportementaux des insectes. Une attention particulière est accordée à la fois aux changements de comportement circadien face à la pression de la sélection humaine ou naturelle et à leurs conséquences.

1.2. Rôle adaptatif des rythmes circadiens

Le maintien de la vie et la pérennisation de son espèce sont le propre de chaque être vivant. Il est donc évident que tous les êtres vivants vont chercher à rester en vie par tous les moyens en s'adaptant obligatoirement à leur environnement immédiat ou en se multipliant en vue d'assurer la pérennité de leur espèce (Comte de Buffon 1749). Ainsi, le coût engendré par une adaptation très marquée dans un environnement ou sur le trait de vie peut être observé à travers des expérimentations. Face aux changements climatiques qui sont de plus en plus perceptibles (Li et al. 2020), de nombreux animaux commencent à s'adapter à ces nouvelles données avec un pas de temps très réduit.

Ces adaptations, qu'elles soient longues ou pas, peuvent se produire sans l'intervention directe des horloges biologiques qui contrôlent une grande variété d'activités comportementales et de processus physiologiques chez les insectes au rang desquels, les rythmes quotidiens de locomotion, d'alimentation, d'accouplement, de ponte, de nymphose et d'éclosion. Ces rythmes peuvent s'exprimer à l'échelle individuelle ou à celle des populations. (Saunders 1982).

L'horloge circadienne des insectes

Le terme « d'horloge circadienne » est utilisé pour décrire le mécanisme endogène qui génère des rythmes quotidiens chez les insectes et autres organismes (Giebultowicz et al. 2001). Ce sont les expériences de Bünning (1936) qui ont permis de décrire l'horloge circadienne, de prouver que certains rythmes étaient non seulement endogènes, et non une expression des changements de l'environnement au long d'une journée, mais aussi hérités. En outre, Bünning a montré le rôle prédictif des rythmes endogènes, ainsi que leur valeur adaptative.

La localisation de l'horloge circadienne des insectes a été largement discutée par Giebultowicz (1999). L'auteur a montré que plusieurs oscillateurs circadiens existaient à différents endroits, qu'ils étaient autonomes, qu'ils contrôlaient un grand nombre des rythmes non comportementaux décrits. Ces oscillateurs circadiens sont situés dans les tissus périphériques et leur activité est coordonnée par un oscillateur central ou horloge circadienne, situé dans le cerveau. Ces résultats ont été récemment renforcés par Denlinger et al. 2017. Ils ont montré que les horloges circadiennes qui contrôlent les orientations de vol pendant les trajets migratoires des papillons monarques *Danaus plexippus* résident dans les antennes plutôt que dans le cerveau. D'autres travaux empiriques ont suggéré l'existence d'un oscillateur secondaire situé dans le cerveau central impliqué dans le rythme

locomoteur. Cela a été démontré chez les blattes (*Leucophaea maderae*) où divers rythmes circadiens comme l'activité locomotrice (Page 1982) et l'activité d'accouplement (Rymer et al. 2007), sont régulés par une paire d'oscillateurs travaillant ensemble, située dans chacun des lobes optiques du cerveau (Page 1985).

L'horloge circadienne comme toute horloge doit être « mise à l'heure », étant entraînée par les cycles jour-nuit de lumière-obscurité (LD : Light-Dark), de température ou, au moins en théorie, par toute autre variable journalière susceptible d'être captée par l'individu. Ces variables capables de synchroniser l'horloge circadienne sont désignées avec le terme allemand de *Zeitgebers* qui veut dire « donneur de temps ». Pittendrigh (1981) a produit une synthèse des effets des cycles LD sur les horloges pour comprendre comment l'alternance quotidienne des 1/2 cycles de lumière et d'obscurité entraînaient les oscillateurs qui sont responsables de rythme circadien des organismes. En outre, une étude conduite par Lubinski & Page (2016) a récemment montré que non seulement les rythmes circadiens d'activité ou de développement sont contrôlés par l'horloge circadienne localisée dans les lobes optiques des blattes, mais également la modulation journalière des processus d'apprentissage et de mémorisation des informations olfactives.

Il semble finalement donc que chez les insectes, un grand nombre de processus modulés dans le temps sont dépendant de l'activité de l'horloge circadienne d'une manière ou d'une autre, même si des interrogations persistent encore concernant les connexions entre le système circadien et l'expression des différents rythmes (Aschoff 1984).

Adaptation temporelle et survie

En observant presque tous les êtres vivants y compris les insectes, il est évident que l'un des points communs entre eux est qu'ils ont presque tous une activité rythmique, preuve d'une adaptation aux variations de leur environnement.

Ainsi à travers une revue récente, des chercheurs ont tenté de voir comment les horloges circadiennes des insectes étaient impliquées dans les mécanismes d'adaptation à travers leurs réponses « photopériodes » dans les environnements changeants, telle que la modulation des taux d'insuline par l'horloge, afin de favoriser une entrée ou sortie de la diapause, en utilisant la température comme moyen de régulation ou encore pour permettre la continuité des effets maternels comme observé chez la mouche à chair grise *Sarcophaga bullata* (Denlinger et al. 2017). Il se trouve que cette régulation du temps de la diapause permet aux insectes de se synchroniser

avec la disponibilité de nourriture et peut conduire à une divergence génétique par isolement allochronique à travers les niveaux trophiques de ces derniers. Les auteurs ont basé leurs travaux sur la divergence des périodes d'émergence entre les mouches univoltines du genre *Rhagoletis*, en particulier l'espèce *Rhagoletis mendax* qui émerge avant l'espèce *Rhagoletis pomonella*. Ces espèces sont synchronisées avec la maturation des myrtilles dont se nourrit *R. mendax*, qui apparaissent avant les fruits de l'aubépine (cenelles) dont se nourrit *R. pomonella*.

Cette adaptation temporelle peut aussi se faire par le biais de modification génétique comme démontré par Kaiser et al. (2016) qui ont étudié la base génétique de l'adaptation de *Clunio marinus* (un petit moustique non-piqueur du groupe des chironomes qui vit dans les zones rocheuses des plages et de bordure de mer et dont la reproduction est contrôlée par des horloges circadiennes et circalunaires) à sa « niche temporelle » écologique spécifique. Les auteurs ont trouvé après le séquençage du génome que les moucheron de différents endroits montraient des adaptations génétiques spécifiques locales et cela par la modulation de l'épissage alternatif qu'ils suggèrent être un mécanisme d'adaptation naturelle des rythmes circadiens.

D'autres études ont également souligné l'importance de la possession des gènes paralogues *Timeless* (jouant un rôle important dans la photosensibilité circadienne et la fonction d'horloge centrale) et *Timeout* (gène essentiel requis pour le métabolisme normal de l'ADN et l'intégrité des chromosomes, impliqué aussi dans l'entraînement à la lumière de l'horloge circadienne adulte) chez les insectes (Zheng & Sehgal 2008 ; Benna et al. 2010). Partant de ce constat, Gu et al. (2014) ont cherché à comprendre le cas particulier d'un insecte dont l'un gènes paralogues serait absent. Ils se sont ainsi intéressés à la guêpe pollinisatrice des figues *Ceratosolen solmsi* qui ne possède que le gène d'horloge *Timeout*. Ils ont ainsi mis en évidence qu'en l'absence de *Timeless*, *Timeout* présente une expression plastique. En effet, *Timeout* est exprimé rythmiquement seulement chez les femelles vivant en dehors du sycone et arythmiquement chez les femelles et mâles restant dans le sycone, reflétant ainsi un lien entre le gène circadien et les différences adaptatives des mâles et femelles à leur environnement.

Plusieurs stratégies comportementales sont utilisées chez les animaux ectothermes en vue de faire face aux effets à court terme des changements climatiques. C'est le cas chez les sauterelles *Phaulacridium vittatum* qui, vivant habituellement en zone tempérée fraîche, utilisent la thermorégulation soit en ajustant par exemple leurs moments d'activité soit en se réfugiant à

l'ombre ou en changeant leurs postures pour maintenir une température corporelle normale (Harris et al. 2015). Cette adaptation remarquable à des températures changeantes de ces sauterelles adaptées à des conditions tempérées fraîches, permet d'envisager leur grande chance de survie dans un contexte de changements climatiques à grande échelle.

Il va alors de soi que les insectes inaptes à cette stratégie de thermorégulation, pour ne pas disparaître, vont soit migrer dans des zones favorables, soit entrer en diapause, ou simplement limiter certaines de leurs activités telles la recherche d'hôtes (Parker et al. 1993) ou de ponte.

Par ailleurs, de petits changements dus à une adaptation ponctuelle peuvent conduire à une plasticité phénotypique. Il est alors possible que cette plasticité phénotypique puisse être adaptative lorsque les phénotypes s'alignent sur les changements environnementaux comme cela est observé chez les grillons *Gryllus veletis* et *Gryllus pennsylvanicus* (Bertram et al. 2013).

Ponte et œufs

La ponte, après la formation des œufs est un processus obligatoire chez la plupart des insectes pour assurer leur descendance et permettre la pérennité de l'espèce. Cela implique que les femelles doivent non seulement choisir la période propice de ponte mais également un site de ponte approprié afin de garantir des conditions idéales au développement et à la survie de leurs œufs. Cette ponte ne peut donc se faire que dans les conditions favorables. Selon les espèces, la ponte peut dépendre ou non de la lumière. Farnesi et al. (2018) dans leur étude sur l'effet que pouvait avoir la lumière et l'obscurité sur l'efficacité de la ponte chez *Aedes aegypti* en conditions de laboratoire contrôlées, ont montré que les femelles préfèrent pondre leurs œufs dans l'obscurité, mais pour maximiser le nombre et la viabilité des œufs, il faut qu'un cycle lumière/obscurité se produise. Par contre chez *Drosophila sukukii*, la ponte se fait principalement pendant la journée (Shaw et al. 2018). Lorsque ces conditions adéquates ne sont pas réunies, cela peut jouer sur la qualité de la ponte et au-delà, sur la quantité d'œuf déposée, avec à l'extrême la rétention de la ponte comme cela a été démontrée en conditions artificielles avec les femelles *Drosophila melanogaster*. Privées de nourriture et de milieu de ponte (conditions environnementales défavorables), les femelles arrêtaient de pondre même étant gravides (Van Herrewege 1970 ; Allemand 1976).

Le comportement d'oviposition (Gillett et al. 1961 ; Minis & Pittendrigh 1968 ; Loher and Chandrashekar 1970 ; Shaw et al. 2018) ou de larviposition (Phelps & Jackson 1971) de

nombreux insectes a été décrit comme étant rythmique et clairement circadien c'est à dire contrôlé par l'horloge circadienne. En effet, la synthèse des ovocytes présente une organisation temporelle interne (Allemand 1976) qui par extension fait que la ponte des œufs devient un comportement rythmique chez les insectes dont la durée peut varier selon les espèces.

Ainsi, une rétention momentanée de ponte peut aboutir à une diapause ovarienne. La diapause ovarienne a été montrée comme étant circadienne (Saunders 1990) et dans bon nombre de cas, fortement dépendante de la photopériode comme chez la mouche soufflante *Calliphora vicina* (Nunes & Saunders 1989). Elle peut donc être renversée ou stoppée en transférant les œufs dans des conditions de jours de durée plus longue que les nuits ou en élevant la température. Cela annulera la persistance de la diapause dans les journées courtes (Saunders et al. 1989).

Quant à l'éclosion, il a été aussi montré par de nombreux auteurs qu'elle est également contrôlée par un mécanisme de synchronisation endogène circadien avec souvent l'utilisation du cycle lumière-obscurité de 24 h comme repère temporel environnemental comme dans le cas de *Pontomyia pacifica* (Neumann 1986). Ainsi, la coévolution des multiples traits d'histoire de vie en réponse à la sélection du moment de l'éclosion met en évidence les corrélations de l'architecture génétique gouvernant le moment de l'éclosion avec des composantes de la fitness, ce qui suggère que le fait de choisir des comportements écologiquement pertinents en fonction de la journée pourrait conférer un avantage adaptatif (Nikhil et al. 2016). Ainsi Lazzari (1991) a suggéré que chez *Triatoma infestans* l'éclosion à l'aube, contrôlée par l'horloge circadienne, semble être liée aux conditions environnementales montrant la valeur adaptative du rythme d'éclosion circadien permettant aux œufs d'éclore à des moments de la journée où l'humidité relative est maximale (heure de rosée), ce qui permet d'éviter les effets délétères de l'exposition à la sécheresse. De plus, il a aussi été montré que chez *Rhodnius prolixus*, l'accès à des substrats de ponte adéquats affectait fortement la fécondité des femelles (Schilman et al. 2009).

Vie larvaire et nymphale

Après l'éclosion des œufs (ou dans certains cas la ponte des larves), débute la vie larvaire. Durant sa vie, la larve se nourrit régulièrement afin de croître jusqu'à devenir chez les insectes holométaboles une nymphe, puis un imago. Mais avant de devenir une nymphe ou imago, la larve passe par un ou plusieurs stades. Ce passage d'un stade larvaire à un autre est appelé mue. La durée du développement larvaire s'est avérée dépendante de la période spontanée de l'horloge

circadienne ; les mutants avec une période spontanée de 19h se développent plus vite que les mouches de souche sauvage et les mutants à période long de 28h, ont un développement plus lent (Kyriacou et al. 1990). La durée de cette la vie larvaire est variable et dépend des espèces. Cependant dans certaines conditions ou selon les espèces, le développement larvaire doit être plus rapide car les larves habitent des habitats éphémères. Ainsi, la vie larvaire se doit d'être adaptative. Cette adaptation de la vie larvaire nécessite l'implication des horloges circadiennes, qui régulent de manière rythmique la plupart des processus biologiques (comportementaux et métaboliques) des traits de vie telles que la période de développement pré-adulte (Kyriacou et al. 1990) et la vie adulte (Klarsfeld & Rouyer 1998) chez les insectes. De nombreux auteurs ont montré chez différents insectes que cette rythmicité était héréditaire (Nunes & Saunders 1989) et persistait donc aussi en condition de lumière ou d'obscurité constante (Bünning 1936 ; Lewis & Bletchly 1943 ; Bateman 1955). De plus, une étude a montré que lorsque la sélection était artificiellement imposée à *Drosophila melanogaster* en laboratoire pour un développement plus rapide, il se produisait une réduction du temps de développement pré-adulte et un raccourcissement de la période d'horloge, suggérant un rôle des horloges circadiennes dans la régulation des traits de vie de *D. melanogaster* (Yadav & Sharma 2014).

Si les horloges circadiennes jouent un rôle important dans le développement de la vie larvaire, il ne faut cependant pas ignorer les facteurs abiotiques et biotiques qui peuvent moduler celui-ci selon des interactions avec l'horloge circadienne et donner des phénotypes différents. Ainsi, des travaux portant sur l'étude de l'influence de l'hétérogénéité à la fois temporelle et spatiale dans des conditions microclimatiques sur le comportement et la performance associée d'un stade immature de *Pikonema alaskensis* (Johns et al. 2012), concluent que les modèles cycliques d'activité des insectes peuvent être régulés de manière approximative par un certain nombre de facteurs abiotiques, bien que ces facteurs soient généralement interalliés. En outre, les adaptations comportementales de *Pikonema alaskensis* aux variations microclimatiques quotidiennes et à l'intérieur des pousses peuvent réduire le risque de stress hygrothermique pendant la dispersion ou l'alimentation, tout en permettant aux larves de se nourrir du feuillage préféré et très nutritif de la cime supérieure des jeunes épinettes. Ces chercheurs ont aussi montré une adaptation de la période de l'alimentation chez cette espèce en fonction de la lumière. En effet, les larves de la cime supérieure, commençaient généralement à se nourrir plus tôt que celles de la cime inférieure entraînant une interaction temporelle significative. De même, Nayar (1967b) a démontré que les

larves d'*Aedes taeniorhynchus* qui ne pouvaient pas être entraînées avec une photophase de LD 12 : 12 à un cycle de 24 heures puisqu'elles gardaient leur périodicité de 22,5 heures (Nayar 1967a), s'adaptèrent finalement à une périodicité proche de 24 heures lorsqu'elles étaient dans des situations de stress causé par un surpeuplement, de faibles quantités de nourriture ou de forte salinité du gîte, c'est-à-dire lorsque leurs conditions environnementales devenaient défavorables.

La diapause

La diapause est une modification de la physiologie des insectes programmée, laquelle prépare l'insecte en anticipation à l'arrivée d'une saison défavorable. La diapause peut être utilisée associée chez les larves des insectes à l'arrêt ou ralentissement de la croissance, pendant des périodes de faible disponibilité de ressources nutritionnelles. L'entrée en diapause ou non est due à des facteurs intrinsèques ou endogènes, mais le moment est déterminé par des signaux environnement annonçant l'arrivée de la saison défavorable, par exemple, le raccourcissement de la durée du temps de lumière, au fur et à mesure que l'hiver s'approche. Cette induction photopériodique peut avoir lieu sur les larves elles-mêmes ou sur la génération précédente et des facteurs déterminants d'origine maternelle transmis aux larves (Vinogradova 1974 ; Saunders et al. 1986). Ainsi, pour expliquer l'entrée en diapause dans une même descendance, Nunes and Saunders (1989) soutiennent la possibilité que chez *Calliphora vicina*, les œufs déposés tôt contiendraient moins de « facteur maternel » que ceux qui ont été déposés plus tard. Par conséquent, bien que les embryons et les larves des œufs précoces et tardifs puissent accumuler la même quantité de « facteur de diapause », le facteur de diapause totale éventuel, qui inclut la contribution maternelle, sera inférieur au seuil chez les larves d'œufs précoces, mais supérieur au seuil chez les œufs tardifs, entraînant ainsi une non-diapause dans le premier cas et une diapause dans le dernier. Ces différences au niveau de l'information maternelle reçue peuvent engendrer des différences de de taux de diapause selon le moment de la saison.

Un des faits remarquables de l'adaptation se perçoit chez les mouches tsétsé qui sont vivipares. Après son développement complet, la mise-bas de la larve (larviposition) dans le sol se produit généralement le soir en condition LD 12/12 (Denlinger 1983). Cet évènement est très important dans la vie de la larve car elle doit s'enfouir dans le sol et se transformer en peu de temps tout en évitant les prédateurs (Lewis 1934). Cela nécessite donc un timing optimum. Ainsi, chez *Glossina morsitans*, lorsque la tête de la mère et ses derniers segments abdominaux ont été placés dans des

conditions lumineuses opposées, la larviposition a été réalisée en faisant intervenir à la fois le rythme de la tête de la mère et celui de la larve dans l'abdomen (Denlinger 1983). Cela suggérait une sorte de compromis pour laisser une chance à la larve de survivre après la larviposition.

Bien qu'une grande différence entre les périodes environnementale et endogène ait un impact mesurable, il faut cependant souligner l'importance de l'horloge circadienne pour maintenir l'ordre temporel interne indépendant des cycles environnementaux (Klarsfeld & Rouyer 1998). Souvent, une combinaison judicieuse des facteurs abiotiques peut être utilisée comme compromis adaptatif par les insectes afin de faire face au changement de saison. Ainsi, les larves du quatrième stade du moustique carnivore *Toxorhynchites rutilus* utilisent une interaction entre la température, le refroidissement et la photopériode afin de passer l'hiver en hibernant (diapause) mais aussi pour en sortir à la fin de l'hiver (Bradshaw & Holzapfel 1977).

Émergence, vie imaginale et locomotion

Avant de passer à la vie adulte, certains insectes passant une partie de leur vie dans l'eau, subissent à la fois une métamorphose vers la forme adulte et une transition de l'environnement aquatique vers l'environnement terrestre. Cette transition, ou émergence, est la condition préalable à la reproduction et à la dispersion (Davies 1984). C'est un moment critique de la vie de l'insecte car il est unique mais expose l'insecte à une forte prédation due au fait que l'insecte une fois sorti de son exuvie doit attendre à la surface de l'eau ou sur des débris le plus souvent végétaux, que ses ailes sèchent et s'ouvrent complètement avant de prendre son envol (Oliver 1971). Cette émergence doit se faire à des moments bien précis nécessitant ainsi à une adaptation particulière de l'insecte. De plus, l'émergence fait partie d'une gamme de rythmes circadiens qui ne se produisent qu'une seule fois dans la vie des insectes et selon les insectes à un moment précis de la journée de sorte que si l'insecte rate ce moment, il est obligé d'attendre le même moment du jour suivant. Le moment auquel se produit l'émergence a été qualifié de "porte" par Pittendrigh (1966), suggérant que certaines heures de la journée constituaient des « zones interdites » d'émergence, et que les « zones autorisées » ou « pics d'émergence » étaient dictés par l'horloge circadienne. L'hypothèse que l'émergence soit sous la gouverne d'une horloge endogène a été démontrée par Kaiser et al. (2011) avec la cécidomyie marine *Clunio marinus* chez qui les auteurs ont trouvé des combinaisons adaptatives des temps d'émergence lunaire et diurne qui sont sous contrôle génétique. Ainsi, le fait

qu'un insecte puisse rater le jour initial de son émergence et se rabattre sur le jour suivant à un moment semblable à la veille, implique sa grande adaptation voire celle de son horloge endogène.

De nombreux auteurs ont montré que plusieurs rythmes de vie des insectes adultes tels que l'activité de vol journalière (Jones et al. 1966 ; Brady 1975), l'essaimage (Sawadogo et al. 2013a, 2013b, 2014), la recherche de repas sucré (Gillett et al. 1962) ou sanguin (Robert et al. 1985), la ponte ou la larviposition (Haddow et al. 1961 ; Gillett 1962) ont une base endogène et ils peuvent alors être considérés comme des vrais rythmes circadiens (Saunders 1982). Il a été également démontré qu'en plus des oscillations des cycles environnementaux (cycle solaire jour-nuit, cycles quotidiens de température), les insectes utilisent celles de la disponibilité des ressources pour synchroniser ou entrainer leur rythmes biologiques (Saunders 1982 ; Hong & Saunders 1998 ; Saunders & Hong 2000). Ces cycles de l'environnement qui synchronisent l'horloge interne sont alors les Zeitgebers.

De plus, Rieger et al. (2012) ont testé l'influence que pouvait avoir la manipulation du crépuscule ou de la longueur de la journée dans les cycles LD sur l'activité globale de trois souches (une souche de laboratoire et deux souches sauvages) de *D. melanogaster*. Ils ont trouvé que les souches sauvages de *D. melanogaster* présentaient une préférence similaire pour la lumière faible avec la souche de laboratoire, que les souches sauvages du Nord et du Sud différaient dans leur capacité à adapter leurs rythmes d'activité locomotrice à de longues photopériodes, mais que la simulation de crépuscule pouvait améliorer cette capacité. Ces auteurs ont aussi montré que ces mouches évitaient d'être actives à des intensités lumineuses plus élevées en déplaçant certaines parties de leur activité dans la phase d'obscurité. Ils soutenaient par ailleurs que ce fait semblait être bien fixé dans les gènes et restait inchangé même après de nombreuses générations en laboratoire.

L'adaptation chez les insectes adultes peut aussi s'observer chez les descendants des espèces sœurs comme dans le cas des F₁ et F₂ issues des croisements de *Dacus tryon* dont la réactivité maximale à l'accouplement se situe au moment du crépuscule à une intensité lumineuse optimale d'environ 91 lux et de *Dacus neohumeralis* dont la réactivité maximale se situe au milieu de la journée à 10 000 lux. Il a été découvert que l'horloge circadienne des F₁ et des F₂ rétrocroisées fixait une phase d'accouplement ("porte") aussi étroite chez les mouches F₁ que chez leurs parents (Smith 1979).

Il semble donc que les insectes à chaque stade, au cours de leur développement peuvent s'adapter. Or, nous savons que toute modification dans l'activité locomotrice générale des insectes peut

affecter aussi certains de leurs comportements singuliers comme la nutrition, l'accouplement ou la ponte. Il serait donc intéressant de faire l'état des lieux des facteurs biotiques ou abiotiques pouvant entraîner ces changements de rythme journalier.

2. Causes des changements des rythmes journaliers

2.1. Rappels des principaux facteurs abiotiques pouvant modifier les rythmes journaliers : cycles lumière/obscurité, température, pluviométrie et humidité

Parmi les facteurs abiotiques pouvant affecter le comportement des insectes, le cycle lumière/obscurité et la température ont été les plus étudiés car ils sont constamment présents dans tous les environnements et indissociables, même s'ils varient souvent. De nombreux auteurs ont mis en œuvre des expérimentations dans le but de voir précisément les effets des variations de la lumière seule en durée comme en intensité à une température stable ou combinée à des températures fluctuantes.

En dehors de ces deux facteurs abiotiques, d'autres facteurs tels que la pluviométrie et l'humidité ont été peu étudiés ou longtemps délaissés car les pionniers comme Buxton (1955), Bursell (1957) ou Barrass (1970b) leur attribuaient un effet très négligeable ou quasi inexistant sur les rythmes circadiens. Mais de plus en plus, de récentes études tendent à balayer cette affirmation (Jordan & Hubbard 1991 ; Roca & Lazzari 1994 ; Guarneri et al. 2002).

Effets de la lumière (présence/absence) sur les rythmes journaliers

Les effets des cycles lumière/obscurité sur les rythmes journaliers des êtres vivants ont été décrits et baptisés *photopériodisme* pour la première fois par Garner & Allard (1920) à travers leur étude sur la réaction de certaines plantes à de longues ou courtes journées. Les tout premiers travaux sur le photopériodisme chez les insectes débutent avec l'observation de la variation des morphologies saisonnières chez plusieurs espèces de pucerons par Marcovitch (1923) puis, vont suivre beaucoup d'autres autour de la diapause par Kogure (1933) et Sabrosky et al. (1933) comme noté par Saunders (1982). Depuis ces premiers travaux, de nombreux autres se sont intéressés aux variations des rythmes d'activité des insectes, en grande partie pour la compréhension de la diapause chez les espèces agricoles à cause de l'importance évidente des cycles saisonniers chez ces dernières

(Saunders 1982), mais aussi chez les insectes vecteurs de pathogènes (Jones et al. 1967, 1972a, 1972b ; Jones 1973 ; Saunders 1981).

La lumière a été le *zeitgeber* le plus étudié depuis la découverte des rythmes circadiens et celle de son rôle de synchroniseur des horloges circadiennes. En plus de servir d'élément de synchronisation de l'horloge, les cycles LD peuvent aussi agir sur tous les comportements rythmiques des insectes. Il est ainsi démontré que le comportement de ponte chez les insectes est sensible au cycle lumière/obscurité, de même que la viabilité et la quantité d'œufs déposés (Yoshimura 2004 ; Farnesi et al. 2018), mais que cette sensibilité aurait été acquise par la sélection naturelle en réponse aux conditions environnementales (Satralkar et al. 2007).

La lumière peut également inactiver ou impacter le comportement de vol locomoteur des insectes. A cet effet, Rieger et al. (2007) à travers les résultats de leur étude portant sur les préférences lumineuses de *D. melanogaster*, suggèrent que ces mouches à fruits règlent leur horloge au début de l'aube et à la fin du crépuscule afin d'éviter ainsi la lumière vive pendant la journée.

Au-delà des cycles LD eux-mêmes, leur longueur peut aussi fortement impacter les horloges circadiennes avec l'observation d'un retard de phase clair, induit lorsque le changement photopériodique dépasse une valeur critique dans la photophase entre 13 et 14 h, quelle que soit l'amplitude du changement (Miyazaki & Numata 2009). Ainsi, bien que les avances de phase soient plus faibles que les retards de phase, elles dépendent de l'amplitude des changements photopériodiques plutôt que de la durée absolue de la photophase, contrairement aux retards de phase. La variation de l'intensité lumineuse permet aussi l'accomplissement de certains comportements circadiens au rang desquels l'accouplement qui ne se produit chez certains insectes qu'à de faibles intensités lumineuses comme celle du coucher du soleil tout au long de l'année chez les vecteurs du complexe *Anopheles gambiae* par exemple (Sawadogo et al. 2013a).

Aussi, la lumière, par son effet sur l'horloge circadienne peut entraîner des différences écologiques et biologiques entre les individus au sein d'une même espèce à travers les schémas d'expression des gènes circadiens. Ainsi, une étude sur la guêpe *Ceratosolen solmsi* (Gu et al. 2014) a montré que chez les mâles et femelles qui restent toujours à l'intérieur de la cavité du sycone, le gène d'horloge *Timeout* était arythmiquement exprimé contrairement aux femelles qui s'étaient dispersées avec succès hors de leur sycone natal. Et comme les sycones sont à l'abri de lumière,

cela a permis aux auteurs de confirmer que l'exposition à la lumière pouvait induire l'expression des gènes impliqués dans la rythmicité circadienne.

L'urbanisation peut aussi entraîner une modification du rythme circadien à travers la pollution lumineuse qui peut altérer certains comportements comme la ponte ou la piqûre chez de nombreux insectes. Ainsi, chez les moustiques du complexe *Culex pipiens*, une différence dans la forme d'activité est perceptible entre les moustiques urbains présentant un profil bimodal avec un pic le soir et un autre le matin, respectivement associé au coucher du soleil et au lever du soleil, et les espèces rurales chez lesquelles ne persiste que le pic du soir (Savage et al. 2006). En outre, la suppression ou l'arrêt des piqûres a été observé chez *Anopheles gambiae* s.s. en laboratoire après des impulsions lumineuses toutes les deux heures pendant la nuit, ainsi qu'un effet suppressif immédiat sur le comportement de vol des moustiques après exposition à une impulsion lumineuse de 30 minutes entraînant une suppression de l'activité au début de la nuit et une forte activité à la fin de la nuit (Sheppard et al. 2017).

Place de la température dans les changements des rythmes journaliers

La température peut affecter les rythmes journaliers de diverses manières, selon qu'elle soit fournie sous forme de température constante, de changements par paliers, de cycles ou d'impulsions chaudes et froides du fait que ces changements périodiques (cycles et pulsations quotidiennes) semblent exercer leur effet directement sur le mécanisme de l'horloge (Sweeney & Hastings 1960 ; Saunders 1981). La température peut donc être un facteur environnemental plus rigoureux qui modifie les caractéristiques du cycle de vie plus rapidement que la lumière (Rieger et al. 2012). Ainsi, il a été démontré que les *D. melanogaster* réagissent à l'augmentation de la température et de l'intensité lumineuse en prolongeant leur phase de repos (ou d'inactivité) (Rieger et al. 2007). De même, les drosophiles d'Europe du sud ont clairement montré leur capacité à retarder leur pic de fin de journée, évitant ainsi toute activité de vol de longue durée l'après-midi à 30°C. Ce changement de comportement leur permet de s'adapter parfaitement aux contraintes environnementales (Rieger et al. 2012). Ce comportement adaptatif est tout à fait logique, partant du fait que contrairement à la longueur des jours qui varie peu au niveau de l'équateur au cours de l'année quelle que soit la saison, les températures peuvent être assez élevées en été (Rieger et al. 2012).

Le soleil produit à la fois de la lumière et de la chaleur. De ce fait, la photophase naturelle découlant de la rotation de la terre sur elle-même entraîne des fluctuations de la température quotidienne qui, à l'exception des pôles nord et sud, est positivement corrélée à l'intensité lumineuse. Cette corrélation peut affecter le développement de nombreux insectes. Ainsi une étude de l'effet synergique des fluctuations quotidiennes de la température et du cycle LD sur les traits du cycle de vie de la collembole *Orchesella cincta* a montré que la croissance était plus lente chez cette espèce lorsqu'elle était maintenue en régime de température constante, mais très rapide en régime de fortes fluctuations d'amplitude de la température, suggérant que le régime de température constant était stressant pour les collemboles (Liefing et al. 2017). En outre, le fait que la quantité d'œufs pondus la nuit était plus élevée dans le régime LD combiné à une température fluctuante, permet de dire que l'effet synergique des fluctuations quotidiennes de la température et du cycle LD correspondant améliorerait la croissance de la population et synchroniserait le comportement de ponte chez les arthropodes aptérygotes (Liefing et al. 2017).

Si la baisse de la température dans les cycles LD peut avoir un impact négatif tel le ralentissement de la croissance chez de nombreuses espèces d'insectes comme *Aedes aegypti* (Diptères : *Culicidae*) chez qui la durée du développement immature (de l'éclosion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes) est inversement liée à la température (Tun-Lin et al. 2000 ; Mohammed & Chadee 2011), chez les larves des insectes diapausants comme *Toxorhynchites rutilus*, l'interaction entre le refroidissement et la photopériode peut servir de compromis adaptatif en raison des tendances climatiques à long terme et des aléas du temps printanier (Bradshaw & Holzapfel 1977).

Le passage d'une saison à une autre est un moment important chez les insectes à cause des différences de température, de ressources vitales, de gîtes de reproduction et souvent de cycles LD. L'adaptation à ces changements fait souvent intervenir l'horloge endogène qui peut se faire de manière programmée par le biais de la sensibilité à la température qui est un élément variant beaucoup dans les changements de saisons. Ainsi, Truman (1973) a montré que les mâles du ver à soie du chêne *Antheraea pernyi* élevés à 25°C, n'étaient actifs que durant les trois dernières heures de la scotophase dans le cycle LD 16 : 8 à 25°C. Par contre, s'ils étaient élevés à 12°C et testés à l'âge adulte à 25°C, ils étaient alors actifs durant une grande partie de la scotophase. Cette sensibilité à la température permet vraisemblablement à l'espèce d'ajuster son activité pour anticiper les fluctuations saisonnières des schémas de température quotidiens (Truman 1973).

En plus d'avoir des effets sur les cycles LD, les variations de température peuvent aussi agir sur les insectes maintenus en luminosité ou en obscurité constante.

Pluviométrie et humidité, des aspects négligés du réchauffement climatique en chronobiologie

La plupart des insectes ont une forte dépendance à l'eau et/ou à l'humidité. Dans les zones tropicales, les insectes montrent souvent des signes d'activité lorsque la saison des pluies commence et deviennent dormants (on parle d'estivation) avec le début de la saison sèche (Saunders 1982). Ce phénomène d'estivation, bien connu chez les moustiques du complexe *Anopheles gambiae*, débute avec le début de la saison chaude qui est moins humide. De plus, les prédictions sur les conséquences du réchauffement climatique sur la pluviométrie sont contrastées selon les régions. Pendant que certaines parties de la terre connaîtront des épisodes de sécheresse avec un déficit pluviométrique, d'autres seront soumises à des inondations et des pluies très prononcées comme cela se voit un peu partout. Si une sécheresse fréquente ou marquée sur plusieurs années peut entraîner une forte diminution voire la disparition de certaines espèces, elle peut cependant chez d'autres, favoriser la migration et la colonisation de nouvelles niches écologiques, là où les conditions seront moins rudes par rapport à leur ancienne niche. De même, les abondances de pluies et d'humidité dans une zone peuvent favoriser l'arrivée de « nouvelles » espèces jusque-là absentes.

L'humidité est un facteur abiotique normalement corrélé négativement avec la température. Très peu d'études ont porté sur ses effets sur le rythme des insectes. Selon Brady & Crump (1978), cela est dû aux premiers travaux qui ont établi un consensus sur le fait que l'humidité avait peu d'effet sur le niveau d'activité par opposition à ses effets sur l'écologie (Buxton 1955), que ses effets étaient très négligeables face à ceux de la température (Barrass 1970a, 1970b), et de l'alimentation (Bursell 1957). Cependant, il est important de rappeler que ces auteurs se sont focalisés seulement sur des espèces vivant dans un environnement ouvert et au stade adulte, excluant involontairement les stades immatures et les espèces troglodytes chez lesquelles il serait intéressant de voir les effets de la variation de l'humidité. En effet, il a été montré que le succès de l'éclosion des œufs des punaises hématophages *Triatoma infestans* et *Triatoma brasiliensis* était fortement affecté par de faibles valeurs d'humidité relative (Roca & Lazzari 1994 ; Guarneri et al. 2002), de même que le nombre de nymphes engorgées et la réussite de leur exuviation (Guarneri et al. 2002). Cette corrélation négative entre une grande productivité en œufs et une faible humidité a été aussi décrite

chez *Toxorhynchites moctezuma* (Jordan & Hubbard 1991). Ce constat laisse présager qu'en cas d'humidité trop grande, les femelles de certains insectes peuvent supprimer le comportement de ponte.

2.2. Facteurs biotiques pouvant moduler le rythme journalier

Interactions Hommes - vecteurs : lutte chimique contre les vecteurs

Utilisation des substances chimiques (insecticides) dans la lutte contre les insectes nuisibles et vecteurs

L'utilisation des substances chimiques est ancienne, les cas de premières utilisations de substances chimiques dans la lutte remontant à la Grèce antique (Rupp 1952 ; Darriet 2007). Cependant, leur généralisation va prendre de l'ampleur avec leur utilisation dans la lutte contre les insectes grâce au développement de la chimie organique de synthèse et de la recherche sur les armes chimiques durant la première guerre mondiale. En effet, la grande efficacité du DDT comme insecticide dans les années 1930 va conduire à son utilisation par les militaires américains durant la deuxième guerre mondiale dans la confection des premières moustiquaires imprégnées contre les piqûres de moustiques, puis par les chinois durant les années 1960, et ensuite à travers la pulvérisation intra domiciliaire dans le programme mondial d'éradication du paludisme (WHO 1956 ; Darriet 2007). Mais la lutte chimique sera abandonnée à cause de la toxicité du DDT. Elle va cependant repartir de plus belle grâce à l'usage « médical » de la moustiquaire à titre préventif contre les piqûres des anophèles et par extension contre la transmission du paludisme. Il faudra attendre le milieu des années 1980 et ceux obtenus après la suggestion de remplacer le DDT par un pyrèthrine de synthèse (substance moins toxique et aussi efficace) pour que la preuve de son efficacité contre les vecteurs et la réduction du contact homme-vecteur soit démontrée au Burkina Faso par Darriet et al. (1984) et au Mali dans la réduction de l'indice splénique et la protection contre le paludisme par Ranque et al. (1984). Dès cet instant, l'utilisation des moustiquaires va se faire de manière individuelle ou familiale. Avec le nombre d'études croissantes montrant depuis lors son efficacité dans la baisse des indices malariologiques aussi bien cliniques qu'entomologiques, des voix vont s'élever pour demander son implication dans les campagnes de lutte à grande échelle contre le paludisme (Coosemans & D'Alessandro 2001). Il faudra cependant attendre la création de plusieurs initiatives internationales parmi lesquelles *Multilateral Initiative on Malaria* (MIM) en 1997 et

Roll Back Malaria (RBM) en 1998 (WHO 1998) qui vont remettre le paludisme sur le devant de la scène face au constat alarmant de ses conséquences, incitant ainsi les dirigeants des pays les plus touchés à prendre davantage de mesures (RBM 2000) pour que les moustiquaires imprégnées rentrent dans les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Ainsi, l’OMS, qui à travers son programme TDR avait financé des études multicentriques coordonnées par Christian Lengeler entre 1991 et 1993 en Gambie, au Burkina Faso et au Kenya et qui avait apporté la preuve, par une analyse détaillée de 65 évaluations, de la valeur protectrice des moustiquaires dans la lutte contre le paludisme surtout par le nombre de décès qui pouvaient être évités annuellement par son utilisation chez les enfants de moins de cinq ans (Lengeler 1998), va soutenir cette utilisation des moustiquaires dans les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Cette politique va entraîner ainsi une utilisation massive des substances chimiques en santé publique en plus de leur grande présence en agriculture.

Observation de comportements circadiens décalés (temporelle/spatiale) suite à l’utilisation des insecticides

Si l’utilisation des substances chimiques à grande échelle *via* les insecticides en agriculture et en santé publique a entraîné la baisse des populations d’insectes vecteurs et nuisibles (Schellenberg et al. 2001 ; Bhatt et al. 2015), cependant, il ne faut pas perdre de vue que les insectes et surtout les vecteurs, montrent une remarquable adaptation à l’homme et à son environnement (Coluzzi et al. 1979 ; Costantini et al. 2009 ; Simard et al. 2009). Cette capacité d’adaptation aux conditions environnementales va se manifester avec le développement de résistances aux insecticides (Stump et al. 2004), aussi bien comportementales que physiologiques à cause de la pression de sélection exercée par les insecticides utilisés dans lutte en santé humaine et en agriculture (Diabate et al. 2002 ; Czeher et al. 2008 ; Donnelly et al. 2009).

En marge de nombreuses études portant sur la résistance physiologique (Corbel et al. 2012), certaines études se sont intéressées à la transmission persistante (transmission résiduelle) malgré l’utilisation massive de moustiquaires imprégnées. Ces études ont permis de mettre en évidence comme cela fut rapporté dans le passé (Smith & Chabeda 1969), un changement de comportement de piqûre beaucoup plus marqué à l’extérieur (exophagie), défini par certains auteurs comme une résistance comportementale qui pourrait nuire à l’utilisation massive des MILD et favoriser une transmission continue du paludisme (Darriet 1991 ; Reddy et al. 2011). Charlwood & Graves

(1987) furent les premiers à signaler dans la partie costale de Papouasie-Nouvelle-Guinée, un décalage dans le comportement de piqûre chez *Anopheles farauti* et *An. koliensis* après introduction de moustiquaires imprégnées de perméthrine. En effet, chez ces deux espèces, le pic d'activité de piqûre après minuit avait été remplacé par un pic avant minuit. De plus, ces auteurs ont montré l'effet des insecticides sur la durée du cycle de ponte qui s'était allongée et sur l'habitude de repos et de piqûre d'*An. farauti* qui jadis endophile et endophage était devenu exophile et exophage. Cette augmentation de l'exophilie suite au changement du comportement de piqûre des vecteurs du paludisme après la distribution de moustiquaires imprégnées fut également rapportée par Russell et al. (2011) avec une majorité de piqûres au crépuscule et à l'aube, de même que le remplacement d'*An. gambiae s.s* espèce majoritaire, par *An. arabiensis* dans le complexe *An. gambiae*. Cette situation fait aussi craindre un possible changement de comportement de piqûre par l'adaptation d'*An. gambiae s.s.* pour la recherche d'hôtes à l'extérieur sur l'île de Bioko en Guinée Équatoriale (Reddy et al. 2011).

L'existence d'une différence d'activité entre les différents génotypes (résistant homozygote, sensible homozygote et hétérozygote) chez les moustiques femelles *Anopheles gambiae* et *An. stephensi* en l'absence d'insecticide (Rowland 1991) peut laisser penser que ces changements de comportements de piqûre observés un peu partout en Afrique avec la distribution massive de moustiquaires imprégnées (Mbogo et al. 1996 ; Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011 ; Thomsen et al. 2017 ; Sherrard-Smith et al. 2019), seraient potentiellement dus au portage de gènes de résistance. Mais la récente étude réalisée par Moiroux et al. (2012) fournit des preuves d'un changement dans le comportement de piqûre des vecteurs du paludisme dans une zone indemne de résistance physiologique avec surtout des piqures ayant lieu à des heures auxquelles les populations ne sont pas protégées par leurs moustiquaires. Il apparaît donc que les insectes résistants à un insecticide n'ont pas besoin de changer leur comportement du fait d'une faible mortalité dans leur rang (Briet & Chitnis 2013). Ceci renforce donc la suggestion de précédentes études (Mbogo et al. 1996 ; Kitau et al. 2012) quant au fait que la survie des moustiques physiologiquement sensibles sous la pression des insecticides est attribuée à l'évitement des insecticides.

Si les insectes sont capables de décaler certains comportements rythmiques afin de résister à la pression des insecticides, il faut cependant noter qu'il existe des schémas rythmiques quotidiens de la sensibilité des insectes aux insecticides comme cela est signalé chez les blattes germaniques,

Blattella germanica, les charançons (*Hylobius abietis*) et le ténébrion meunier (*Tenebrio molitor*) (Beck 1963 ; Cole & Adkisson 1964 ; Fondacaro & Butz 1970 ; Lin et al. 2014), montrant ainsi que la sensibilité aux insecticides peut varier au cours de la journée chez un même insecte. Ainsi, Pszczolkowski & Dobrowolski (1999) ont trouvé que le charançon nocturne du pin *Hylobius abietis* montrait une plus grande résistance à la deltaméthrine pendant la nuit. Cette régulation circadienne de la sensibilité aux substances chimiques peut laisser présager une possible adaptation des comportements des insectes aboutissant à un décalage vers les périodes durant lesquelles l'insecte est le moins sensible.

Il apparaît donc que le changement de comportement n'est pas obligatoirement mécanique. Il peut se faire à bas bruit et dans le temps comme cela est en cours au Kenya avec l'évitement des maisons possédant une moustiquaire imprégnée vers les maisons voisines n'en possédant pas (Spitzen et al. 2017). Même si à l'heure actuelle, les causes des changements de comportements de piqûre pouvant découler d'une plasticité phénotypique ou de la sélection de traits héréditaires chez les populations de moustiques restent mal connues, leurs conséquences pourraient toutefois causer une augmentation de la transmission résiduelle du paludisme.

Influence des interactions intra/interspécifiques et de la constitution intrinsèque des insectes sur leurs rythmes journaliers

Différents types de relation entre les insectes et autres organismes vivants : compétition, prédation et parasitisme

Une multitude de relations existe entre les différents êtres vivants d'un écosystème, variant de l'union à l'antagonisme. Entre les espèces du même genre, ces relations peuvent le plus souvent déboucher sur la compétition comme généralement chez les insectes, pour le partage des ressources nutritives et des sites de reproduction. Mais lorsque ces différentes espèces n'appartiennent pas au même genre, la prédation et le parasitisme sont fréquemment rencontrés.

On parle de compétition lorsque deux espèces différentes occupent une même niche écologique et luttent pour l'occupation de cette niche. C'est une forme de relation qui s'observe beaucoup plus entre les insectes invasifs et les espèces autochtones appartenant au même genre. La compétition conduit toujours à la disparition d'une des deux espèces (généralement l'espèce autochtone lorsque l'espèce invasive arrive par migration). Si dans la compétition, les espèces ne s'attaquent pas

directement, cela est différent avec la prédation où l'une des espèces sert de nourriture à l'autre. Ce type d'association entraîne généralement une modification du comportement de la proie afin de survivre. Quant au parasitisme, c'est la relation utilisée par les pathogènes pour tirer profit d'un insecte (qui sera dans ce cas qualifié de vecteur) pour s'abriter, se nourrir ou souvent se reproduire afin de continuer leur cycle de développement ou leur perpétuation. Ce type d'association n'est bénéfique que pour l'espèce parasite. Le parasitisme est opposé au mutualisme, situation dans laquelle l'association procure des avantages aux deux espèces qui sont qualifiées de « partenaires » ou du commensalisme qui se définit comme une association dans laquelle une espèce profite d'une autre sans lui nuire. Le commensalisme et le mutualisme sont très rares chez les insectes contrairement au parasitisme, à la prédation et à la compétition.

Impact du parasitisme et de la prédation des insectes sur leurs rythmes journaliers.

Parmi les différents types de relation entre les insectes et/ou d'autres organismes vivants, le parasitisme et la prédation semblent les plus susceptibles de modifier les rythmes d'activité circadien des insectes.

Récemment, les effets du virus Zika (ZIKV) sur le développement des stades immatures d'*Aedes aegypti* ont été évalués et comparés à ceux des moustiques non infectés (Chaves et al. 2019). Les données obtenues ont montré que les œufs des moustiques infectés par le ZIKV avaient un taux d'éclosion nettement inférieur et un temps d'éclosion plus long. En outre, la période de développement larvaire était plus longue que celle des moustiques non infectés prouvant ainsi que la présence du ZIKV chez un moustique peut modifier son cycle de vie.

Le stress de la présence d'un prédateur dans une niche écologique peut amener les insectes à modifier leur comportement de vie afin d'échapper à une mort prématurée (Ball & Baker 1996 ; Gimonneau et al. 2010). Il n'est donc pas à exclure que certains insectes puissent donc émerger rapidement afin d'éviter leur prédateur. Cependant, l'évitement du prédateur peut entraîner d'autre part une modification du comportement de nutrition, et à l'extrême une sous-alimentation ; ce qui conduirait à un développement lent et de ce fait à une émergence très tardive. Cette sélection pour l'émergence précoce ou tardive des adultes peut donc modifier le taux de développement pré-adulte comme cela a été rapporté chez *Drosophila melanogaster* (Kumar et al. 2006).

Il est clair au vu de ce qui a été décrit précédemment, que plusieurs facteurs abiotiques tels la température, la lumière ou biotiques tels les interactions intra ou interspécifiques pouvant entraîner l'utilisation des insecticides (interactions Hommes-vecteurs) et d'autres, peuvent influencer sur les rythmes journaliers des insectes aussi bien au stade immature qu'au stade adulte, Cela peut conduire à l'observation de différences phénotypiques chez une même espèce. Aussi, ces facteurs peuvent agir de manière isolée ou couplée, indépendante ou non. Les saisons ne sont pas uniformes sur le globe terrestre et même là où elles sont semblables, une variabilité peut être observée dans leur durée ou leur répartition. Les facteurs abiotiques qui modifient les caractéristiques de vie des insectes en jouant sur leurs rythmes journaliers peuvent varier chez une même espèce selon son espace géographique. Ainsi, des auteurs suggèrent l'idée que la photopériode pourrait être le principal inducteur de l'activité temporelle dans le Nord tempéré, alors que la température pourrait être le facteur dominant dans le Sud (Rieger et al. 2012). Il devient donc évident que les insectes ont fait évoluer les horloges circadiennes pour s'adapter aux changements cycliques de leur environnement.

3. Conséquences des changements de rythmes journaliers

3.1. Conséquences intrinsèques

Les changements climatiques en cours vont entraîner à la longue un bouleversement majeur de l'environnement. Si les effets du réchauffement climatique rapide ont déjà des conséquences déjà sur les gènes de divers organismes, il faut cependant souligner que le niveau des réponses à ces changements chez ces derniers est souvent mal compris ou mal cerné du fait de leur lenteur dans la nature (Bradshaw & Holzapfel 2006). Par exemple, si nous prenons le cas des moustiques, le changement génétique d'un trait peut nécessiter environ cinq années avant d'être détectable (Bradshaw et al. 2004). Ainsi, ces différents changements génétiques chez ces organismes auront obligatoirement une incidence sur la chronologie des principaux événements de leur cycle de vie (Bradshaw & Holzapfel 2006). Les insectes, à l'instar des autres organismes, face à ces changements dans leur biologie, vont donc synchroniser leurs horloges circadiennes pour s'adapter à ces changements. Ainsi cette synchronisation marquée peut se ressentir chez ces insectes eux-mêmes mais aussi dans leur environnement immédiat à travers leurs conséquences.

Changement ou décalage du temps de reproduction et de développement

Les conséquences de l'adaptation des rythmes journaliers aux changements de l'environnement peuvent être perceptibles à presque tous les stades de développement des insectes.

En effet, l'indisponibilité des ressources bloque la vitellogenèse et donc la synthèse des ovocytes (qui présente un rythme circadien), qui à son tour va bloquer la ponte chez *D. melanogaster* (Allemand 1976). Ce blocage de la ponte pourrait par ailleurs s'expliquer par l'absence de cycle lumière/obscurité qui entrainerait une perturbation de la boucle de régulation centrale de l'horloge endogène et affecterait l'embryogenèse (Farnesi et al. 2018). Chez *Triatoma infestans*, le décalage de l'éclosion à l'aube ou l'humidité relative est maximale, contrôlée par l'horloge circadienne semble être liée aux conditions environnementales en évitant ainsi une dessiccation probable des œufs. De plus, il été observé que les insectes charognards tels que *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* et *Chrysomya megacephala* étaient capables d'ovi/larviposition au cours de la nuit dans l'hémisphère sud à cause de l'élévation de la température (Williams et al. 2017) alors qu'elles n'en sont pas capables dans l'hémisphère nord (Berg & Benbow 2013 ; Barnes et al. 2015). Ainsi, les changements climatiques en cours laissent présager d'une possible colonisation de nouvelles aires écologiques par les espèces invasives, ce qui pourrait entraîner l'apparition de nouveaux comportements circadiens à des plages horaires autrefois jugées impossibles ou quasi inexistantes.

Chez les larves, l'indisponibilité des ressources peut conduire à l'observation de profils différents lors du développement comme constaté chez *Calliphora vicina* où, pendant que les larves de grande taille (nourries normalement) entrent en diapause à la suite d'une exposition de jours de courtes durées, les larves de petite taille (soumises à la surpopulation et au stress alimentaire) échappent au programme de diapause pour devenir des pupes miniatures ou dans certains cas passent par une diapause plus courte que celles des larves de grande taille (Saunders 1997). En outre, l'effet synergique des fluctuations quotidiennes de la température en combinaison avec les phases de lumière et d'obscurité peut considérablement influencer des traits importants du cycle biologique et affecter le temps de développement des larves (Liefing et al. 2017).

L'une des conséquences de l'adaptabilité des rythmes journaliers est la possibilité de la sélection pour un développement plus court des stades pré-adultes contribuant ainsi à la sélection d'adultes plus aptes à la reproduction rapide du fait d'une période d'horloge plus courte comme observé chez les mouches *D. melanogaster* (Yadav & Sharma 2014). Cette capacité de se développer rapidement

peut favoriser l'adaptation des insectes à des gîtes éphémères, et plus loin, la colonisation de nouvelles niches écologiques. Ainsi, dans le contexte du changement climatique, l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales peut favoriser une augmentation du nombre d'insectes et une probabilité accrue d'infection par un agent pathogène dans le cas des insectes vecteurs (Tamayo et al. 2018), voire des risques d'épidémies.

Changements d'hôtes, de lieux, de périodes et de mode de piqûre

Le comportement d'alimentation est un facteur clé dans la biologie des insectes car il favorise la croissance, l'accouplement ainsi que les activités de vol et de reproduction. Les insectes selon leurs stades de vie, se nourrissent ainsi directement à partir des matières végétales (débris végétaux ou de nectar), de micro-organismes ou d'autres insectes par cannibalisme ou par prédation. Cependant, chez les insectes hématophages, la nécessité de repas sanguin, le plus souvent afin de permettre la maturation des œufs, fait que le comportement alimentaire peut avoir un intérêt épidémiologique du fait que la plupart des agents pathogènes transmis par les vecteurs aux vertébrés se fait lors repas de sang. De ce fait, un changement de comportement de piqûre peut avoir des conséquences néfastes mais aussi bénéfiques dans certains cas.

Le changement d'hôte est généralement rencontré dans les cas où un insecte piqueur n'arrive plus à avoir accès à son hôte d'origine. Dans des cas extrêmes, cette indisponibilité d'hôte peut déboucher sur la sélection d'espèces « non piqueuses » à travers l'expression de gènes exprimés à cet effet comme rapporté chez *Wyeomyia smithii* qui présente des populations piqueuses et non piqueuses (Bradshaw et al. 2018). Aussi, la persistance des insectes dans un environnement défavorable peut entraîner des comportements alimentaires plus prononcés vers des heures inhabituelles.

L'indisponibilité des hôtes peut aussi entraîner non seulement un changement de comportement de piqûre dans l'espace et le temps, mais également modifier certains comportements circadiens comme la ponte. A titre d'exemple, Charlwood & Graves (1987) furent les premiers à signaler dans la partie costale de Papouasie-Nouvelle-Guinée un décalage dans le comportement de piqûre chez *Anopheles farauti* Laveran et *An. koliensis* Owen dû à l'effet des insecticides, changement qui avait pour conséquence un rallongement de la durée du cycle de ponte et un changement d'habitudes de repos et de piqûre d'*An. farauti* qui jadis endophile était devenu exophile et exophage.

De récentes, études, tout en confirmant ces changements d'horaires et de lieux de piquêre, attirent l'attention sur le risque de sélection de populations exophages à cause de des comportements de piquêres précoces dus à la pression des insecticides sur les vecteurs (Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011) indépendamment de la saison, de même que chez des populations d'*An. funestus* ne présentant pas de gènes de résistance kdr (Moiroux et al. 2012).

Ces décalages des horaires de piquêres des moustiques vers les premières heures de la soirée, avant que les individus ne soient à l'intérieur et protégés par des moustiquaires comme dans le cas du paludisme, peuvent déboucher sur des taux de piquêres semblables à ceux d'avant l'intervention avec pour conséquence des niveaux de transmission plus élevés qu'avant l'intervention et donc faire échouer les campagnes de lutte antivectorielle de grande ampleur (Thomsen et al. 2017). De plus, il a été aussi démontré par des modèles prédictifs qu'en cas de passage à un comportement crépusculaire de recherche d'hôte, si ce comportement est déterminé, cela peut réduire l'efficacité des moustiquaires imprégnées au même titre que la résistance aux insecticides chez les moustiques piqueurs nocturnes (Briet & Chitnis 2013). De plus, il est possible que les insectes qui décalent leurs horaires ou lieux de piquêre afin d'avoir accès à un hôte, sélectionnent des gènes pour supporter ce changement de comportement. Un tel scénario rendrait inévitablement nul à la longue l'effet de certains outils comme les moustiquaires (Briet & Chitnis 2013) et la PID qui sont presque les seuls moyens de prévention de masse contre le paludisme.

3.2. Conséquences extrinsèques

Dissémination et colonisation de nouvelles niches

Les changements climatiques liés aux modifications environnementales causées par la déforestation et l'urbanisation favorisent une modification de l'écologie de nombreux animaux y compris les insectes vecteurs. Cette modification de l'écologie vectorielle à un impact sur l'occupation de la niche écologique par des vecteurs qui peut se faire selon la sélection des allèles favorables à cette adaptation avec à la clé, des différences comportementales. Coluzzi et al. (1979) ont montré que la diversité comportementale au sein du complexe *An. gambiae* était associée à un polymorphisme génétique intra spécifique ; ce polymorphisme génétique serait à la base de la structuration comportementale, c'est-à-dire que le choix du lieu de piquêre ou de repos serait associé à une variation génétique entre les individus au sein d'une même espèce ou d'espèces différentes

(Smits et al. 1996). Aussi, une étude de la constitution génétique des horloges circadiennes a permis de montrer des clines latitudinaux des gènes polymorphes liés à une importante différence régionale des populations de drosophiles (Sawyer et al. 1997), fournissant ainsi une explication sélective de la répartition géographique des gènes de l'horloge et un rare aperçu de l'interaction entre le polymorphisme moléculaire, le comportement, la biologie des populations et la sélection naturelle.

La capacité de l'adaptation des rythmes journaliers peut donc prédisposer les insectes à s'adapter et à vivre dans les niches écologiques différentes. Ainsi, les expressions génétiques plastiques observées chez *Ceratosolen solmsi* (Gu et al. 2014) découlant de l'effet de la lumière sur les horloges circadiennes et qui reflètent les différences d'adaptation des mâles et des femelles à leur environnement, nous pousse à croire que la pollution lumineuse peut aussi contribuer à travers la modulation du rythme circadien à l'adaptation des espèces vivant dans les milieux ruraux pauvres en intensité lumineuse nocturne à des milieux urbains fortement lumineux la nuit.

Ces possibles adaptations des insectes en général et des insectes vecteurs en particulier sont à craindre dans ce contexte de changements d'environnement et de climat découlant surtout de l'action de l'homme car elles seront sources d'émergence de nouvelles maladies humaines ou d'épidémies à cause du changement de comportements de ces insectes vecteurs. Certaines de ces adaptations sont de plus en vue visibles. Une observation diachronique chez la chenille processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa* a montré que l'aire de répartition de cette espèce s'est déplacée, allant jusqu'à 87 km vers le nord au-delà des limites habituelles entre 1972 et 2004 en France, mais aussi dans le nord de l'Italie (Alpes) avec un déplacement altitudinal de 110 à 230 m toujours entre 1975 à 2004. Ces expansions de l'aire géographique ont été attribuées à une augmentation de la survie hivernale due à une tendance au réchauffement au cours des trois dernières décennies (Battisti et al. 2005).

4. Conclusion et perspectives

En somme, l'adaptation des insectes à un environnement en mutation par le changement de leur rythme journalier apparaît donc comme une condition nécessaire à leur survie et à leur reproduction. Ainsi, cette adaptation peut donner lieu à l'observation de comportements ou de profils phénotypiques variables dans le temps et dans l'espace au sein d'une même population avec des conséquences allant de l'isolement reproductif jusqu'à la spéciation. Il est donc important dans le cas des insectes vecteurs de chercher à comprendre les mécanismes sous-jacents dans les changements de comportement de piqûre, de colonisation de nouvelles niches afin de réduire l'expansion des maladies ; cela nécessite une réévaluation des connaissances empiriques sur l'éthologie des insectes et leur biologie afin d'établir des modèles de prédiction de leur évolution.

Références

- Allemand R. Influence of light condition modification on the circadian rhythm of vitellogenesis and ovulation in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.* 1976;22(8):1075–80.
- Aschoff J. Circadian timing. *Ann N Y Acad Sci.* 1984; 423: 442–68.
- Aschoff J. Temporal orientation: Circadian clocks in animals and humans. *Animal Behaviour.* 1989; 37(6):881–96.
- Ball SL, Baker RL. Predator-Induced Life History Changes: Antipredator Behavior Costs or Facultative Life History Shifts? *Ecology.* 1996; 77(4):1116–24.
- Barnes KM, Grace KA, Bulling MT. Nocturnal Oviposition Behavior of Forensically Important Diptera in Central England. *J Forensic Sci.* 2015; 60(6):1601–4.
- Barrass R. The activity of *Glossina morsitans* Westwood (Diptera: Muscidae) in laboratory experiments. *Proc R Ent Soc Lond Ser A.* 1970a; 45(Pts. 7/9):114–22.
- Barrass R. The flight activity and settling behaviour of *Glossina morsitans* Westw. (Dipt., Muscidae) in laboratory experiments. *Bull Entomol Res.* 1970b; 59(4):627–35.
- Bateman M. The effect of light and temperature on the rhythm of pupal ecdysis in the Queensland Fruit-fly, *Dacus (Strumeta) Tryoni* (Frogg.). *Australian Journal of Zoology.* 1955; 3(1):22–33.

- Battisti A, Stastny M, Netherer S, Robinet C, Schopf A, Roques A, et al. Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecological Applications*. 2005; 15(6):2084–96.
- Beck SD. Physiology and Ecology of Photoperiodism 1. *Bulletin of the Entomological Society of America*. 1963; 9(1):8–16.
- Benna C, Bonaccorsi S, Wulbeck C, Helfrich-Forster C, Gatti M, Kyriacou CP, et al. *Drosophila timeless 2* is required for chromosome stability and circadian photoreception. *Curr Biol*. 2010; 20(4):346–52.
- Berg MC, Benbow ME. Environmental factors associated *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) oviposition. *J Med Entomol*. 2013; 50(2):451–7.
- Bertram SM, Harrison SJ, Thomson IR, Fitzsimmons LP. Adaptive plasticity in wild field cricket's acoustic signaling. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69247.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015; 526(7572):207–11.
- Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 2008; 54(9):1343–8.
- Bradshaw WE, Burkhart J, Colbourne JK, Borowczak R, Lopez J, Denlinger DL, et al. Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(5):1009–14.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. Interaction between photoperiod, temperature, and chilling in dormant larvae of the tree-hole mosquito, *Toxorhynchites rutilus* Coq. *Biol Bull*. 1977; 152(2):147–58.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. Climate change. Evolutionary response to rapid climate change. *Science*. 2006; 312(5779):1477–8.
- Bradshaw WE, Zani PA, Holzapfel CM. Adaptation to temperate climates. *Evolution*. 2004; 58(8):1748–62.
- Brady J. Circadian changes in central excitability - The origin of behavioural rhythms in tsetse flies and other animals? *Journal of Entomology Series A, General Entomology*. 1975; 50(2):79–95.
- Brady J, Crump AJ. The control of circadian activity rhythms in tsetse flies: Environment or physiological clock? *Physiological Entomology*. 1978; 3(3):177–90.
- Briet OJT, Chitnis N. Effects of changing mosquito host searching behaviour on the cost effectiveness of a mass distribution of long-lasting, insecticidal nets: a modelling study. *Malar J*. 2013; 12: 215.

- Bursell E. The Effect of Humidity on the Activity of Tsetse Flies. *Journal of Experimental Biology*. 1957; 34(1):42–51 pp.
- Buxton PA. *The Natural History of Tsetse Flies*. H. K. Lewis, London; 1955.
- Bünning E. [Endogenous daily rhythms as the basis of photoperiodism: Die endogene tagesperiodik als grundlage der photoperiodischen reaktion.]. *Plant Biology [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft]*. 1936; 54(10):590–607.
- Bünning E. *The physiological clock: Endogenous diurnal rhythms and biological chronometry*. New York; Berlin: Academic Press Springer; 1964.
- Charlwood JD, Graves PM. The effect of permethrin-impregnated bednets on a population of *Anopheles farauti* in coastal Papua New Guinea. *Med Vet Entomol*. 1987; 1(3):319–27.
- Chaves BA, Junior ABV, Silveira KRD, Paz A da C, Vaz EB da C, Araujo RGP, et al. Vertical transmission of zika virus (flaviviridae, flavivirus) in amazonian aedes aegypti (diptera: Culicidae) delays egg hatching and larval development of progeny. *J Med Entomol*. 2019; 56(6):1739–44.
- Clements AN. *The biology of mosquitoes*. Vol. 2. Wallingford: CABI Publishing; 1999.
- Cole CL, Adkisson PL. Daily Rhythm in the Susceptibility of an Insect to a Toxic Agent. *Science*. 1964; 144(3622): 1148–9.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979; 73(5):483–97.
- Comte de Buffon GLL. *Histoire naturelle*. Vol. 36. Imprimerie Royale ; 1749.
- Coosemans M, D'Alessandro U. [Pleading for insecticide treated nets in malaria control programmes]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2001; 94(2 Pt 2):169–73.
- Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(8):617–26.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, et al. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology*. 2009; 9(1):16.
- Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin J-B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J*. 2008; 7:189.
- Darriet F. [Field trial of the efficacy of 3 pyrethroids in the control of malaria vectors]. *Parassitologia*. 1991; 33(2-3):111–9.
- Darriet F. Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides. *IRD* ; 2007. (Didactiques).

- Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. Document mimeographié OMS, WHO/VBC/84899 /WHO/MAL/841008. 1984;20 p.
- Davies IJ. Sampling aquatic insect emergence in a manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. In: Downing JA, Rigler FHP in FW, editors. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford; 1984. pp. 161–227.
- Denlinger DL. Who controls the rhythm of tsetse parturition: Mother or larva? *Physiological Entomology*. 1983; 8(1):25–8.
- Denlinger DL, Hahn DA, Merlin C, Holzapfel CM, Bradshaw WE. Keeping time without a spine: What can the insect clock teach us about seasonal adaptation? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017; 372(1734).
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(6):617–22.
- Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black WC4. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? *Trends Parasitol*. 2009; 25(5):213–9.
- Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999; 96(2):271–90.
- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. *Chronobiology: biological timekeeping*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2004.
- Edgar RS, Green EW, Zhao Y, Ooijen G van, Olmedo M, Qin X, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*. 2012; 485(7399):459–64.
- Farnesi LC, Barbosa CS, Araripe LO, Bruno RV. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(4): e170362.
- Fondacaro JD, Butz A. Circadian rhythm of locomotor activity and susceptibility to methyl parathion of adult *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ann Entomol Soc Am*. 1970; 63(4):952–5.
- Foster RG, Kreitzman L. *Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing*. London: Profile Books; 2004.
- Garner WW, Allard HA. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of agricultural research*. 1920; 18(7):553–606.
- Giebultowicz JM. Insect circadian clocks: Is it all in their heads? *J Insect Physiol*. 1999; 45(9):791–800.

- Giebultowicz JM, Ivanchenko M, Vollintine T. Organization of the insect circadian system: Spatial and developmental expression of clock genes in peripheral tissues of *Drosophila melanogaster*. In: Denlinger DL, Giebultowicz JM, Saunders DS, editors. Insect timing: Circadian rhythmicity to seasonality. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2001. pp. 31–42.
- Gillett JD. Contributions to the oviposition-cycle by the individual mosquitoes in a population. *Journal of Insect Physiology*. 1962; 8(6):665–81.
- Gillett JD, Corbet PS, Haddow AJ. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus). VI. *Ann Trop Med Parasitol*. 1961; 55:427–31.
- Gillett JD, Haddow AJ, Corbet PS. The sugar feeding cycle in a cage population of mosquitoes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1962; 5(3):223–32.
- Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol*. 2010; 21(5):1087–92.
- Gu H-F, Xiao J-H, Niu L-M, Wang B, Ma G-C, Dunn DW, et al. Adaptive evolution of the circadian gene timeout in insects. *Scientific reports*. 2014; 4:4212.
- Guarneri AA, Lazzari C, Diotaiuti L, Lorenzo MG. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*. 2002; 27(2):142–7.
- Haddow AJ, Gillett JD, Corbet PS. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus), V. *Ann Trop Med Parasitol*. 1961; 55:343–56.
- Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in drosophila. *Adv Genet*. 2011; 74: 141–73.
- Harris RMB, McQuillan P, Hughes L. Reprint of: The effectiveness of common thermo-regulatory behaviours in a cool temperate grasshopper. *J Therm Biol*. 2015; 54:12–9.
- Hong S-F, Saunders DS. Internal desynchronisation in blow fly (*Calliphora vicina*) locomotor activity rhythms: evidence for a complex circadian pacemaker. *Biological Rhythm Research*. 1998; 29(4):387–96.
- Johns RC, Boone J, Leggo JJ, Smith S, Carleton D, Quiring DT. Temporal and spatial variations in microclimate influence the larval foraging behaviors and performance of a conifer-feeding sawfly. *Environ Entomol*. 2012; 41(3):594–602.
- Jones MDR. Delayed effect of light on the mosquito "clock". *Nature*. 1973 Oct; 245(5425): 384–5.
- Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. Light-on Effects and the Question of Bimodality in the Circadian Flight Activity of the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*. 1972a;57(2): 347–57.

- Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. The Circadian Rhythm of Flight Activity of the Mosquito *Anopheles Gambiae*: The Light-Response Rhythm. *Journal of Experimental Biology*. 1972b; 57(2):337–46.
- Jones MDR, Ford MG, Gillett JD. Light-on and light-off effects on the circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*. 1966 Aug;211(5051):871–2.
- Jones MDR, Gubbins SJ. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiological Entomology*. 1978; 3(3):213–20.
- Jones MDR, Hill M, Hope AM. The circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*: phase setting by the light regime. *J Exp Biol*. 1967; 47(3):503–11.
- Jordan S, Hubbard SF. Influence of humidity and temperature on the diel periodicity of oviposition of *Toxorhynchites moctezuma* (Diptera: Culicidae) in the field. *J Med Entomol*. 1991; 28(2):241–5.
- Kaiser TS, Neumann D, Heckel DG. Timing the tides: genetic control of diurnal and lunar emergence times is correlated in the marine midge *Clunio marinus*. *BMC Genet*. 2011; 12:49.
- Kaiser TS, Poehn B, Szkiba D, Preussner M, Sedlazeck FJ, Zrim A, et al. The genomic basis of circadian and circalunar timing adaptations in a midge. *Nature*. 2016; 540(7631):69–73.
- Kitau J, Oxborough RM, Tungu PK, Matowo J, Malima RC, Magesa SM, et al. Species shifts in the *Anopheles gambiae* complex: do LLINs successfully control *Anopheles arabiensis*? *PLoS One*. 2012; 7(3): e31481.
- Klarsfeld A, Rouyer F. Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*. 1998; 13(6):471–8.
- Kogure M. The Influence of Light and Temperature on Certain Characters of The Silkworm, *Bombyx Mori*. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*. 1933; 4(1):1–93.
- Koukkari WL, Sothorn RB. *Introducing biological rhythms: A primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment*. New York: Springer ©, editor. Springer US; 2006.
- Kumar S, Vaze KM, Kumar D, Sharma VK. Selection for early and late adult emergence alters the rate of pre-adult development in *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol*. 2006; 6:57.
- Kyriacou CP, Oldroyd M, Wood J, Sharp M, Hill M. Clock mutations alter developmental timing in *Drosophila*. *Heredity (Edinb)*. 1990 ; 64 (Pt 3): 395–401.
- Lazzari CR. Circadian rhythm of egg hatching in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 1991; 28(5):740–1.

- Lengeler C. Insecticide treated bednets and curtains for malaria control. Cochrane Database of Systematic Reviews. 1998; (2).
- Lewis CB, Bletchly JD. The Emergence Rhythm of the Dung-Fly, *Scopeuma* (= *Scatophaga*) *stercoraria* (L.). The Journal of Animal Ecology. 1943; 12(1):11.
- Lewis DJ. The Behaviour of the Larvae of Tsetse-Flies before Pupation. Bulletin of Entomological Research. 1934; 25(2):195–200.
- Li D, Yuan J, Kopp R (Bob). Escalating global exposure to compound heat-humidity extremes with warming. Environmental Research Letters. 2020;
- Liefting M, Cosijn J, Eilers J. Synergistic effect of daily temperature fluctuations and matching light-dark cycle enhances population growth and synchronizes oviposition behavior in a soil arthropod. J Insect Physiol. 2017; 96:108–14.
- Lin Y-H, Lee C-M, Huang J-H, Lee H-J. Circadian regulation of permethrin susceptibility by glutathione S-transferase (BgGSTD1) in the German cockroach (*Blattella germanica*). J Insect Physiol. 2014; 65:45–50.
- Loher W, Chandrashekar MK. Circadian rhythmicity in the oviposition of the grasshopper *Chorthippus curtipennis*. J Insect Physiol. 1970; 16(8):1677–88.
- Lubinski AJ, Page TL. The optic lobes regulate circadian rhythms of olfactory learning and memory in the cockroach. J Biol Rhythms. 2016; 31(2):161–9.
- Luce GG. Biological rhythms in psychiatry and medicine. Washington, DC: Natl Inst Mental Health, US Dept. Health, Education; Welfare, 183 pp. 1970.
- Mairan DJ. Observation botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences Paris. 1729; pp35.
- Marcovitch S. Plant lice and light expoqure. Science. 1923; 58(1513):537–8.
- Mbogo CN, Baya NM, Ofulla AV, Githure JI, Snow RW. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. Med Vet Entomol. 1996; 10(3):251–9.
- Minis DH, Pittendrigh CS. Circadian oscillation controlling hatching: Its ontogeny during embryogenesis of a moth. Science. 1968; 159(3814):534–6.
- Miyazaki Y, Numata H. Responsiveness to photoperiodic changes in the circannual rhythm of the varied carpet beetle, *Anthrenus verbasci*. J Comp Physiol a Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2009; 195(3):241–6.
- Mohammed A, Chadee DD. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 2011; 119(1):38–43.
- Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. J Infect Dis. 2012; 206(10):1622–9.

- Moore-Ede MC, Fuller CA, Sulzman FM. The clocks that time us: Physiology of the circadian timing system. Cambridge (Mass.): Harvard University Press; 1982.
- Nayar JK. Endogenous diurnal rhythm of pupation in a mosquito population. *Nature*. 1967a; 214(5090):828–9.
- Nayar JK. The pupation rhythm in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). II. Ontogenetic timing, rate of development, and endogenous diurnal rhythm of pupation. *Ann Entomol Soc Am*. 1967b; 60(5):946–71.
- Neumann D. Diel eclosion rhythm of a sublittoral population of the marine insect *Pontomyia pacifica*. *Marine Biology*. 1986; 90(3):461–5.
- Nikhil KL, Ratna K, Sharma VK. Life-history traits of *Drosophila melanogaster* populations exhibiting early and late eclosion chronotypes. *BMC Evol Biol*. 2016; 16:46.
- Nunes MV, Saunders DS. The effect of larval temperature and photoperiod on the incidence of larval diapause in the blowfly, *Calliphora vicina*. *Physiological Entomology*. 1989; 14(4):471–4.
- Oliver DR. Life History of the Chironomidae. *Annual Review of Entomology*. 1971; 16(1):211–30.
- Page TL. Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. *Science*. 1982; 216(4541):73–5.
- Page TL. Clocks and circadian rhythms. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. In: Kerkut G G. A., editor. Pergamon Press, Oxford; 1985. pp. 171–223. (Nervous system: Sensory; vol. 6).
- Parker FD, Welch JB, Matlock RBJ. Influence of habitat, season, and attractant on adult behavior of the screwworm (Diptera: Calliphoridae) in a tropical dry zone in Costa Rica. *J Econ Entomol*. 1993; 86(5):1359–75.
- Phelps RJ, Jackson PJ. Factors influencing the moment of larviposition and eclosion in *Glossina morsitans orientalis* Vanderplank (Diptera: Muscidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 1971; 34(1):145–57.
- Pittendrigh CS. The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Z Pflanzenphysiol*. 1966; 54:275–307.
- Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58(4):1762–7.
- Pittendrigh CS. Circadian systems: Entrainment. In: Aschoff J, editor. Boston, MA: Springer US; 1981. pp. 95–124.
- Pittendrigh CS, Minis DH. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*. 1964; 98(902):261–94.
- Pszczolkowski MA, Dobrowolski M. Circadian dynamics of locomotor activity and deltamethrin susceptibility in the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Phytoparasitica*. 1999; 27(1):19–25.

- Ranque P, Toure YT, Soula G, Du L, Diallo Y, Traore O, et al. [Utilization of mosquitoes impregnated with deltamethrin in the battle against malaria]. *Parassitologia*. 1984; 26(3):261–8.
- RBM. Global Partnership to Roll Back Malaria: The African Summit on Roll Back Malaria, Abuja, Nigeria, April 25, 2000. 2000.
- Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, et al. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*. 2011; 10: 184.
- Rieger D, Fraunholz C, Popp J, Bichler D, Dittmann R, Helfrich-Forster C. The fruit fly *Drosophila melanogaster* favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. *J Biol Rhythms*. 2007; 22(5):387–99.
- Rieger D, Peschel N, Dusik V, Glotz S, Helfrich-Forster C. The ability to entrain to long photoperiods differs between 3 *Drosophila melanogaster* wild-type strains and is modified by twilight simulation. *J Biol Rhythms*. 2012; 27(1):37–47.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V, Carnevale P. [The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985;65 Suppl 2:201–14.
- Roca MJ, Lazzari CR. Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygropreference and eclosion success. *Journal of Insect Physiology*. 1994; 40(10):901–7.
- Rowland M. Behaviour and fitness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Med Vet Entomol*. 1991; 5(2):193–206.
- Rupp H. [Contribution to the control of tsetse flies; effect of attractive materials impregnated with DDT on *Glossina palpalis, ssp. martinii* Zpt]. *Acta Trop*. 1952; 9(4):289–303.
- Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*. 2011; 10:80.
- Rymer J, Bauernfeind AL, Brown S, Page TL. Circadian rhythms in the mating behavior of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *J Biol Rhythms*. 2007; 22(1):43–57.
- Sabrosky CW, Larson I, Nabours RK. Experiments with Light upon Reproduction, Growth and Diapause in Grouse Locusts (*Acrididae, Tetrigenae*). *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)*. 1933; 36:298–300.
- Satralkar MK, Khare PV, Keny VL, Chhakchhuak V, Kasture MS, Shivagaje AJ, et al. Effect of light intensity on the oviposition rhythm of the altitudinal strains of *Drosophila ananassae*. *Chronobiol Int*. 2007; 24(1):21–30.
- Saunders DS. Insect photoperiodism in biological rhythms eds. Jürgen aschoff. In: Aschoff J, editor. Boston, MA: Springer US; 1981. pp. 411–47.

- Saunders DS. Insect clocks. Pergamon Press, Oxford; 1982. (2nd ed.).
- Saunders DS. The circadian basis of ovarian diapause regulation in *Drosophila melanogaster*: is the period gene causally involved in photoperiodic time measurement? *J Biol Rhythms*. 1990; 5(4):315–31.
- Saunders DS. Under-sized larvae from short-day adults of the blow fly, *Calliphora vicina*, side-step the diapause programme. *Physiological Entomology*. 1997; 22(3):249–55.
- Saunders DS, Gillanders SW, Lewis RD. Light-pulse phase response curves for the locomotor activity rhythm in Period mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 1994; 40(11):957–68.
- Saunders DS, Henrich VC, Gilbert LI. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(10):3748–52.
- Saunders DS, Hong S-F. Effects of temperature and temperature-steps on circadian locomotor rhythmicity in the blow fly *Calliphora vicina*. *Journal of Insect Physiology*. 2000; 46(3):289–95.
- Saunders DS, Macpherson JN, Cairncross KD. Maternal and larval effects of photoperiod on the induction of larval diapause in two species of fly, *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*. *Exp Biol*. 1986; 46(1):51–8.
- Savage HM, Anderson M, Gordon E, McMillen L, Colton L, Charnetzky D, et al. Oviposition activity patterns and West Nile virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2006; 43(6):1227–38.
- Sawadogo PS, Namountougou M, Toe KH, Rouamba J, Maiga H, Ouedraogo KR, et al. Swarming behaviour in natural populations of *Anopheles gambiae* and *An. coluzzii*: review of 4 years survey in rural areas of sympatry, Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop*. 2014; 132 Suppl: S42–52.
- Sawadogo SP, Costantini C, Pennetier C, Diabate A, Gibson G, Dabire RK. Differences in timing of mating swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formerly *An. gambiae* M and S molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors*. 2013a; 6:275.
- Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, et al. Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol*. 2013b; 50(2):285–93.
- Sawyer LA, Hennessy JM, Peixoto AA, Rosato E, Parkinson H, Costa R, et al. Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science*. 1997; 278(5346):2117–20.

- Schellenberg JR, Abdulla S, Nathan R, Mukasa O, Marchant TJ, Kikumbih N, et al. Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. *Lancet*. 2001; 357(9264):1241–7.
- Shaw B, Fountain MT, Wijnen H. Recording and reproducing the diurnal oviposition rhythms of wild populations of the soft- and stone- fruit pest *Drosophila suzukii*. *PLoS One*. 2018; 13(10): e0199406.
- Sheppard AD, Rund SSC, George GF, Clark E, Acri DJ, Duffield GE. Light manipulation of mosquito behaviour: Acute and sustained photic suppression of biting activity in the *Anopheles gambiae* malaria mosquito. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):255.
- Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, et al. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019; 116(30):15086–95.
- Shindey R, Varma V, Nikhil KL, Sharma VK. Evolution of circadian rhythms in *Drosophila melanogaster* populations reared in constant light and dark regimes for over 330 generations. *Chronobiol Int*. 2017; 34(5):537–50.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol*. 2009; 9:17.
- Skopik SD, Takeda M. Circadian control of oviposition activity in *Ostrinia nubilalis*. *Am J Physiol*. 1980; 239(3): R259–64.
- Smith A, Chabeda PI. A verandah-trap hut for studying the house-frequenting habits of mosquitoes and for assessing insecticides. IV. The effect of tetramethrin on the behaviour and mortality of *Anopheles gambiae* Giles. *Bull Entomol Res*. 1969; 59(3):457–63.
- Smith PH. Genetic manipulation of the circadian clock's timing of sexual behaviour in the Queensland fruit flies, *Dacus tryoni* and *Dacus neohumeralis*. *Physiological Entomology*. 1979; 4(1):71–8.
- Smits A, Roelants P, Van Bortel W, Coosemans M. Enzyme polymorphisms in the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex related to feeding and resting behavior in the Imbo Valley, Burundi. *J Med Entomol*. 1996; 33(4):545–53.
- Spitzen J, Koelewijn T, Mukabana WR, Takken W. Effect of insecticide-treated bed nets on house-entry by malaria mosquitoes: The flight response recorded in a semi-field study in Kenya. *Acta Trop*. 2017; 172: 180–5.
- Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(6):591–6.
- Sweeney BM, Hastings JW. Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1960; 25: 87–104.

- Tamayo LD, Guhl F, Vallejo GA, Ramirez JD. The effect of temperature increase on the development of *Rhodnius prolixus* and the course of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(8): e0006735.
- Thomsen EK, Koimbu G, Pulford J, Jamea-Maiasa S, Ura Y, Keven JB, et al. Mosquito Behavior Change After Distribution of Bednets Results in Decreased Protection Against Malaria Exposure. *J Infect Dis*. 2017; 215(5):790–7.
- Truman JW. Temperature sensitive programming of the silkworm flight clock: A mechanism for adapting to the seasons. *Science*. 1973; 182(4113):727–9.
- Tun-Lin W, Burkot TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med Vet Entomol*. 2000; 14(1):31–7.
- Van Herrewege J. [Intervention of olfactory and gustatory stimuli on oviposition of *Drosophila melanogaster*]. *Acad Sci Paris C R Ser D*. 1970; 271(1):108–10.
- Vinogradova EB. The pattern of reactivation of diapausing larvae in the blowfly, *Calliphora vicina*. *J Insect Physiol*. 1974; 20(12):2487–96.
- WHO Roll Back Malaria: a global partnership, 1 September 1998, Geneva: WHO, RBM/Draft/1; 1998.
- WHO Expert Committee on Malaria (1956; Athens, Greece). WHO Expert Committee on Malaria, Athens, 20–28 June 1956: sixth report. 1956.
- Williams KA, Wallman JF, Lessard BD, Kavazos CRJ, Mazungula DN, Villet MH. Nocturnal oviposition behavior of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in the southern hemisphere (South Africa and Australia) and its forensic implications. *Forensic Sci Med Pathol*. 2017; 13(2):123–34.
- Yadav P, Sharma VK. Correlated changes in life history traits in response to selection for faster pre-adult development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology*. 2014; 217(Pt 4):580–9.
- Yoshimura M. Seasonal and daily flight timing of oviposition in several stonefly species (plecoptera) in the field. *Zoolog Sci*. 2004; 21(2):189–95.
- Zheng X, Sehgal A. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. *Genetics*. 2008; 178(3):1147–55.
- Zimmerman WF, Pittendrigh CS, Pavlidis T. Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *Journal of Insect Physiology*. 1968; 14(5):669–84.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

“La nature commence par une cause et finit par une expérience.”

Léonard de Vinci

METHODOLOGIE GENERALE

L'étude des rythmes d'activité locomotrice s'est déroulée en conditions contrôlées de laboratoire. Cependant l'acquisition du matériel de travail biologique a nécessité des collectes sur le terrain.

1. Matériel biologique : les anophèles vecteurs du complexe *Anopheles gambiae*

1.1. Site de collecte des anophèles adultes utilisés dans notre étude

Les collectes des anophèles utilisées dans nos études ont été réalisées dans le village de Bama (11° 22' 00" Nord, 4° 25' 00" Ouest) et dans le hameau de Loungo (11° 34' 60" Nord, 4° 34' 00" Ouest) (village de Dandé) situés dans la province du Houët et la région des Hauts-Bassins, respectivement à 31 km et 65 km au nord de Bobo-Dioulasso, dans le sud-ouest du Burkina (Fig. 9). Les deux villages sont situés dans une savane soudanienne. Bama est entouré de près de 1 200 ha de rizières irriguées avec une saison des pluies s'étendant de mai à octobre et une moyenne annuelle de 1 200 mm de pluie (Costantini et al. 2009). Bama est soumis à un phénomène de ségrégation en cours au sein du complexe *Anopheles gambiae* où *Anopheles coluzzii* est l'espèce prédominante à plus de 95% tout au long de l'année (Robert et al. 1989 ; Diabate et al. 2002). Quant au village de Loungo c'est une zone d'activité agro-pastorale temporaire. La répartition des trois espèces dans le complexe est dépendante des périodes de l'année. En début de la saison pluvieuse (juin) jusqu'au milieu de la saison (août - septembre) *Anopheles coluzzii* prédomine (80% de la population) suivie d'*An. gambiae* (18%) et d'*An. arabiensis* (<2%). Puis, vers la fin de la saison hivernale (entre la mi-octobre et fin novembre) s'installe un équilibre en termes de population tendant vers une parité entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* avec *An. arabiensis* demeurant autour de 2% (Données d'observation du terrain de Dr DA Dari).

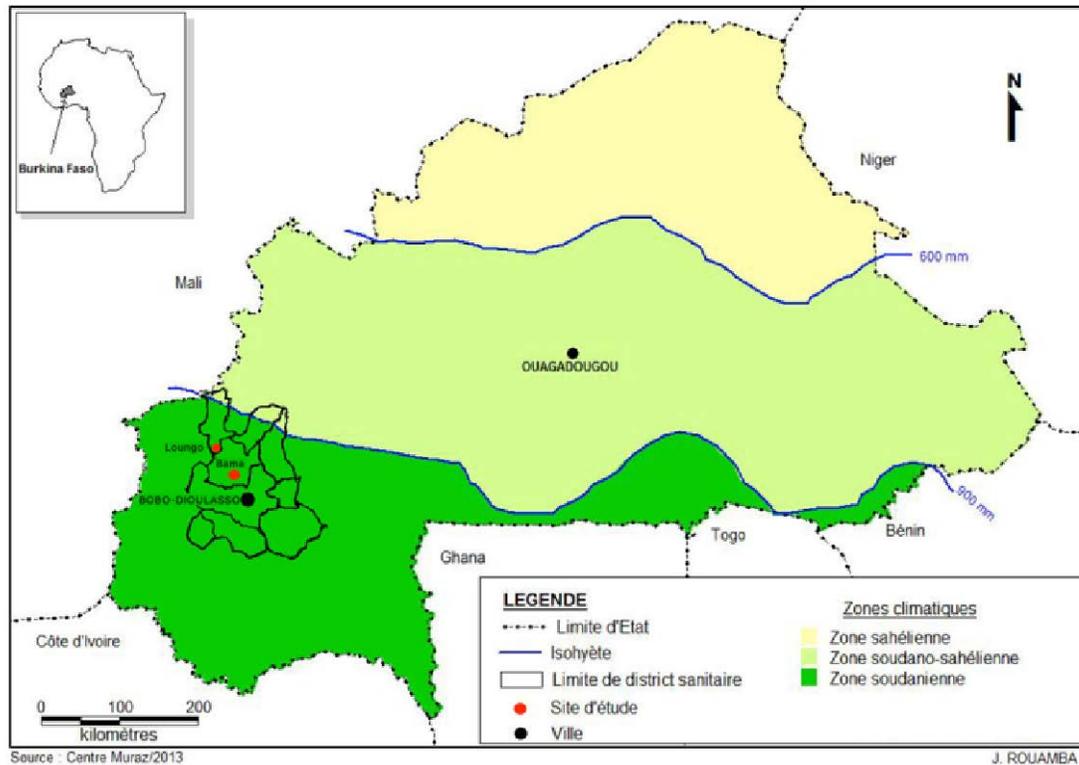


Figure 9 : Carte du Burkina Faso avec les différents sites de collecte des anophèles (Source : Centre Muraz, modifié)

1.2. Collecte des anophèles adultes

Il existe plusieurs méthodes de collecte des anophèles dont les plus usuelles sont : (i) la collecte par aspersion intradomiciliaire d'insecticide (généralement à base de pyrèthre) ; (ii) la capture sur appât humain ou animal et (iii) la capture par un aspirateur à bouche. Avec l'aspersion d'insecticide, les spécimens collectés sont ramassés étant morts ou assommés. Cette technique ne répondait pas à notre protocole qui était de récolter les moustiques vivants. Si la capture sur appât et la capture par aspirateur à bouche permettent toutes deux de collecter les moustiques vivants, nous avons privilégié la capture par aspirateur à bouche car elle permet de récolter les anophèles gorgés, semi ou complètement gravides, endophiles et anthropophages à la différence de la capture sur appât qui, si elle est pratiquée sur homme, se doit de collecter les anophèles avant la piqûre et si elle est pratiquée sur animal ciblerait logiquement les espèces plus ou moins zoophiles. La récolte de la faune anophélienne intradomiciliaire a été effectuée très tôt le matin entre 7h et 9 h, dans les maisons dont les habitants avaient donné leur accord préalable. Seules les femelles gorgées,

semi-gravides et gravides morphologiquement identifiées comme *An. gambiae s.l* en utilisant les clés d'identification de Gillies & De Meillon (1968) ont été immédiatement conservées dans des cages avec un coton imbibé de solution glucosée afin de les hydrater. Une serpillière humide était ensuite déposée sur les cages afin de les préserver vivants au cours du transfert du terrain à l'insectarium du Centre Muraz/IRSS de Bobo-Dioulasso. Deux collectes ont été réalisées en mai 2018 à Bama afin d'établir une colonie d'*Anopheles coluzzii* devant servir pour les études physiologiques et d'état nutritionnel. A Longo par contre, quatre collectes ont été réalisées à raison d'une collecte par mois entre juillet et octobre 2018. Ces anophèles collectés ont servi à l'étude du portage du gène kdr sur les rythmes d'activité journalière. Les anophèles, quelle que soit la ligne de test envisagé, une fois au Centre Muraz de Bobo-Dioulasso, ont été gardés à l'insectarium à une température de 27 ± 2 °C et $75 \pm 5\%$ d'humidité relative pendant deux jours afin de permettre aux femelles gorgées ou semi-gravides de digérer totalement leur repas de sang et de devenir gravides.

1.3. Élevage et identification des anophèles

1.3.1. Élevage et identification d'*An. coluzzii* utilisé pour l'établissement de la colonie

Pour l'étude de l'effet du statut d'insémination et de nutrition sur le rythme d'activité (Chapitre 3), nous avons procédé à l'établissement d'une colonie d'*An. coluzzii*. Ainsi donc, deux jours après les collectes sur le terrain, les femelles *An. gambiae s.l.* gravides, ont été disposées individuellement dans des gobelets en plastique transparent de 200 ml, remplis d'eau au quart et numérotés, afin de recueillir les œufs. Quarante-huit heures après, les femelles ayant pondu étaient retirées et placées dans des tubes Eppendorf® (1,5 mL) selon leur numéro et gardées pendant 30 min à -20°C afin de les tuer. Une extraction de l'ADN à l'aide du protocole CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle 1987) modifié et une réaction de polymérisation en chaîne (RPC ou PCR en anglais) (Santolamazza et al. 2008) ont été réalisées afin d'identifier l'espèce de chaque anophèle ayant pondu. Seuls les œufs issus des femelles identifiées comme *Anopheles coluzzii* ont été transférés dans des bacs (30 cm x 20 cm) contenant 1 litre d'eau à raison de 200 larves par bac. Les larves ont été nourries *ad libitum* avec de la nourriture industrielle pour alevins *Tetramin™ baby fish food* jusqu'à l'émergence des adultes F₁. A partir de ces F₁, une colonie a été établie en mai 2017. La colonie a0 été élevée dans des conditions standard (27 ± 2 °C ; $70 \pm 5\%$ d'humidité relative et 12 h : 12 h de photopériode LD, sans transitions à l'aube et au crépuscule) comme décrit

par Ruiz et al. (2019). Ainsi, les anophèles utilisés pour les expériences de physiologie et d'état nutritionnel provenaient de cette colonie.

1.3.2. Élevage et identification des membres du complexe *An. gambiae* pour les autres études

Pour les études de l'effet de kdr sur les rythmes d'activité (Chapitre 4), les femelles collectées sur le terrain, une fois gravides, ont été regroupées dans une grande cage (30 cm x 20 cm x 20 cm). Un pondoir constitué d'une boîte de Pétri dument remplie de coton entassé et gorgé d'eau, recouverte par une feuille de papier, était déposé dans la cage afin de recueillir les œufs. Quarante-huit heures après le dépôt, les pondoirs étaient retirés et les œufs obtenus mis en eau dans des bacs (30 cm x 20 cm). Les larves issues de l'éclosion des œufs ont été nourries *ad libitum* à l'aide de la *Tetramin™ baby fish food* jusqu'à l'obtention des nymphes. Les larves ont été élevées dans des conditions standard (27 ± 2 °C ; $70 \pm 5\%$ d'humidité relative ; 12 h : 12 h de photopériode LD, sans transition à l'aube et au crépuscule) comme décrit par Ruiz et al. (2019). Les nymphes ont été placées individuellement dans des tubes de plexiglas (L=9,3 cm ; D=2,5 cm) dans un peu d'eau afin d'avoir des femelles vierges (n'ayant eu aucun contact avec les mâles). La détermination des statuts d'espèces et de résistance a été réalisée après le prélèvement d'une aile. Les restes du moustique étaient ainsi déposés dans le tube d'origine portant le numéro d'identification du moustique. Après l'extraction de l'ADN toujours selon le protocole CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle 1987) modifié, deux PCR ont été réalisées à la suite de l'extraction. La première avait pour objectif de déterminer le statut d'espèce (Santolamazza et al. 2008) et la seconde pour déterminer le statut de résistance (Martinez-Torres et al. 1998).

Il faut noter que les anophèles des groupes testés dans nos différentes expériences ont tous été pré-synchronisés en condition de régime LD à partir du stade nymphal jusqu'au quatrième ou sixième jour après l'émergence selon l'étude.

2. Matériel d'enregistrement des rythmes circadiens

2.1. Présentation du matériel de mesure du rythme d'activité

Le dispositif d'enregistrement du rythme d'activité comprend les tubes contenant les anophèles et le moniteur d'activité locomotrice (LAM) relié à un ordinateur.

2.1.1. Confection des tubes devant contenir les anophèles

Pour enregistrer le rythme d'activité, les moustiques sont individuellement déposés à l'intérieur d'un tube à hémolyse qui peut être en matériau de verre ou en plexiglas, dans tous les cas, transparents. Dans notre étude, nous avons uniquement utilisé des tubes en plexiglas. Chaque tube avait une longueur de 9,3 cm et un diamètre de 2,5 cm. Les tubes bien que neufs, étaient nettoyés après leur déballage en les immergeant dans de l'eau javellisée pendant 20 minutes, puis dans de l'eau distillée pendant une heure et enfin rincés avec de l'eau distillée avant de les laisser sécher. Après le séchage une boule de coton enroulée était déposée au fond du tube, puis compactée de sorte à avoir 1 cm de hauteur. A l'aide d'une seringue, 10 ml d'une solution injectable de sérum glucosé pharmaceutique, dosé à 5% (50 mg de glucose dans 1 litre d'eau pour préparation injectable) était utilisée pour mouiller délicatement le coton sans éclabousser la paroi du tube. L'utilisation de sérum glucosé officinal avait pour but d'éviter l'apparition rapide de champignons dans les tubes et aussi pour avoir une solution stérile et homogène. Une fois le coton engorgé de solution glucosée, le tube était laissé au repos pendant 10 min afin de permettre au coton de bien absorber la solution. Environ 5 à 7 ml de solution glucosée restait dans le coton. Puis le surplus de solution glucosée était retiré à l'aide d'une seringue et les tubes, toujours ouverts, étaient regroupés par 32 puis placés dans un portoir pour tubes. Dix heures plus tard, le bas des tubes était recouvert de ruban adhésif jusqu'au niveau du coton, puis les femelles anophèles étaient introduites individuellement dans des tubes. Les femelles étaient nourries *ad libitum* à l'aide de coton imbibé d'eau glucosée stérile disposé au fond du tube. Un bouchon de coton hyper enroulé servait à boucher le tube. Toute la paroi du tube était alors recouverte à l'aide du ruban adhésif opaque à l'exception d'une bande vide d'un centimètre au centre du tube. Un nombre constant par LAM de tubes vides (ou tubes contrôles) ne contenant pas de moustique était défini par régime (LD ou DD). L'ajout de ces tubes vides comme contrôle découlait du constat fait lors des tests de mise au point de notre dispositif, de la détection (comptage) par le système infrarouge du LAM de mouvements dans les tubes vides. Ce constat révélait ainsi donc la possibilité de comptage des passages d'un moustique d'un tube donné par un tube adjacent. Afin de corriger ce biais, nous avons recouvert les parois des tubes à l'exception de la bande centrale de 1 cm (Figure 10) mais nous avons aussi continué à utiliser des tubes vides comme contrôles pour s'assurer qu'il n'y avait plus de détection de passage de moustique d'un tube à un autre.



Figure 10 : Tubes à hémolyse : A) nu contenant une femelle anophèle ; B) recouvert de ruban adhésif

2.1.2. Le Moniteur d'activité locomotrice (LAM) (voir Figure 7)

2.2. Enregistrement du rythme d'activité

Après la constitution des groupes de moustiques dont nous voulions mesurer les rythmes, les tubes contenant les anophèles étaient placés horizontalement dans les canaux du LAM pour faire correspondre la bande non recouverte du tube avec le jeu circulaire de sources/détecteurs d'infrarouge du LAM permettant d'enregistrer le passage de l'anophèle à l'intérieur du tube. A chaque séance d'enregistrement, nous avons utilisé sept LAM. Et afin d'isoler les moustiques des perturbations lumineuses, sonores ou d'humidité relative pouvant avoir lieu dans l'insectarium, nous avons déposé le LAM dans une enceinte en bois de 50 cm³ dont les parois en bois avaient une épaisseur de 1,5 cm. Cette enceinte présentait des dimensions et une structure permettant d'avoir une température et une humidité relative respectives de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ et $70 \pm 5\%$. Selon l'objectif du test, on mettait soit un régime de cycle jour/nuit (LD : *Light Dark*) de 11 heures de lumière et 11 heures d'obscurité avec une transition lumière/obscurité le soir d'une heure et obscurité/lumière d'une heure le matin, soit un régime d'obscurité constant (DD : *Dark Dark*). Les enregistrements

dans les conditions LD ou DD durent au minimum six jours et l'activité des moustiques était enregistrée sur des périodes (pas de temps) d'une minute.



Figure 11 : Photographie d'un Moniteur d'activité locomoteur (LAM) chargé de tubes contenant les anophèles

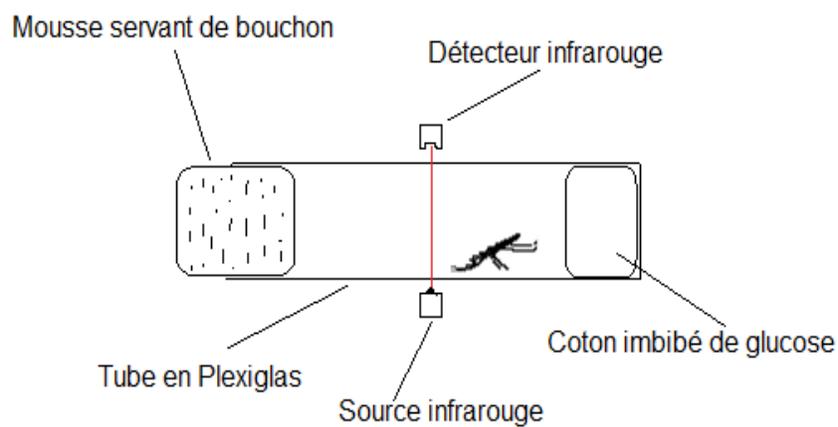


Figure 12 : Schéma du mode d'enregistrement de l'activité de vol locomoteur à l'échelle d'un tube du Moniteur d'activité locomoteur (LAM)

3. Dissection et mesure des ailes et des spermathèques

3.1. Dissection et mesures des ailes

La détermination de la taille des moustiques est très difficile du fait des variations que subit le corps selon le sexe, l'état physiologique, l'état nutritionnel et la période de l'année. Cette difficulté a conduit à la convention selon laquelle la taille d'un moustique est mesurable par la longueur de ses ailes du fait de son invariabilité au cours de la vie du moustique adulte (Christophers 1960). Dans le but de connaître les relations entre la taille des ailes des moustiques et leur niveau d'activité, nous avons donc entrepris de mesurer la taille des ailes de tous les moustiques dans chacune de nos expérimentations. Ainsi, à la fin de chaque enregistrement, les femelles étaient tuées par une mise au froid à -20°C pendant 30 min. De chaque femelle, une aile était retirée et étalée sur une feuille de papier portant le numéro du tube correspondant. Un scotch était soigneusement appliqué sur l'aile afin de la maintenir fixée sur une feuille de papier de format A4. Une photo de l'aile était prise à l'aide d'un appareil photo monté sur une loupe binoculaire (LEICA Microsystems® EZ4, 8X) reliée à un ordinateur. Chaque image était numérotée avec le tube correspondant. Enfin, à l'aide du Logiciel Image J (Schneider et al. 2012), l'aile était mesurée. La longueur de l'aile a été considérée comme la distance à partir de la base de la *costa* où elle fait une courbure appelée incision axillaire (*alula*) jusqu'à la marge apicale de l'aile (Christophers 1960).

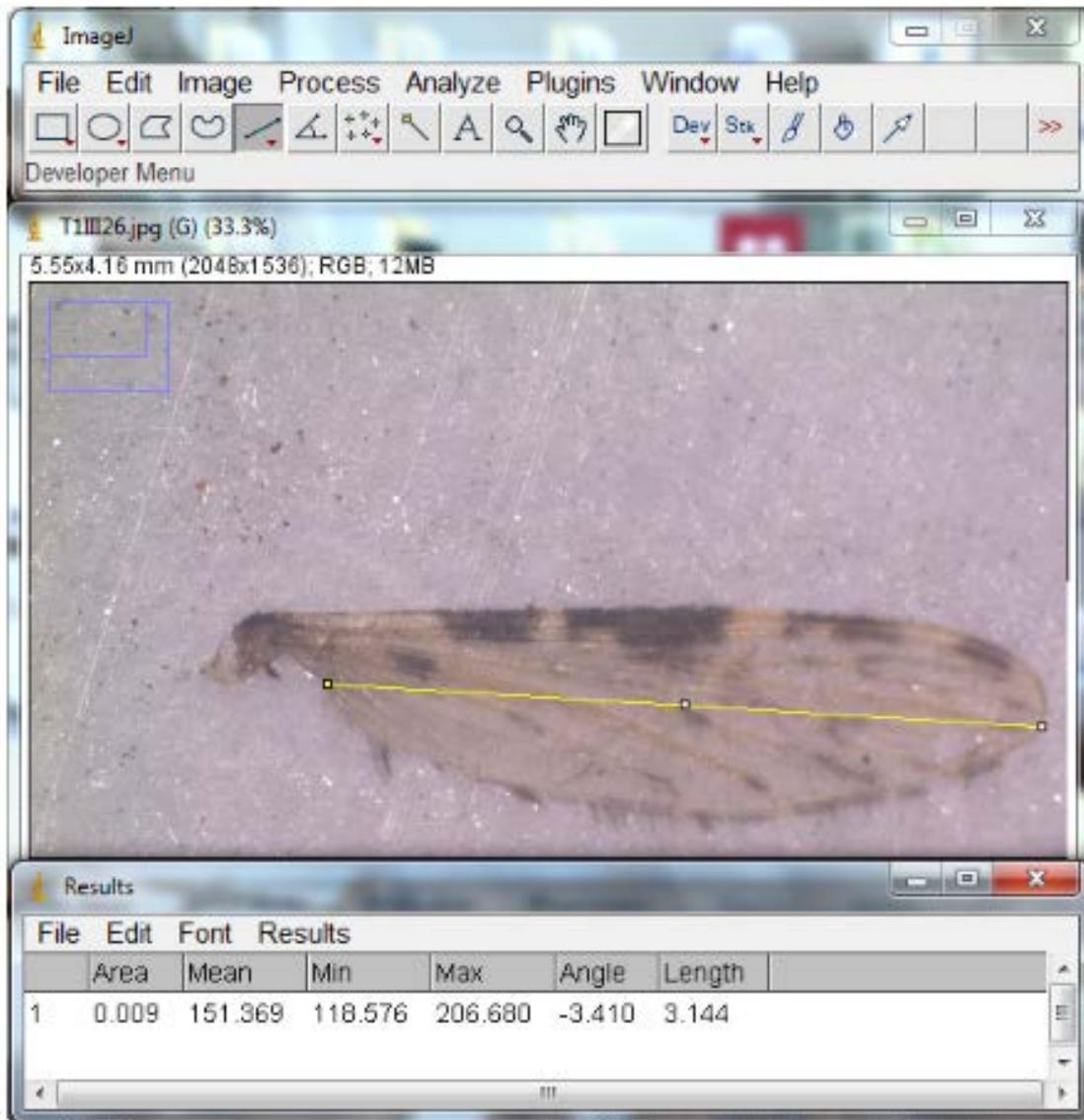


Figure 13 : Mesure d'une aile d'*An. gambiae s.l.* à l'aide du logiciel Image J

3.2. Dissection de la spermathèque et détermination du statut d'insémination

La détermination du statut d'insémination est un élément important chez les femelles car elle permet de savoir si ces femelles ont été en contact ou non avec des mâles. Elle a été proposée comme marqueur dans les cas de compétition au sein d'un même genre entre espèces autochtones et invasives afin de montrer que le remplacement d'une population autochtone par une population invasive se fait par le biais d'un accouplement asymétrique ou "satyrization" (avec des mâles invasifs s'accouplant et stérilisant les femelles autochtones plus souvent que l'inverse), entraînant

de facto la réduction des populations autochtones par la population invasive (Tripet et al. 2011). Aussi, il a été démontré que l'activité des femelles diffère selon qu'elles soient inséminées ou non (Jones and Gubbins 1977, 1978 ; Rowland 1989). La détermination de l'insémination se fait généralement par deux techniques : soit par une PCR à la recherche du chromosome Y dans l'ADN total extrait de la femelle, soit par la dissection de la spermathèque afin de visualiser son contenu. Dans notre étude portant sur l'état physiologique et nutritionnel utilisant des groupes de femelles devant être inséminées, nous avons utilisé la dissection des spermathèques. Cette dissection de la spermathèque se faisait à la suite de la dissection des ailes. Elle a été réalisée uniquement dans les groupes de femelles supposées inséminées (gorgées ou glucosées ayant été en contact avec les mâles) afin de déterminer si ces femelles étaient inséminées ou non grâce la technique décrite par Tripet et al. (2001). Pour cela, l'abdomen du moustique était séparé de la tête et du thorax puis placé dans un tube Eppendorf®, contenant une solution hydro-alcoolique d'éthanol à 70% et cela, au moins quatre jours avant la dissection proprement dite des spermathèques. La dissection sous une loupe binoculaire (LEICA Microsystems® EZ4, 8X) consistait à retirer de l'abdomen à l'aide de micro-pinces la capsule de spermathèque de couleur marron et de forme sphérique. Cette capsule de spermathèque était ensuite déposée dans une nouvelle goutte d'eau et à l'aide d'une pression douce de la pince sur la capsule, cette dernière se rompait et libérait son contenu. Une boule de microfilaments de spermatozoïdes agglutinés était libérée si la femelle était inséminée tandis qu'elle était absente si la femelle était vierge ou non inséminée.



Figure 14 : *Spermathèque rompue présentant des filaments de spermatozoïdes*

4. Analyse des données

Les données de mesure de rythme d'activité des anophèles générées au cours de nos études par le LAM étaient stockées dans l'ordinateur sous forme de fichier *.txt* (fichiers de données brutes). Nous avons créé un second fichier (métadonnées ou *metadata*) comportant les informations singulières de chaque anophèle enregistré pouvant être divisées en deux types de données à savoir i) les données dites "Flat" qui renseignent sur le test effectué comme le numéro d'identification, le numéro du test (ou des répliques), l'identifiant du moniteur (LAM), le numéro du canal portant l'anophèle, le mois du test, les heures exactes (HH:MM:SS) de l'allumage et de l'extinction de la lumière, la durée de l'aube et du crépuscule et ii) les données dites "relationnelles" qui renseignent sur l'espèce de l'anophèle, le génotype (RR, RS, SS), la taille de l'aile, le traitement (gorgé, jeun, inséminé, vierge), la mortalité. Ces deux fichiers (données brutes issues du LAM et les métadonnées) ont été importés via l'interface RStudio version 1.2.1335, 2009-2018 RStudio, Inc du logiciel R version 4.0.2 (2020-06-22) à l'aide duquel toutes les analyses statistiques et les graphiques présentés ont été réalisés.

Afin de trouver des tendances au sein des séries temporelles des différents génotypes d'*Anopheles coluzzii* que nous traduisons par l'effet du portage du gène KDR sur le rythme d'activité

d'*Anopheles coluzzii* (Chapitre 4) ou entre les effets des statuts d'insémination et de nutrition sur le rythme d'activité chez *Anopheles coluzzii* (Chapitre 3) et de les comparer entre elles pour déterminer de possibles différences entre ces génotypes ou entre les statuts d'insémination et de nutrition, nous avons résumé l'activité locomotrice de vol spontané d'*An. coluzzii* par six indices qui sont :

- l'activité moyenne de vol sur 24h des différents groupes (par minutes et par jour) ;
- la moyenne de l'activité horaire par jour ;
- l'heure de démarrage de l'activité crépusculaire ;
- l'heure du pic maximum de l'activité crépusculaire ;
- la valeur de l'activité crépusculaire ;
- les périodes des différents groupes en DD (*free-running*) ;
- la relation taille des ailes - activité.

Pour chacun de ces indices, nous avons analysé l'activité de vol spontané avec un modèle logistique binomial à effets mixtes en utilisant la fonction *glmmTMB* du package “glmmTMB” (Magnusson et al. 2020). Tous les modèles comprenaient l'activité, les génotypes kdr (SS, RS ou RR) ou l'état physiologique ou encore l'état nutritionnel et leurs interactions comme variables explicatives à termes fixes et l'individu comme interception aléatoire.

Tous les modèles ont été validés par observation des résidus via les outils fournis par le package “DHARMa” (Hartig 2020)

Nous avons utilisé le test *post-hoc* de Tukey pour effectuer des comparaisons multiples entre les niveaux d'activité des trois génotypes en utilisant la fonction *emmeans* du package “emmeans” (Lenth et al. 2020).

Nous avons calculé les Rate Ratios (RR) des modèles binomiaux négatifs et leurs intervalles de confiance à 95%.

Nous avons utilisé la fonction *emmeans* du package “emmeans” (Lenth et al. 2020) pour obtenir des estimations et des intervalles de confiance à 95 % des moyennes marginales estimées de l'activité de vol spontané de chaque génotype pour chaque mois et pour les comparer par paires grâce aux p value obtenues à l'aide de la fonction *contrast*.

Chapitre 3

Effets de l'insémination sur l'activité locomotrice postprandiale d'*Anopheles coluzzii*¹

¹ Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à *Parasites & Vectors*.

Résumé

Introduction

L'organisation temporelle du comportement est l'une des caractéristiques fonctionnelles les plus importantes du règne animal. L'apparition rythmique des comportements individuels à des moments spécifiques de la journée ou de l'année est essentielle pour la survie et la reproduction, ce qui a des conséquences importantes sur l'aptitude individuelle. Les femelles anophèles vecteurs de *Plasmodium*, à l'instar des insectes hématophages se nourrissent de sang. Et c'est durant cette période qu'ils absorbent ou transmettent des parasites. Il a été montré que ces anophèles présentent un rythme journalier d'activité circadienne, qui a contribué à l'élaboration des outils de lutte contre tel que les MILD. Ainsi, le constat de changement du comportement de piqûre des anophèles suscite de nombreuses questions comme la détermination des bases sous-jacentes. Dans ce chapitre, nous avons cherché à comprendre les effets de l'insémination et de l'alimentation sur les rythmes journaliers d'activité locomotrice d'*An. coluzzii*.

Méthodologie

L'objectif de l'étude était de décrire et d'imiter la complexité des rythmes circadiens dans l'activité locomotrice en les décomposant en leurs « éléments constitutifs » à l'aide de simples fonctions oscillatoires. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons utilisé un dispositif communément utilisé pour la mesure des rythmes d'activité locomotrice des insectes à savoir le LAM. Nous nous sommes intéressés au rythme d'activité de femelles de quatre groupes physiologiques d'une colonie d'*Anophèles coluzzii* : (i) femelles vierges glucosées (nourries au glucose), (ii) femelles vierges gorgées (nourries au sang), (iii) femelles inséminées glucosées et (iv) femelles inséminées gorgées en régime lumière obscurité et en régime d'obscurité constante.

Résultats et discussion

Nous avons trouvé que le pic d'activité crépusculaire apparaissant à l'extension et décrit dans la littérature comme impliqué dans l'essaimage, la recherche de repas sucré ou de site de ponte a été fortement réduit avec par l'insémination. L'alimentation sanguine a entraîné une diminution marquée du niveau et de l'activité totale jusqu'à trois jours après la prise du sang. Un décalage a été observé entre les pics de probabilité d'activité entre des femelles nourries au sang et de celles nourries au glucose avec une activité plus prononcés chez les femelles inséminées nourries au

glucose. Aucune différence n'a été constatée entre les moyennes des pics d'activité dans les différents groupes. Enfin, l'insémination a induit un retard dans le début de l'activité crépusculaire confirmant ainsi que l'activité crépusculaire englobe une diversité de comportements chez les anophèles.

Conclusion

La différence de la période (τ) d'activité retrouvée dans différents groupes semble bien indiquer que c'est l'insémination qui modifie la marche de l'horloge de manière plus importante que le cycle nuit jour. En outre, la différence d'organisation temporelle et/ou du niveau d'activité retrouvée dans différents groupes peut être aisément corrélée avec les comportements biologiques observés sur le terrain. Nos résultats suggèrent que les femelles inséminées seraient capables de décaler leur horaire de piqûre afin d'avoir accès à leur hôte.

1 **Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity and**
2 **endogenous circadian clock of the wild malaria mosquito *Anopheles***
3 ***coluzzii***

4 **Amadou S Traore**^{1,2,3§}, Angélique Porciani¹, Nicolas Moiroux^{1,2}, Roch K Dabiré², Frédéric
5 Simard¹, Carlo Costantini¹, Karine Mouline^{1,2}

6 ¹ MIVEGEC, Univ Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

7 ² Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

8 ³ Agro Paris Tech, Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, Université
9 Paris-Saclay

10 § Correspondance : a.sekoutraore25@gmail.com

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Abstract**

25 **Background:** Changes in the temporal profile of blood-feeding have been reported in natural
26 populations of *Anopheles malaria* vectors following the large scale implementation of insecticide-
27 based vector control tools. There is an urgent need to understand the nature of these temporal shifts
28 in behaviour, and to understand and predict evolutionary responses of complex behaviours. It is
29 therefore necessary to dissect the behavioural sequences underlying such complexity. Here we
30 investigated the effects of male insemination and blood-feeding on spontaneous activity of wild
31 *An. coluzzii*.

32 **Methods:** We used Locomotor Activity Monitors (LAM) under controlled conditions in order to
33 describe and compare nightly, hourly and twilight activity in an *Anopheles coluzzii* population
34 originated from Burkina Faso.

35 **Results:** Insemination induced lower activity at twilight peak, higher activity during the rest of the
36 night and a delayed time of onset at sunset (under both Light/dark and Dark/Dark photoperiod).
37 Blood meal significantly reduced *Anopheles* activity for up to 72 hours, after which an increase in
38 activity was observed. Under Dark/Dark photoperiod, time of peak activity of blood-fed females
39 occurred ~32 min earlier than that of sugar-fed females.

40 **Conclusions:** The difference in temporal organization and/or activity level found in different
41 physiological states can be easily correlated with the biological behaviours observed in the field.
42 Moreover, our results suggest that both insemination and blood-feeding have an effect on the
43 circadian endogenous clock of females *An. coluzzii*.

44
45 **Keywords:** *Anopheles coluzzii*, Behaviour, Blood feeding, Circadian clock, Daily rhythm,
46 Insemination, Locomotor activity, Physiology, Sugar feeding

47

48 **Introduction**

49 The temporal organization of behaviour is among the most important functional characteristics of
50 organisms in the animal kingdom. The rhythmical occurrence of individual behaviours at specific
51 times of the day or of the year is functional to survival and reproduction, bearing significant
52 consequences on individual fitness [1–4].

53
54 Mosquitoes are hematophagous insects including among the most important vectors of human
55 pathogens like malarial *Plasmodia*, *filariae*, and several arboviruses such as yellow fever, dengue,
56 Zika, or chikungunya. In haematophagous insects many behaviours have been demonstrated to
57 show a marked circadian structure, such as locomotor activity [5–8], mating [9,10], oviposition
58 [9,11,12], ecdysis [13], metamorphosis [14], sugar feeding [15,16], and blood feeding [15,17,18].
59 It is during blood feeding that mosquitoes pick up or transmit parasites, thus making this behaviour
60 a key component of the pathogen’s transmission cycle [19].

61
62 Female mosquitoes go through different physiological stages after emergence and during their adult
63 life. Some of these stages are modulated by gating events. Thus, after emergence, virgin females
64 will seek a source of carbohydrates to accumulate energy before looking for a mate [20]. Energy
65 enables them to engage in reproductive behaviours later on [21,22]. Only after being inseminated,
66 which generally happens once in their lifetime, females will start seeking a blood meal [23]. A
67 period of moderate level of activity (i.e. “resting”), which corresponds to a phase of digestion of
68 the blood meal and maturation of the ovaries, follows blood feeding. Only after complete
69 maturation of the oocytes the female is ready to engage in her quest for a suitable water collection
70 where to lay eggs. After oviposition, another gonotrophic cycle (i.e. the cyclical repetition of the
71 sequence of physiologically-controlled behaviours blood-feeding, resting, and oviposition) is

72 engaged, and this is repeated throughout the female's lifetime. Embedded within the infradian
73 rhythmicity of the gonotrophic cycle, which follows a sequence of gating physiological changes,
74 each of these behaviours follow circadian periodicities modulated by diel changes in peripheral
75 receptors' sensitivity to key stimuli [6,24,25] or changes in behavioural responsiveness [26–28],
76 but—above all—the overt expression of behaviours is regulated by the circadian rhythmicity of
77 general activity under the control of molecular clocks.

78
79 For any given species or sex [10], spontaneous locomotor activity has been shown to depend on
80 endogenous physiological conditions, most notably upon insemination status, nutritional status
81 [9,16,29–31], or the nature of the meal [9,16,29,30], as well as on genetic background like the
82 presence of insecticide resistance alleles [32]. Exogenous biotic or abiotic factors such as light and
83 temperature [33,34] or parasites [35,36], can contribute to the modulation of spontaneous activity.
84 Both endogenous and environmental factors operate through their effects on the expression of
85 molecular clock genes. For example, it has been shown that a reduction in locomotor activity after
86 a blood meal is correlated with decreased levels of expression of the circadian gene *Timeless* [8].

87
88 Recently, changes in the temporal profile of blood-feeding and associated behaviours have been
89 reported in natural populations of some anopheline species characterised by anthropophilic feeding
90 preferences. Most of the species concerned are malaria vectors in tropical Africa, i.e. members of
91 the *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* species complexes, that are characterized by peak
92 biting activity late at night, usually between midnight and dawn. There are also a few reports
93 concerning species with more crepuscular feeding habits [37]. Evidence suggests that these
94 temporal changes have occurred after the large-scale deployment of insecticide-treated bed-nets to
95 control malaria transmission, presumably in response to selective pressures shifting the blood-

96 feeding activity of these species towards temporal windows when the preferred host is more
97 accessible [37–41]. It is still unclear whether such temporal restructuring of blood-feeding may
98 represent an evolutionary adaptive response or just some form of behavioural plasticity.
99 Regardless, there is an urgent need to understand the nature of these temporal shifts in behaviour,
100 as the efficacy of vector-borne disease control programs relies on the occurrence of blood-feeding
101 at night-time when humans are protected by treated bed-nets.

102
103 To understand and predict evolutionary responses of complex behaviours, it is necessary to dissect
104 the behavioural sequences underlying such complexity in order to identify those traits that are
105 amenable to evolutionary analysis. For example, in order to apply quantitative genetic approaches
106 to behavioural evolution, one needs to identify and ‘extract’ the individual phenotypic values of
107 those traits that underlie the complex behaviour under investigation; ultimately, one wants to
108 quantify variation within and between individuals for those traits. The measurement of individual
109 differences, the determination of the causes of the differences, and the assessment of the fitness
110 consequences of such differences are the essence of quantitative genetic analyses of behavioural
111 evolution [42].

112
113 Here we use general locomotor activity in the malaria vector *Anopheles coluzzii* (a member of the
114 *Anopheles gambiae* species complex) as a model of a complex behaviour with the aim to identify
115 the underlying quantitative traits describing the temporal organization of the overall locomotion
116 phenotype observed with an automatic recording apparatus. We investigated the effects of male
117 insemination and blood-feeding on spontaneous activity. These factors are known to affect
118 mosquito locomotor activity [9,35,43], but differences have not been characterized quantitatively
119 for the underlying traits and in wild population of malaria vectors.

120

121 **Materials and methods**

122 **Mosquito colony**

123 Two hundred female anopheline mosquitoes were collected using a mouth aspirator in the village
124 of Bama (11°22' N, 4°25' W), south-western Burkina Faso. Individuals that were morphologically
125 identified as *An. gambiae* sensu lato using the identification keys of Gillies [44] were separated
126 into gonotrophic classes according to abdominal appearance. Mosquitoes that were fully engorged
127 with blood, half-gravid, or gravid were transferred into large cages, and then transported to the
128 IRSS insectary facility in Bobo-Dioulasso, about 30 km away from Bama. After a period spent in
129 standard insectary conditions (27 ± 2 °C, $70 \pm 5\%$ RH, LD 12:12 photoperiod) to ensure that most
130 individuals were ready to lay eggs, mosquitoes were isolated in plastic cups filled with 30mL of
131 tap water to allow oviposition. Those individuals that laid eggs were then killed for further
132 molecular characterization of species status following the protocol of Santolamazza [45].

133
134 From the results of the molecular identifications, only eggs from *Anopheles coluzzii* females were
135 retained; eggs were transferred into trays (30cm x 20cm) containing 1L of tap water and then reared
136 following standard colony maintenance protocols, as previously described by Ruiz [46]. The
137 offspring of 108 *Anopheles coluzzii* constituted the F₀ founders of our working colony, which was
138 established in May 2018; the experiments took place from September to November 2018, hence
139 tested mosquitoes were selected randomly from the 10th generation or earlier.

140

141

142

143

144

145 **Experimental design and conditions**

146 The objective of the experiment was to compare the activity of virgin or inseminated females after
147 they had a meal of either blood or glucose. Four treatment arms were constituted: (i) virgin females
148 fed with 5% glucose; (ii) inseminated females fed with 5% glucose; (iii) inseminated females fed
149 with blood; and (iv) virgin females fed with blood. The first three treatments reproduce the usual
150 sequence of physiological changes occurring after pupal metamorphosis and adult emergence in
151 natural populations, while the latter arm is quite rare in nature [14]. However, it was included to
152 look at the effects of insemination and nutritional status in accordance with a 2 x 2 factorial
153 experimental design.

154

155 Experimental treatments were constituted as follows (Figure 1). First, it was necessary to ensure
156 that males and females emerged separately in order to produce the treatment arms for virgin
157 females. Thus, eight hundred pupae from the colony were individually placed in plastic tubes (L =
158 9.3cm, D = 2.5cm) plugged with a cotton wool plug and containing 1 mL deionized water. The
159 tubes were placed in a wooden box (50cm x 50cm x 50cm) to entrain the test mosquitoes to a LD
160 12:12 photoperiod with a 1-hr linear twilight at subjective sunset and sunrise (from 17:00 to 18:00
161 and from 5:00 to 6:00, respectively). Light conditions were obtained using a customized system
162 composed of one LED (Vision-EL® GU5.3, 12V, 4000°K, 530 lumens, 6-55W) controlled by a
163 TC420 Programmable LED Time Controller Dimmer (20A, 12V-24V, Word uniqueen
164 International Trade Co., Ltd, China).

165

166 As soon as teneral emerged, two groups were established: virgin and inseminated females. To
167 obtain the latter, 300 males and 150 females were mixed during 6 days in a 30 x 20 x 20cm cage

168 to allow females to mate. At the same time, to constitute the virgin treatment arms, another group
169 of 150 females were placed in a separate cage of the same size and left for 6 days to ensure that
170 mosquitoes from both groups had the same age in the experimental tests. During this time all
171 mosquitoes were allowed to feed *ad libitum* on cotton soaked with a 5% sterile glucose solution
172 (5% Glucose Solution for Injection USP, Shandoung Qidu Pharmaceutical Co., Ltd.).

173
174 After day 6, males were discarded and all females were starved for 12h (only water drinking was
175 allowed). Each of the two groups was then subdivided into two subgroups of equal size. One
176 subgroup from each of the two groups was allowed to feed for 30 minutes on a restrained rabbit,
177 whereas the other was allowed to feed again on the 5% glucose solution. Blood-fed females were
178 later given the glucose solution following blood-feeding.

179

180 **Locomotor activity recording**

181 Females from all subgroups were individually introduced into Plexiglass *Drosophila* tubes (L =
182 9.3cm, D = 2.5cm) provided with an *ad libitum* source of water and energy to increase survival
183 throughout the test period. To this aim, a cotton plug soaked with 5-7mL of 5% sterile glucose was
184 placed at the bottom of the tube. Tubes were inserted into the holding grid of seven Locomotor
185 Activity Monitors (LAM, TriKinetics, Waltham, MA) to detect and measure spontaneous activity
186 automatically. LAMs are routinely employed in chronobiology [10,47– 50], and have been used in
187 studies of mosquito activity [10]. LAMs automatically record activity on a connected computer
188 when mosquitoes (or any other small arthropod) inside the holding tube break an infrared beam
189 across the center of each tube. Each LAM received two control tubes (empty tubes lacking the
190 mosquito within), and all four treatment arms; treatment tubes and their positions in the LAM grid
191 arrangement were chosen at random.

192
193 Because some artefacts were detected in control tubes from three out of the seven LAMs
194 (originating from the same batch order), the external surface of all tubes was covered with a white
195 rubber band, except for a 2cm gap centered on the IR emitter/detector system. This decreased
196 artefacts without impacting activity recording. Each LAM was placed inside a wooden box (50cm
197 x 50cm x 50cm) in the insectary to prevent contamination from light or other disturbances from
198 the surroundings. Environmental conditions and photoperiod were identical to those previously
199 described for rearing and training, except for two LAMs that were submitted to a constant dark
200 (DD) photoperiod to measure free-running circadian parameters. Activity was recorded every
201 minute (60^{-1} Hz) for 7 days.

202

203 **Insemination status and body size**

204 At the end of the tests, mosquitoes were killed by placing the holding tubes at -20°C for 30 min.
205 In order to control for the potential confounding effects of body size upon differences in locomotion
206 among treatments, we used wing size as a proxy of body size [51]. The right wing from each female
207 was dissected under a binocular, and digital photographs of the wings of all tested mosquitoes taken
208 thereof. The distance from the axillary incision (*alula*) to the apical margin [52] was measured in
209 ImageJ [53] and this measure used as a proxy of wing size.

210

211 Females from the inseminated treatment arms were further processed according to the protocol of
212 Tripet [54] to characterize their insemination status. Individual mosquitoes were stored in
213 microtubes containing 70% (v/v) ethanol for 4 days, thereafter their 6th abdominal segment was
214 dissected under a binocular and separated from the rest of the carcass; the spermatheca was isolated
215 and its envelope delicately teared apart to release the sperm bundle, which was observed under 35x

216 magnification. If sperm were found inside the spermatheca the female was scored as being
217 inseminated. Females from the inseminated treatment arms that failed to yield sperms were scored
218 as non-inseminated and discarded from further analyses.

219

220 **Data analysis**

221 The LAM output file returns individual counts of beam-breaks per unit time. We call this variable
222 the activity score of each mosquito at a given time. It is assumed that activity scores are
223 proportional to locomotor activity, which is unobserved with this experimental setup.

224

225 Activity records from the first and last day of each experimental run were not considered as they
226 were deemed, respectively, a period of acclimation when mosquitoes may not display their normal
227 behaviour [10], or a period of significant decrease in overall activity due probably to a combination
228 of factors such as energy shortage or aging. Individuals whose actogram showed 24-h of continuous
229 inactivity were considered as dead and discarded from analysis.

230

231 We examined the propensity of individuals at showing rhythmicity in spontaneous activity by
232 calculating their chi-square periodograms [55]. Statistically significant peaks in the periodogram
233 informed about which periods had rhythmicity above average stochastic noise. From chi-square
234 periodograms we extracted the *circadian period* length in LD and the free-running *circadian period*
235 length (τ) in DD. For *Anopheles* mosquitoes the free running period is generally around $23\text{h} \pm 1\text{h}$
236 on average, showing variability dependent on species, strain, or sex [10]. Therefore, we considered
237 only values of τ in the range $23\text{h} \pm 2\text{h}$. Few atypical individuals displaying circadian periods
238 departing more than 2h from 23h were discarded. Individual circadian period lengths were analysed

239 according to food source (glucose vs. blood), insemination status (inseminated vs. virgin),
240 photoperiod regimen (LD vs. DD) and interactions using a multiple linear regression model.

241
242 The *mean activity* expressed at the recording frequency of 60^{-1} Hz and averaged across individuals
243 in each treatment arm, was used to display actograms in LD and DD. This endpoint provided the
244 general shape of the temporal structure of locomotor activity during the whole test period, allowing
245 visual comparison among treatments.

246
247 Activity per night and per hour of the night in each treatment arm provided the *mean nightly and*
248 *hourly activity* endpoints, which were used to look at the dynamics of locomotion during the course
249 of the experiment. For this task, we modelled individual activity scores recorded between 16:00
250 and 7:00 and expressed at the recording frequency of 300^{-1} Hz (i.e. per 5 min) using negative
251 binomial GLMMs (generalized linear mixed models). For mean nightly activity analysis, we
252 analysed separately LD and DD activity score data according to the insemination status (virgin vs.
253 inseminated), the food source (glucose vs. blood), the recording day (coded as a factor value) and
254 interactions. For hourly activity analysis, due to convergence issues, we split the dataset to analyse
255 the effect of insemination in glucose-fed mosquitoes and then the effect of blood-feeding in
256 inseminated females in both LD and DD conditions on day 3. Therefore, the explanatory variables
257 of the GLMMs were the insemination status or the feeding source, the hour of the night (coded as
258 a factor value) and interactions. In order to deal with possible auto-correlation in the data due to
259 repeated measurements, intercepts and slopes between days (or hours) were permitted to vary by
260 individuals.

261

262 In order to analyse activity during and just after the transition from photo- to scotophase, we
263 identified and compared the *onset of activity* and the time of *peak locomotory activity*. The *onset*
264 *of activity* was expressed as the time (in hours and minutes) when sustained locomotory activity
265 starts during the artificial dusk. Start of sustained activity was arbitrarily defined as the time when
266 each mosquito produced at least ≥ 1 beam-breaks per minute for 3 consecutive minutes. The time
267 of *peak locomotory activity* was expressed as the time (in hours and minutes) when each mosquito
268 activity score attained the maximum value during the artificial dusk. *Onset* and *time of peak activity*
269 were analysed separately between LD and DD using mixed-effect linear models with *food source*,
270 *insemination* status, *days* of recording and interaction between food source and insemination status
271 as explanatory variables and individuals as random intercepts.

272
273 Mixed-effect models were fitted using package “glmmTMB” [56] in the R software [57]. Adequacy
274 of model residuals was checked using the “DHARMA” package [58]. Estimated marginal means
275 were estimated and compared using the “emmeans” package [59]. Post-hoc Tukey’s procedures
276 with correction for multiple comparisons were run to compare the levels of significant factors.

277

278 **Results**

279 **Arrhythmicity and sample size**

280 The total number of rhythmic or arrhythmic individuals broken down by treatment and photoperiod
281 is given in Table 1. Of the 200 individuals tested (140 + 60 in LD and DD, respectively), 8 (4%)
282 were discarded because they did not survive across all seven days of testing, and 27 (13.5%) were
283 females that were not inseminated despite they shared the same cage with males. Arrhythmic
284 individuals accounted for ~3% of the sample in LD and ~16% in DD, the difference being

285 statistically significant (G-test of independence with Williams' correction $G=5.57$, d.f.=1, $p =$
 286 0.02). Arrhythmic individuals were especially overrepresented in the group of inseminated females
 287 under DD, regardless of meal type (G-test of independence with Williams' correction $G=11.12$,
 288 d.f.=3, $p = 0.01$).

289
 290 **Table 1:** Total number n of individuals included in the analysis according to treatment and
 291 photoperiod. The "Arrhythmic" column shows the number of individuals in each category that were
 292 discarded because they did not display significant rhythmic activity according to chi-square
 293 periodograms.

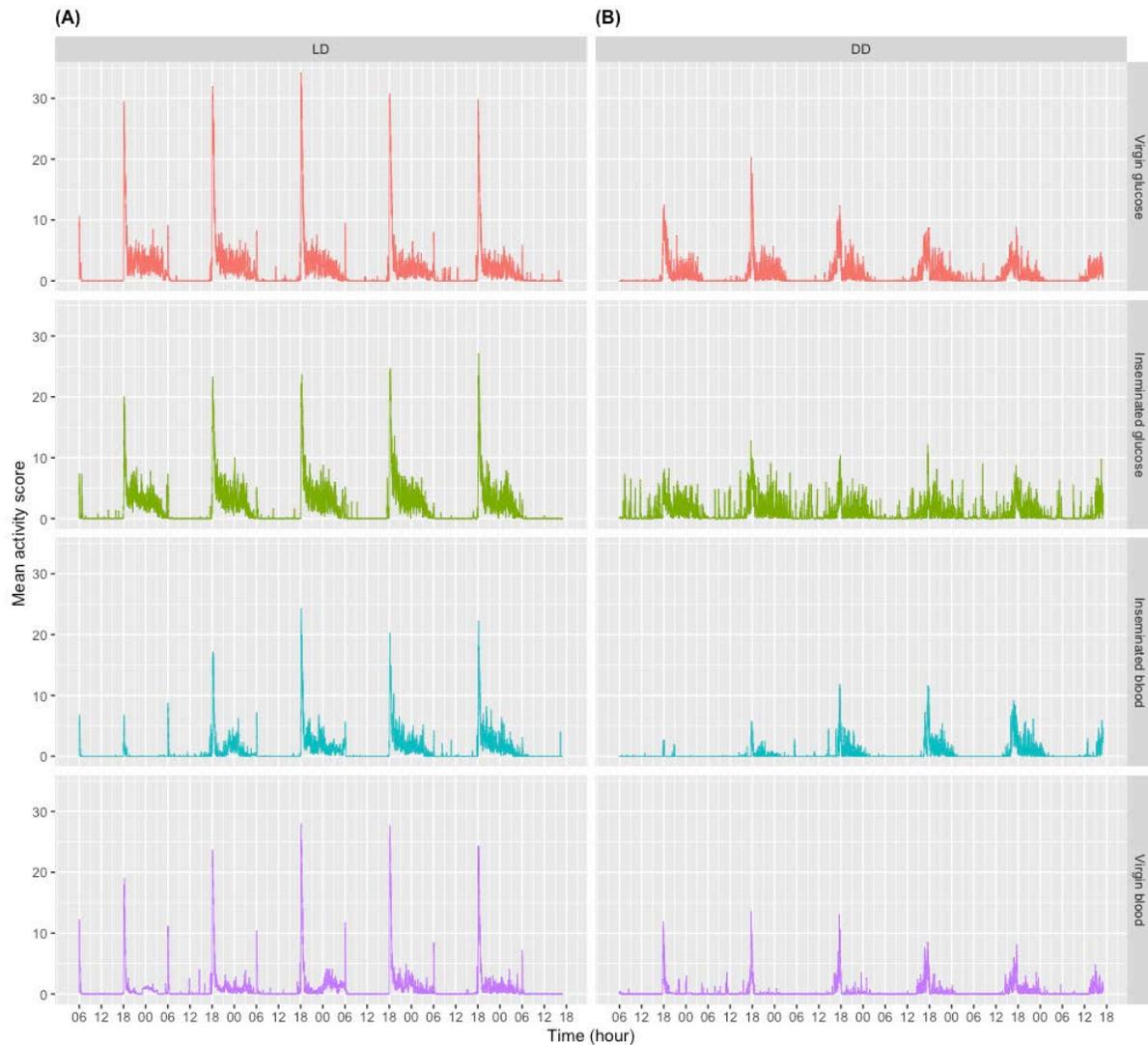
Insemination					
Status	Meal	Photoperiod	n	Arrhythmic	Total
Virgin	Glucose	LD	32	1	33
Virgin	Glucose	DD	15	0	15
Inseminated	Glucose	LD	24	1	25
Inseminated	Glucose	DD	11	4	15
Inseminated	Blood	LD	21	1	22
Inseminated	Blood	DD	11	3	14
Virgin	Blood	LD	35	1	36
Virgin	Blood	DD	14	1	15
	Total	LD	112	4	116
	Total	DD	50	8	58

295
 296
 297 **Impact of body size**
 298 Wing size did not differ among treatments (Linear model; cf. Supplementary Material) and was
 299 not correlated to locomotory activity (Pearson correlation; cf. Supplementary Material). Thus, in
 300 what follows, wing size was not considered as a potential confounding variable and was excluded
 301 from further analyses.

303 **Description of overall activity phenotype**

304 As anticipated, visual inspection of the actograms suggested distinct daily mean activity patterns
305 among treatments (Figure 1).

306



307 **Figure 1:** Mean activity score (beam-breaks min^{-1}) of *Anopheles coluzzii* females for each of the
308 four physiological conditions tested under two light regimens (A) Light:Dark 12:12 (LD) (B) Dark-
309 Dark (DD).
310

311
312 The strength of activity was on average lower in DD than LD. Daily patterns were bimodal in LD
313 and mostly unimodal in DD. All treatments showed the strongest peak of activity following the
314 lights-off transition (18:00). This generally lasted for 1-2 hours, after which activity substantially

315 decreased until the lights-on transition. At lights-on (06:00) there was a peak of activity which
316 disappeared under DD. Between these temporal endpoints, there were minor secondary peaks of
317 activity, especially after 24:00.

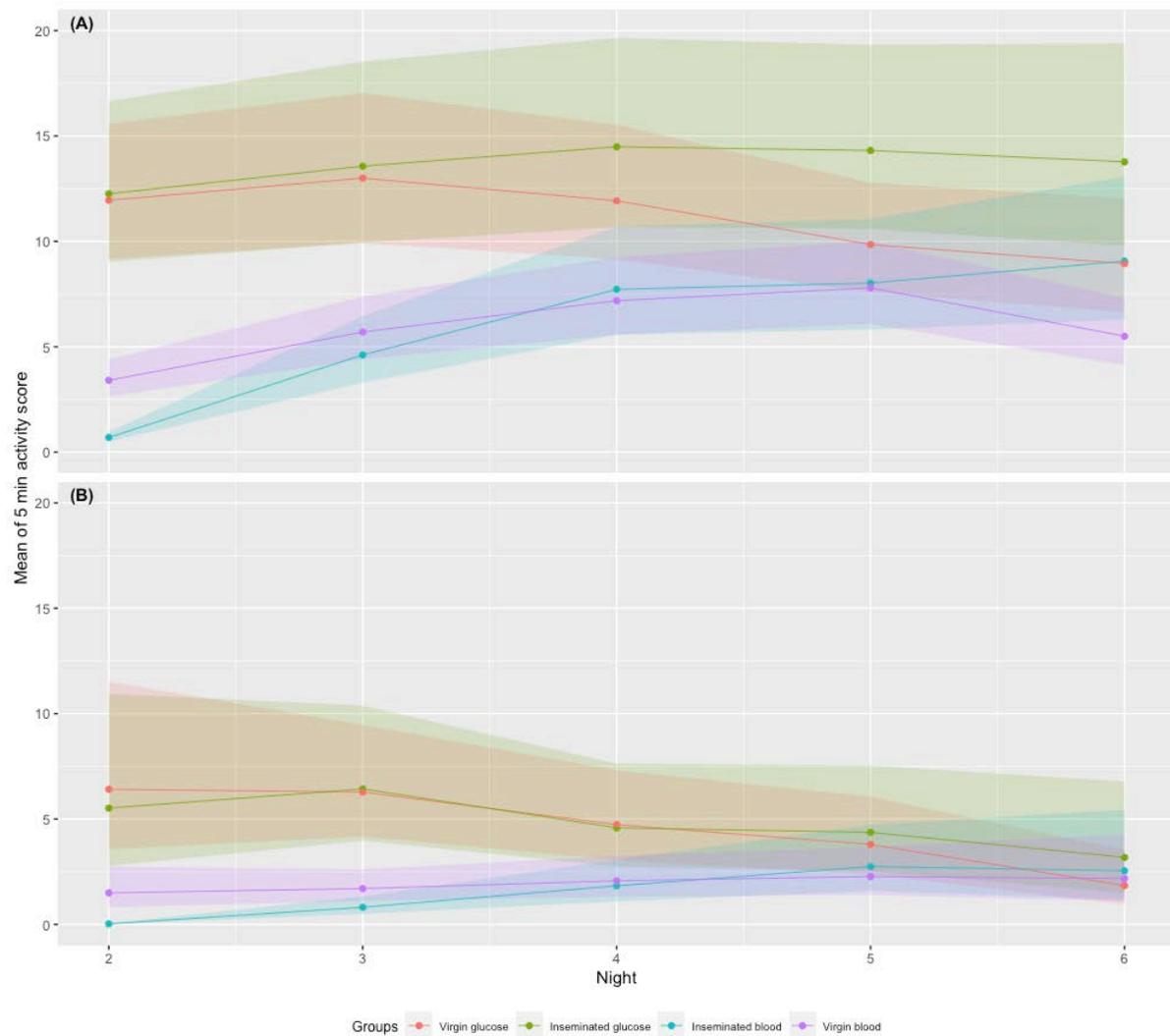
318

319 **Mean nightly and hourly activity**

320 As the pattern of activity presented in the figure is complex, we have divided the analysis by night
321 and then by hour. Mean nightly activity scores as predicted by the GLMMs are presented in Figure
322 2. In both photoperiod conditions, we observe that the mean nightly activity of glucose-fed
323 mosquitoes decreased along recording days while it increased for blood-fed ones. From day 2 to 4,
324 mean daily activity of blood-fed females was significantly lower than those of glucose-fed females
325 (detailed multiple comparison statistics available in Supplementary materials).

326

327



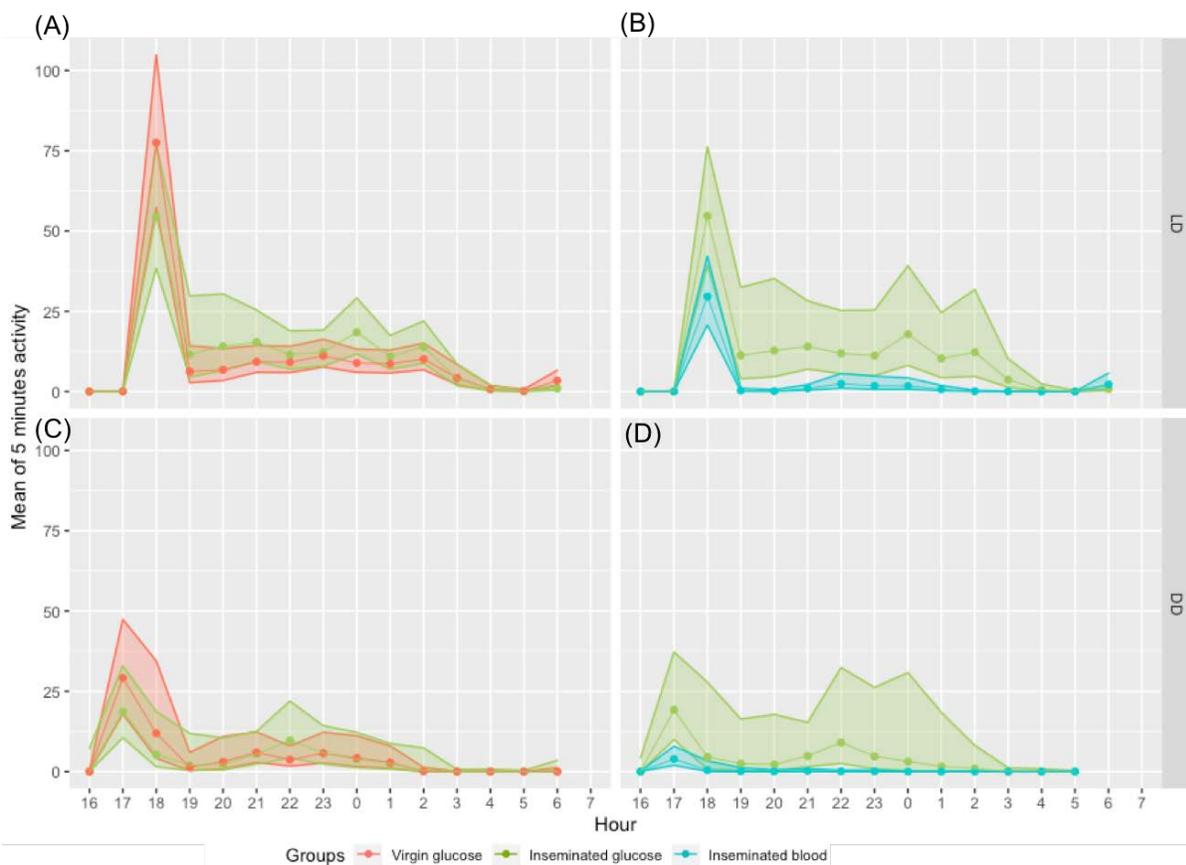
328
 329 **Figure 2:** Mean nightly activity predicted by the models (A) under Light/Dark and (B) under
 330 Dark/Dark photoperiods. Point correspond to model estimated marginals means and color shades
 331 95% confidence interval.

332
 333 Mean hourly activity as predicted by the models during the 3rd night of recording are presented in
 334 Figure 3. Virgin females showed a higher activity than inseminated females at peak following the
 335 day/night transition (not significant, Rate-ratio (RR) = 0.7 95%CI [0.44; 1.11], p = 0.13) and
 336 night/day transition (RR = 0.27 [0.09; 0.76], p = 0.014) (Figure 3A and supplementary materials).
 337 Between these times, activity of inseminated females was slightly higher (the difference being
 338 significant only at 00:00, RR = 2.07 [1.13; 3.8], p = 0.018). When comparing the same groups

339 under DD photoperiod, there was no evidence of differences in mean hourly activity (Figure 3C
340 and supplementary materials).

341
342 From 18:00 to 6:00, *Anopheles* females fed with glucose showed significantly higher hourly
343 activity than blood-fed ones under LD photoperiod (Figure 3B and supplementary materials). The
344 same was true under DD photoperiod but shifted by one hour (Figure 3D).

345
346



347
348 **Figure 3:** Mean hourly activity during the 3rd night for (A, C) Glucose-fed females and (B, D)
349 inseminated females under LD (A,B) and DD (C, D) photoperiods.

350 Because the effects of insemination and food source were analyzed separately, confidence intervals
351 for activity of inseminated glucose-fed females may vary between panels A and B and between
352 panels C and D. Point correspond to model estimated marginals means and color shades 95%
353 confidence interval.

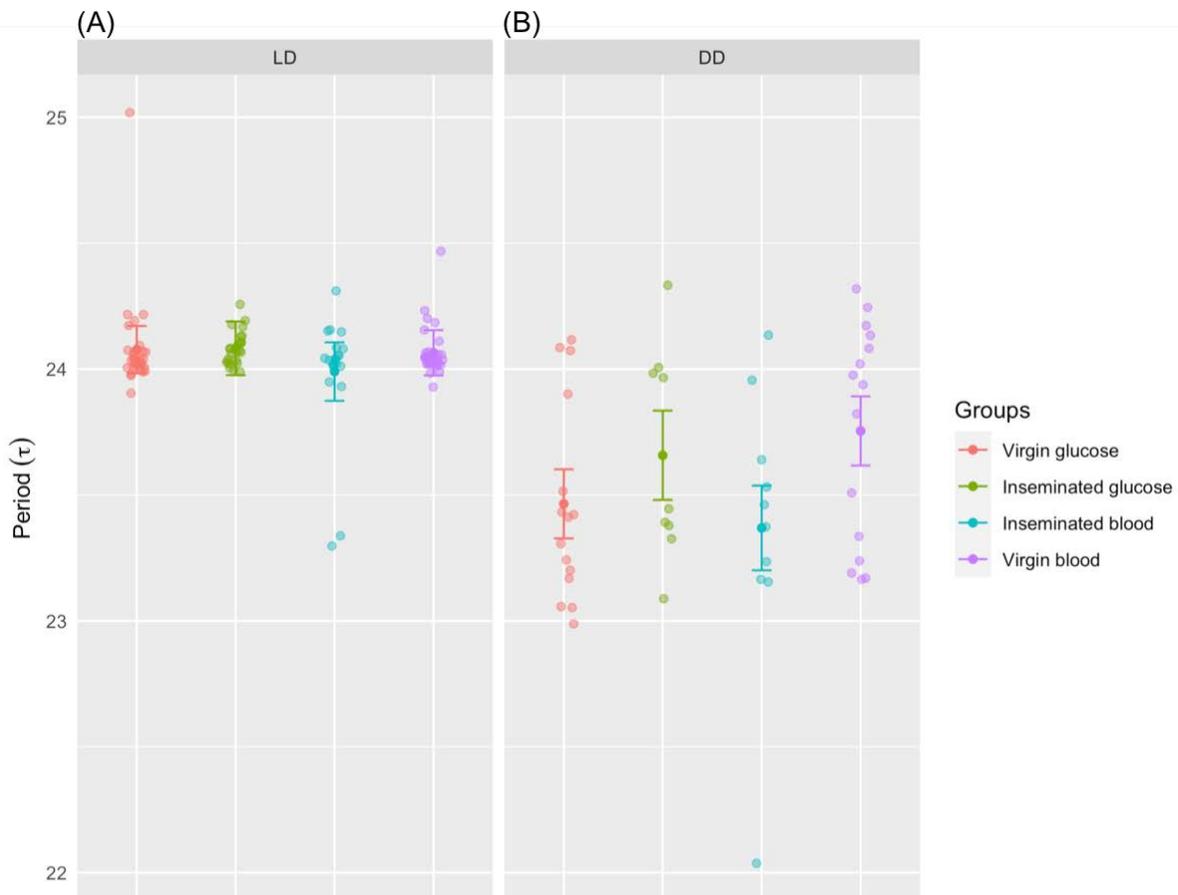
354

355

356 **Circadian period length**

357 We have compared the circadian period length according to food source and insemination status
358 under both LD and DD conditions. Under LD conditions, circadian period length was closed to 24h
359 and not different among groups (Figure 4A). In DD condition (Figure 4B), as expected, all groups
360 showed circadian period length lower than 24h. In addition, virgin blood-fed females showed
361 longer period length than both virgin glucose-fed (Mean difference (MD) = 0.29 h [0.03; 0.54], p
362 = 0.02) and inseminated blood-fed females (MD = 0.39h [0.1; 0.67], p = 0.003). We were not able
363 to find any differences among meaningful physiological states (supplementary materials).

364



365 **Figure 4:** Mean circadian period lengths ($\pm 95\%$ CI) under LD (A) and free-running DD (B)
366 photoperiods. Circles indicate individual circadian periods as identified using chi-square
367 periodograms.
368

369

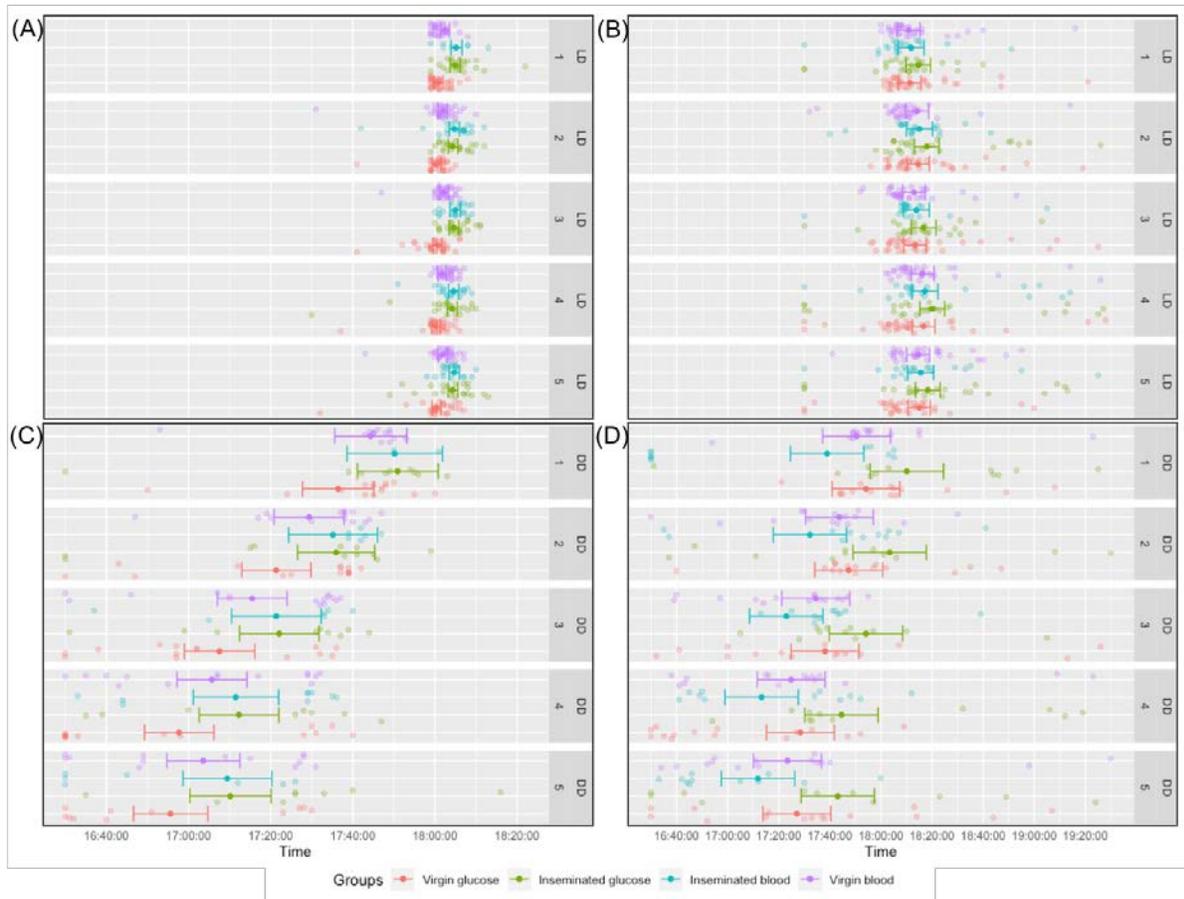
370 **Times of onset and peak activity at subjective sunset**

371 When comparing between glucose-fed females under LD photoperiod, we found that insemination
372 significantly delayed onset time by 4.03 min [2.67; 5.39] ($p = 2.13 \times 10^{-10}$, Figure 5A). The same
373 was observed in blood-fed females with a significant delay of 2.80 min [1.30; 4.31] ($p = 1.17 \times 10^{-5}$,
374 Figure 5A).

375
376 In DD conditions, activity of glucose-fed virgin females began 14.54 min [3.303; 26.05] earlier (p
377 $= 0.007$, Figure 5B) than that of glucose-fed inseminated females and 13.79 min [0.5; 27] ($p=0.03$,
378 Figure 5B) earlier than that of blood-fed inseminated females.

379
380 The time of peak activity has been determined in the restrained time window between 16h30 and
381 19h30, encompassing the dusk period where swarming takes place in the field. By comparing the
382 time of peak activity between physiological groups, we were not able to evidence any differences
383 under LD photoperiod (Figure 5C and supplementary materials). However, under DD photoperiod,
384 blood-fed inseminated females exhibit earlier peak of activity than glucose-fed inseminated (MD
385 $= 31$ min [11; 50], $p = 3.1 \times 10^{-4}$) or virgin (MD $= 20$ min [1.4; 37], $p = 0.029$) females.

386



387
388

389 **Figure 5:** Onset time (A&C) and time of peak activity (B&D) under both LD and DD
390 photoperiod. Mean \pm 95% CI. Circles indicate individual data.

391
392

393 Discussion

394 This study aims to investigate the effects of male insemination and blood-feeding on spontaneous
395 activity under Light/Dark and constant darkness photoperiods. Because of the overarching impact
396 of the environment and ontogeny upon individual behaviour, we have focused our analysis on
397 populations raised and tested under controlled laboratory conditions. However, in order to increase
398 our chances of capturing the extent of phenotypic variability occurring in natural populations, we
399 used a recently-colonised outbred strain of *An. coluzzii* that was reared for no more than 10
400 generations in the lab.

401
402 Several indicators were compared that describe the overall nightly, hourly, and twilight activity
403 during the course of a 7-days experiment. Twilight activity in *Anopheles* includes several known
404 behaviours such as migration, swarming, egg laying, and sugar feeding [9,16,29,60–62]. Taken at
405 the scale of daily locomotor activity of *Anopheles*, these activities are overlapping and difficult to
406 discriminate [16]. We therefore investigated whether there were differences at small time windows
407 in the time of onset and peak activity between insemination status or food regimen.

408
409 Regarding the effect of insemination, our main results indicated that mean nightly activity of virgin
410 females was higher than that of inseminated females. This was mostly due to a higher peak of
411 activity during sunset observed with virgin females. During hours following this peak, inseminated
412 females showed higher activity. This result is consistent with Jones [9] and with the life cycle of
413 adult *Anopheles* mosquitoes. Indeed, virgin females having taken a sugar intake after emergence
414 will search for mating, that usually occurs during sunset (explaining higher activity of virgin
415 females at peak), and then will search for a blood meal (explaining higher activity of inseminated
416 females during the rest of the night). Moreover, we found that virgin females showed earlier onset
417 of activity that might increase their chance to synchronize with male swarming behaviour.

418 Regarding the effect of blood-feeding, our main results showed that blood meal intake altered the
419 profile and intensity of locomotor activity in *Anopheles*. Blood meal significantly reduced
420 *Anopheles* activity for up to 72 hours, after which an increase in activity was observed. A
421 considerable decrease in activity after blood intake occurs in the wild during resting that is a phase
422 of digestion of the blood meal and maturation of the ovaries. Moreover, some authors have
423 observed in female *Anopheles*, a 72h inhibition of blood meal [63] or sugar meal [16] search after
424 blood feeding but not after sugar feeding [64]. This was confirmed by the analysis of mean hourly

425 activity during the third night of experiment clearly showing that glucose-fed females were more
426 active than blood-fed females. Regarding the resumption of activity of blood-fed females after 72
427 hours, it would correspond, as observed in wild inseminated females, to a search for an oviposition
428 site [44]. This rebound of activity is possible because, in addition to allow the complete
429 development of the ovaries promoting fertility, blood meal intake favoured an accumulation of
430 energetic reserves [65].

431
432 Light and temperature are known to be the strongest zeitgebers, but food availability has also been
433 showed to synchronize circadian rhythms [2,66]. Here under DD photoperiod, we found that
434 insemination delayed onset time of activity by ~14min and time of peak activity of blood-fed
435 females occurred ~32 min earlier than that of sugar-fed females. These results indicate that both
436 blood feeding and insemination had an effect on the endogenous circadian clock of females *An.*
437 *coluzzii*.

438

439 **Conclusion**

440 The difference in temporal organization and/or activity level found in different physiological states
441 can be easily correlated with the biological behaviours observed in the field. Moreover, our results
442 suggest that both insemination and blood-feeding have an effect on the circadian endogenous clock
443 of females *An. coluzzii*.

444

445 **Ethics approval and consent to participate**

446 Not applicable

447

448 **Consent for publication**

449 Not applicable

450

451 **Availability Data and materials**

452 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding
453 author upon reasonable request.

454

455 **Competing interests**

456 The authors declare that they have no competing interests.

457

458 **Funding**

459 This work was supported by grant ANR Anorhythm funded by France Agence Nationale de la
460 Recherche. AST was supported by a PhD fellowship from the Islamic Development Bank.

461

462 **Authors' contributions**

463 A.S.T., N.M., C.C., and K.M. contributed to the conception of the study. A.S.T., A.P., N.M.,
464 C.C., and K.M. contributed to data acquisition and analysis. A.S.T., A.P., N.M., C.C., and K.M.
465 contributed to the data interpretation. A.S.T., A.P., N.M., C.C., and K.M. drafted the work.
466 A.S.T., A.P., N.M., C.C., R.K.D., F.S. and K.M. substantially revised it.

467

468 **Acknowledgements**

469 We thank IRSS field and insectary team. We also tank Florence Fournet for comments on the
470 manuscript.

471

472 **Authors' information (optional)**

473 **Supplementary information**

474 Additional File 1: Among groups comparison statistics of nightly activity, hourly activity, time of
475 onset, time of peak activity and wing size.

476

477 **References**

478 1. Saunders DS. Insect clocks. Pergamon Press, Oxford; 1982.

479 2. Aschoff J. Temporal orientation: circadian clocks in animals and humans. *Animal Behaviour*.
480 1989; 37: 881–96.

481 3. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999; 96: 271–90.

482 4. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila*
483 *pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58: 1762–7.

484 5. Jones MDR, Gubbins SJ, Cubbin CM. Circadian flight activity in four sibling species of the
485 *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*. 1974; 64:
486 241–6.

487 6. Brady J, Crump AJ. The control of circadian activity rhythms in tsetse flies: Environment or
488 physiological clock? *Physiological Entomology*. 1978; 3: 177–90.

489 7. Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma*
490 *infestans*. *Journal of Insect Physiology*. 1992; 38: 895–903.

491 8. Meireles-Filho ACA, S Rivas GB da, Gesto JSM, Machado RC, Britto C, Souza NA de, et al.
492 The biological clock of an hematophagous insect: Locomotor activity rhythms, circadian
493 expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett*. 2006; 580: 2–8.

494 9. Jones MDR, Gubbins SJ. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles*
495 *gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiological Entomology*. 1978; 3:
496 213–20.

497 10. Rund SSC, Lee SJ, Bush BR, Duffield GE. Strain- and sex-specific differences in daily flight
498 activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2012; 58:
499 1609–19.

500 11. Constantinou C. Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma*
501 *phyllosoma*, *T. infestans* and *Panstrongylus megistus* (hemiptera: Reduviidae). *Journal of*
502 *Interdisciplinary Cycle Research*. 1984; 15: 203–12.

- 503 12. Sumba LA, Okoth K, Deng AL, Githure J, Knols BG, Beier JC, et al. Daily oviposition patterns
504 of the African malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) on different types
505 of aqueous substrates. *J Circadian Rhythms*. 2004; 2: 6.
- 506 13. Ampleford EJ, Steel CGH. Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera).
507 *Journal of comparative physiology*. 1982; 147: 281–6.
- 508 14. Clements AN. The biology of mosquitoes. Wallingford: CABI Publishing; 1999.
- 509 15. Yee WL, Foster WA. Diel sugar-feeding and host-seeking rhythms in mosquitoes (diptera:
510 Culicidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol*. 1992; 29: 784–91.
- 511 16. Gary REJ, Foster WA. Diel timing and frequency of sugar feeding in the mosquito *Anopheles*
512 *gambiae*, depending on sex, gonotrophic state and resource availability. *Med Vet Entomol*. 2006;
513 20: 308–16.
- 514 17. Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V, Carnevale P. [The transmission of
515 malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina
516 Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985; 65 Suppl 2: 201–14.
- 517 18. Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, et al. Effects of age and size
518 on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol*. 2013; 50: 285–93.
- 519 19. Macdonald G. The epidemiology and control of malaria. Amen House, Warwick Square,
520 London E.C.4.: Oxford University Press; 1957.
- 521 20. Hocking B. The intrinsic range and speed of flight of insects. *Transactions of the Royal*
522 *Entomological Society of London*. 1953; 104: 223–345.
- 523 21. Nayar JK, Sauerman DMJ. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida
524 mosquitoes. Part 1. Utilization of sugar for survival. *J Med Entomol*. 1975; 12: 92–8.
- 525 22. Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol*. 1995;
526 40: 443–74.
- 527 23. Nayar JK, Sauerman DMJ. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida
528 mosquitoes. Part 3. Utilization of blood and sugar for fecundity. *J Med Entomol*. 1975; 12: 220–5.
- 529 24. Brady J. Circadian changes in central excitability - The origin of behavioural rhythms in tsetse
530 flies and other animals? *Journal of Entomology Series A, General Entomology*. 1975; 50: 79–95.
- 531 25. Lazzari CR, Fischbein D, Insausti TC. Differential control of light-dark adaptation in the ocelli
532 and compound eyes of *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*. 2011; 57: 1545–52.
- 533 26. Saunders DS. Insect photoperiodism in biological rhythms eds. Jürgen aschoff. In: Aschoff J,
534 editor. Boston, MA: Springer US; 1981. pp. 411–47.
- 535 27. Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of
536 the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 2008; 54: 1343–8.

- 537 28. Eilerts DF, VanderGiessen M, Bose EA, Broxton K, Vinauger C. Odor-Specific Daily Rhythms
538 in the Olfactory Sensitivity and Behavior of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insects*. 2018; 9.
- 539 29. Jones MDR, Gubbins SJ. Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles*
540 *gambiae* after insemination. *Nature*. 1977; 268:731–2.
- 541 30. Rowland M. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi*
542 associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity.
543 *Physiological Entomology*. 1989; 14: 77–84.
- 544 31. Das S, Dimopoulos G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles*
545 *gambiae*. *BMC Physiol*. 2008; 8: 23.
- 546 32. Rowland M. Behaviour and fitness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible female
547 *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Med Vet Entomol*.
548 1991; 5: 193–206.
- 549 33. Jones MDR, Hill M, Hope AM. The circadian flight activity of the mosquito *Anopheles*
550 *gambiae*: phase setting by the light regime. *J Exp Biol*. 1967; 47: 503–11.
- 551 34. Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. The Circadian Rhythm of Flight Activity of the Mosquito
552 *Anopheles Gambiae*: The Light-Response Rhythm. *Journal of Experimental Biology*. 1972; 57:
553 337–46.
- 554 35. Rowland M, Boersma E. Changes in the spontaneous flight activity of the mosquito *Anopheles*
555 *stephensi* by parasitization with the rodent malaria *Plasmodium yoelii*. *Parasitology*. 1988;97 (Pt
556 2): 221–7.
- 557 36. Hurd H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review*
558 *of Entomology*. 2003; 48: 141–61.
- 559 37. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions
560 of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of
561 insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*. 2011; 10: 80.
- 562 38. Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, et al. Outdoor host
563 seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control
564 on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*. 2011; 10: 184.
- 565 39. Thomsen EK, Koimbu G, Pulford J, Jamea-Maiasa S, Ura Y, Keven JB, et al. Mosquito
566 Behavior Change After Distribution of Bednets Results in Decreased Protection Against Malaria
567 Exposure. *J Infect Dis*. 2017; 215: 790–7.
- 568 40. Moiroux N, Gomez MB, Penetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in
569 *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets
570 in Benin. *J Infect Dis*. 2012; 206: 1622–9.
- 571 41. Sherrard-Smith E, Skaup JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, et al. Mosquito
572 feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. *Proceedings of*
573 *the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019; 116: 15086–95.

- 574 42. Boake CRB. Quantitative genetic studies of behavioral evolution. University of Chicago Press;
575 1994.
- 576 43. Jones MDR, Ford MG, Gillett JD. Light-on and light-off effects on the circadian flight activity
577 in the mosquito *Anopheles gambiae*. Nature. 1966; 211: 871–2.
- 578 44. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian
579 Zoogeographical Region). Johannesburg: South African Institute for Medical Research. Second
580 edition. 1968.
- 581 45. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Torre A della. Insertion polymorphisms of
582 SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar
583 J. 2008; 7: 163.
- 584 46. Ruiz JL, Yerbanga RS, Lefèvre T, Ouedraogo JB, Corces VG, Gómez-Díaz E. Chromatin
585 changes in *Anopheles gambiae* induced by *Plasmodium falciparum* infection. Epigenetics &
586 Chromatin. 2019; 12: 5.
- 587 47. Rosato E, Kyriacou CP. Analysis of locomotor activity rhythms in *Drosophila*. Nat Protoc.
588 2006; 1: 559–68.
- 589 48. Sheppard AD, Rund SSC, George GF, Clark E, Acri DJ, Duffield GE. Light manipulation of
590 mosquito behaviour: Acute and sustained photic suppression of biting activity in the anopheles
591 *gambiae* malaria mosquito. Parasit Vectors. 2017; 10: 255.
- 592 49. Duffield GE, Acri DJ, George GF, Sheppard AD, Beebe NW, Ritchie SA, et al. Diel flight
593 activity of wild-caught *Anopheles farauti* (s.s.) and *An. hinesorum* malaria mosquitoes from
594 northern Queensland, Australia. Parasit Vectors. 2019; 12: 48.
- 595 50. Lima-Camara TN, Lima JP, Bruno RV, Peixoto AA. Effects of insemination and blood-feeding
596 on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under
597 laboratory conditions. Parasit Vectors. 2014; 7: 304.
- 598 51. Christophers S. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and
599 structure. London: The Syndics of the Cambridge University Press, Bentley House, 200, Euston
600 Road, N.W.I. 1960.
- 601 52. Harbach RE, Knight KL. Taxonomists's glossary of mosquito anatomy. Marlton, New Jersey:
602 Plexus Publishing, Inc. 1980.
- 603 53. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.
604 Nat Methods. 2012; 9: 671–5.
- 605 54. Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC. DNA analysis of transferred
606 sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. Mol
607 Ecol. 2001; 10: 1725–32.
- 608 55. Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian
609 rhythms. J Theor Biol. 1978; 72: 131–60.

- 610 56. Brooks ME, Kristensen K, Benthem KJ van, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, et al.
611 glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear
612 mixed modeling. *The R Journal*. 9.
- 613 57. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R
614 Foundation for Statistical Computing; 2020.
- 615 58. Hartig F. *DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression*
616 *Models*. R package version 0.3.3.0. 2020.
- 617 59. Lenth R HM Buerkner P. Package “emmeans”: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares
618 Means. R package version 1.5.2-1. 2020.
- 619 60. Haddow AJ, Ssenkubuge Y. Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito
620 *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles. *Ann Trop Med Parasitol*. 1962; 56: 352–5.
- 621 61. Clements AN. *The Physiology of Mosquitoes*. Kerkut GA, editor. Pergamon Press; 1963.
- 622 62. Charlwood J, Jones M. Mating behaviour in the mosquito, *Anopheles gambiae* s.l. I. Close
623 range and contact behaviour. *Physiological Entomology*. 1979; 4: 111–20.
- 624 63. Takken W, Loon J van, Adam W. Inhibition of host-seeking response and olfactory
625 responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *J Insect Physiol*. 2001; 47: 303–
626 10.
- 627 64. Gary REJ, Foster WA. Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial
628 capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2001; 38:
629 22–8.
- 630 65. Briegel H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of
631 malaria. *J Med Entomol*. 1990; 27: 839–50.
- 632 66. Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. *Chronobiology: biological timekeeping*. Sunderland,
633 Mass.: Sinauer Associates; 2004.

Chapitre 4

Effet de l'allèle de résistance aux insecticides L1014F du gène VGSC (kdr) sur le rythme d'activité d'*Anopheles coluzzii*

(Ce chapitre fera l'objet d'un article ultérieurement)

Introduction

Le paludisme, en dépit des efforts de lutte, reste un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne. En l'absence de vaccin, l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée (MILD) demeure le principal outil de prévention contre le paludisme. L'efficacité des MILD à réduire la transmission repose sur le fait que les anophèles vecteurs piquent principalement au milieu de la nuit (Gillies & De Meillon 1968 ; Gillies & Coetzee 1987), et empêchent ainsi le contact homme-vecteur. Ainsi, l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées par les programmes nationaux de lutte contre le paludisme a contribué à réduire grandement la mortalité et la morbidité imputable au paludisme (Schellenberg et al. 2001 ; Corbel et al. 2012 ; Bhatt et al. 2015).

Cependant, la persistance d'une transmission qualifiée de « résiduelle » démontre une nouvelle fois la remarquable capacité d'adaptation des anophèles vecteurs à l'homme et à son environnement (Coluzzi et al. 1979 ; Costantini et al. 2009 ; Simard et al. 2009). La pression de sélection exercée par les insecticides utilisés en santé humaine et en agriculture (Diabate et al. 2002 ; Czeher et al. 2008 ; Donnelly et al. 2009) engendre le développement de résistances aux insecticides (Stump et al. 2004), aussi bien physiologiques que comportementales. De récentes études ont en effet montré que l'utilisation universelle des MILD incite les anophèles vecteurs à changer leur comportement de piqûre qui devient beaucoup plus marqué vers l'extérieur (exophagie) ou décalé vers des heures précoces et/ou tardives de la nuit, lorsque les personnes ne sont pas protégées par leur MILD (Charlwood & Graves 1987 ; Mbogo et al. 1996 ; Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011 ; Corbel et al. 2012 ; Moiroux et al. 2012 ; Thomsen et al. 2017 ; Sherrard-Smith et al. 2019).

Cependant, il est difficile de circonscrire les fondements de ces nouveaux comportements de piqûre. En effet, ces changements peuvent être aussi dus à une plasticité phénotypique ou à des facteurs génétiques permettant aux populations vectrices de continuer d'avoir un accès à leur hôte. Les anophèles, à l'instar des autres insectes, possèdent des horloges internes qui permettent l'occurrence de divers comportements tels l'émergence, le vol, l'essaimage, la piqûre ou encore la ponte à des plages horaires précises (Pittendrigh 1967 ; Saunders 1982). Ces horloges circadiennes internes peuvent se synchroniser avec des signaux externes comme la lumière, la température, la nourriture et l'état physiologique (Pittendrigh & Minis 1964 ; Jones & Gubbins 1977, 1978 ; Saunders 1982 ; Robert et al. 1985 ; Edgar et al. 2012 ; Sawadogo et al. 2013b). Il est donc possible que la variation du lieu et/ou de l'heure de piqûre des anophèles vecteurs récemment rapportée, ait une base génétique. Ainsi, il a été constaté des différences d'activité entre les différents génotypes (résistant homozygote, sensible homozygote et résistant hétérozygote) chez les moustiques femelles *Anopheles gambiae* et *An. stephensi* en l'absence d'insecticide (Rowland 1991). En outre, la preuve fournie par Moiroux et al. (2012) suggèrent que le changement de comportement de piqûre des vecteurs du paludisme dans une zone indemne de résistance physiologique aux insecticides, avec des piqûres se produisant quand les populations ne sont pas protégées par leurs moustiquaires, serait dû aux populations vectrices portant les allèles homozygotes sensibles. Aussi, on a observé que les mutations du gène *VGSC* (remplacement de la leucine par la phénylalanine en position 1014 communément appelée mutation *kdr* L1014F ou *kdr* ouest) conférant une résistance aux insecticides peuvent perturber certains comportements des moustiques (Diop et al. 2015 ; Porciani et al. 2017) et les rendraient moins aptes à certains du fait du coût du portage de cette mutation.

Il était donc pertinent de vérifier si le portage de la mutation du gène L1014F pouvait avoir un impact sur les rythmes d'activité journalière des anophèles vecteurs. Ainsi, pour comprendre le comportement de piqûre décalé observé sur le terrain chez les anophèles vecteurs, nous avons utilisé une approche de comparaison au laboratoire de l'activité de locomotion d'une F1 issue d'une population naturelle d'*Anopheles coluzzii* selon la présence ou absence de la mutation L1014F.

Matériels et méthode

Collecte des anophèles

Une collecte de la faune résiduelle a été réalisée tôt le matin dans le village de Longo situé à environ 65 km de Bobo-Dioulasso dans le Sud-Ouest du Burkina Faso (11° 34' 60" Nord, 4° 34' 00" Ouest, province du Houët, région des Hauts-Bassins, sud-ouest du Burkina Faso). Deux cents femelles gravides et ou gorgées ont été collectées à l'aide d'aspirateur à bouche puis transférées dans des pots de capture. A la fin de la collecte les femelles identifiées comme *An. gambiae s.l* à l'aide des clés d'identification de Gillies & De Meillon (1968) ont été transférées dans des cages plus grandes (25 cm x 25 cm x 20 cm). Un morceau de coton imbibé d'une solution d'eau glucosée à 5% de glucose était déposé sur la cage pour hydrater *ad libitum* les anophèles. Un tissu humide était ensuite déposé sur les cages et le tout transporté vers l'insectarium de l'IRSS à Bobo-Dioulasso.

Élevage des anophèles à l'insectarium

Les femelles anophèles une fois à l'insectarium de l'IRSS à Bobo-Dioulasso, ont été gardées pendant 3 jours selon les protocoles de l'IRSS et comme décrit précédemment par Ruiz et al. (2019) (27 ± 2 °C, 70 ± 5 % de HR et un régime LD de 12 : 12) jusqu'à la fin de la digestion sanguine. A la fin de ces trois jours, un pondoir constitué d'une boîte de Pétri remplie de coton entassé, gorgé d'eau et recouverte par une feuille de papier était déposé dans chaque cage afin de recueillir les œufs. Quarante-huit heures après le dépôt, les pondoirs étaient retirés et les œufs mis en eau dans des bacs (30 cm x 20 cm) contenant un litre d'eau. Les larves issues de l'éclosion des œufs ont été nourries *ad libitum* à l'aide de l'alimentation pour alevin (*Tetramin™ baby fish food*) jusqu'à l'obtention des nymphes. Les nymphes ont été placées individuellement dans des tubes de plexiglas de drosophile (L=9,3 cm ; D=2,5 cm) contenant 1,5 ml d'eau déionisée, bouchés avec un morceau de mousse de coton. Ces tubes contenant les nymphes ont été disposés dans un portoir et déposés dans une boîte en bois (50 cm x 50 cm x 50 cm). Les conditions environnementales à l'intérieur de cette boîte étaient composées d'une température de 27 ± 2 °C, d'une humidité relative de 70 ± 5 % et d'un régime lumière/obscurité (LD) de 12h/12h, avec une transition de 1h entre la lumière et l'obscurité et une transition de 1h entre l'obscurité et la lumière également (de 17 à 18h et de 5 à 6h, respectivement) opérée à l'aide d'un système fait maison, composé d'une LED (Vision-EL® GU5.3, 12V, 4000°K, 530 lumens, 6-55W) contrôlée à l'aide du logiciel Programmable LED Time

Controlleur TC420 (20A, 12V-24V). Ces conditions d'éclairage, de température et d'humidité relative ont été imposées aux nymphes jusqu'à l'émergence. A l'émergence, les anophèles ont été triés selon le sexe (mâles et femelles) puis regroupés dans de grandes cages (25 cm x 25 cm 20 cm) sans aucun contact entre mâles et femelles afin d'éviter toute insémination. Les cages contenant les femelles ont été maintenues dans la boîte en bois dans les mêmes conditions environnementales précédentes, avec une solution d'eau glucosée à 5% de glucose *ad libitum* pendant les quatre jours nécessaires à la maturation de tous leurs organes sexuels. Ce maintien à ces régimes de lumière, de température et d'humidité permettait entraîner ces femelles dès leur émergence aux conditions des tests à venir. Seules ces femelles ont été utilisées pour nos expériences.

Préparation des tubes pour l'enregistrement

Pour l'enregistrement du rythme d'activité des anophèles, nous avons utilisé des tubes à hémolyse (ou tube de drosophile) en plexiglas transparent de 9,3 cm de longueur et de 2,5 cm de diamètre. Les tubes, neufs, ont été nettoyés après leur déballage en les immergeant dans une solution d'eau javellisée pendant 20 minutes, puis ensuite dans de l'eau distillée pendant une heure. A la fin de ces deux immersions, ils ont été rincés avec de l'eau distillée avant de les laisser sécher. Après le séchage, une boule de coton enroulé était déposée au fond du tube, puis compactée de sorte à avoir 1cm de hauteur. A l'aide d'une seringue, 10 ml d'une solution injectable de sérum glucosé pharmaceutique stérile (solution de glucose pour injection à 5% USP, Shandoung Qidu Pharmaceutical Co., Ltd.) dosé à 5% (50 mg de glucose dans 1 litre d'eau pour préparation injectable) était utilisée pour mouiller délicatement le coton sans éclabousser la paroi du tube. L'utilisation de sérum glucosé officinal avait pour but d'éviter l'apparition rapide de champignons dans les tubes et d'utiliser une solution stérile et hautement homogène. Une fois le coton engorgé de solution glucosée, le tube était laissé au repos pendant 10 min afin de permettre au coton de bien absorber la solution. Après ce temps d'absorption, le surplus de solution glucosée était retiré à l'aide d'une seringue. Environ 5 à 7 ml de solution glucosée restait dans le coton. Les tubes toujours ouverts, étaient regroupés par 32 puis placés dans un portoir. Dix heures plus tard, la base des tubes était recouverte de ruban adhésif jusqu'au niveau du coton, puis les anophèles femelles étaient introduites individuellement dans les tubes (Figure 12). La présence du coton imbibé d'eau glucosée stérile disposé au fond du tube, permettait aux femelles de se nourrir *ad libitum*. Un bouchon de coton hyper enroulé a servi à boucher le tube. Une fois la femelle anophèle déposée

dans le tube, toute la paroi du tube était recouverte à l'aide de ruban adhésif à l'exception d'une bande vide d'un centimètre correspondant au centre du tube.

Enregistrement de l'activité locomotrice

Trente-deux tubes ont été choisis aléatoirement et numérotés de 1 à 32, puis disposés dans les 32 canaux (8 x 5) du système de mesure de rythme *Locomotor Activity Monitor* (LAM system, TriKinetics, Waltham, MA system) pour mesurer l'activité spontanée des moustiques. Les tubes ont été disposés de sorte à faire correspondre le centre du tube ne portant pas de ruban adhésif avec le système émetteur/détecteur infrarouge du LAM permettant à ce dernier de détecter le passage de l'anophèle. Le revêtement des tubes par du ruban adhésif à l'exception à l'exception d'une bande de 1 cm de large centrée autour du système émetteur/détecteur infrarouge a été inventé après la détection d'activité (artéfacts) dans les tubes vides lors de la mise au point de notre dispositif d'enregistrement dans 3 de nos 7 LAM (ces trois appareils provenant du même achat). Il a été constaté que ce type de revêtement supprimait les artefacts sans avoir d'incidence sur l'enregistrement de l'activité (données non présentées). Le LAM ainsi chargé des tubes et relié à un ordinateur, a été placé dans une caisse en bois (50 cm x 50 cm x 50 cm) afin de l'isoler des perturbations de l'insectarium. La température à l'intérieur des caisses était de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une humidité relative de $70 \pm 5\%$. Selon les caisses, un régime de jour-nuit LD 12 : 12 avec une transition lumière/obscurité le soir d'une heure (mimant le crépuscule) et obscurité/lumière d'une heure le matin (mimant l'aurore) ou un régime d'obscurité constante (DD) a été appliqué. Le système LAM et son utilisation pour la mesure de l'activité des moustiques ont été décrits précédemment par Rund et al. (2012). A chaque test, un nombre de boîtes équivalent au nombre de LAM a été utilisé. Ces boîtes étaient identiques à celles utilisées pour l'émergence et l'entraînement des adultes.

Pour cette étude, quatre répliques ont été utilisés :

- 1er réplique : juillet 2018, cinq LAM en LD et deux LAM en DD ;
- 2ème réplique : août 2018, trois LAM en LD uniquement à cause d'un manque de moustiques ;
- 3ème réplique : septembre 2018, cinq LAM en LD et deux LAM en DD ;
- 4ème réplique : octobre 2018, cinq LAM en LD et deux LAM en DD.

Pour chaque LAM, 30 tubes contenant une femelle chacun ont été utilisés (tubes tests) ainsi que 2 tubes vides ne contenant pas de moustiques (tubes contrôles). L'utilisation des tubes contrôles avait pour but de s'assurer de l'absence d'artéfacts au cours des enregistrements.

Détermination des statuts d'espèces et de résistance

A la fin de l'enregistrement, les femelles ont été tuées en les plaçant à une température de -20°C pendant 30 min. L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du protocole CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) (Doyle & Doyle 1987) modifié. Deux PCR ont été réalisées à la suite de l'extraction. La première pour déterminer le statut d'espèce (Santolamazza et al. 2008) et la seconde afin de déterminer le statut de résistance aux insecticides (Martinez-Torres et al. 1998). Nous avons exclu de l'étude les femelles qui n'ont pas été identifiées comme étant l'espèce *Anopheles coluzzii*.

Analyses statistiques

Pour choisir le modèle d'analyses statistiques, nous avons d'abord testé la normalité des données de l'activité locomotrice d'*Anopheles coluzzii* en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. La significativité de la p.value du test de Kolmogorov-Smirnov nous a permis de conclure que les hypothèses de normalité n'étaient pas satisfaites. Cela est dû au fait que les données générées par l'enregistrement de l'activité de vol spontané des anophèles grâce au LAM sont des suites finies de valeurs numériques représentant l'activité (vol ou repos) au cours du temps. Une telle suite de variables aléatoires est appelée série temporelle. Les valeurs possibles de ces variables aléatoires (stochastique) sont considérées comme les états possibles du processus stochastique. Les séries temporelles suivent généralement une loi de Poisson, nécessitant ainsi d'autres types d'analyses statistiques que celles de la loi normale. Les variables étant stochastiques, il est donc possible de les exprimer mathématiquement pour comprendre leurs évolutions passées et futures à l'aide de modèles de probabilité.

Nous avons recherché des différences dans l'activité locomotrice des différents génotypes d'*Anopheles coluzzii* pour évaluer l'effet du portage du gène kdr.

Nous avons résumé l'activité locomotrice d'*An. coluzzii* en trois indicateurs à savoir :

- La moyenne d'activité journalière des trois génotypes ;

- l'heure du démarrage de l'activité crépusculaire ;
- l'heure du pic maximum de l'activité crépusculaire ;

Pour chacun de ces indices, nous avons analysé l'activité locomotrice avec un modèle logistique binomial à effets mixtes en utilisant la fonction *glmmTMB* du package « *glmmTMB* » (Magnusson et al. 2020). Tous les modèles comprenaient l'activité, les génotypes kdr (SS, RS ou RR) et leurs interactions comme variables explicatives à termes fixes et l'individu comme interception aléatoire.

Tous les modèles ont été validés par observation des résidus via les outils fournis par le package « *DHARMA* » (Hartig 2020).

Nous avons effectué des comparaisons multiples entre les moyennes d'activité journalière des trois génotypes en utilisant la fonction *emmeans* du package « *emmeans* » (Lenth et al. 2020)

Nous avons calculé les Rate Ratios (*RR.*) des modèles binomiaux négatifs et leurs intervalles de confiance à 95%.

Nous avons utilisé la fonction *emmeans* du package « *emmeans* » pour obtenir des estimations et des intervalles de confiance à 95 % des moyennes marginales estimées de l'activité de vol spontané de chaque génotype pour chaque mois et de les comparer par paires grâce aux p-value obtenues à l'aide de la fonction *contrast*.

Toutes nos analyses, de même que l'édition des graphiques présentés ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.0.2 (2020-06-22).

Résultats

Les données de l'activité locomotrice ont été collectées chaque mois pendant au moins six nuits de juillet à octobre sauf pour la condition DD pour laquelle nous n'avons pas pu faire d'enregistrement en août à cause d'un nombre insuffisant de moustiques. Les premiers jours (pour cause de manipulation) et les derniers jours (incomplet ou du fait de la mortalité) des enregistrements en LD comme en DD ont été exclus lors des analyses.

Les analyses ont porté sur un total de 357 *Anopheles coluzzii* répartis sur quatre mois entre trois génotypes dans deux régimes lumineux DD et LD (Tableau 1).

Tableau 1 : Effectifs des génotypes RR (résistants homozygotes), RS (résistants hétérozygotes) et SS (sensibles homozygotes) par mois en régime LD et DD

Mois	Génotypes					
	LD			DD		
	RR	RS	SS	RR	RS	SS
Juillet	33	32	22	9	9	5
Août	15	15	9	-	-	-
Septembre	34	21	18	9	5	7
Octobre	32	33	13	14	20	2
Total	114	101	62	32	34	14

Effet de la mutation KDR sur l'activité totale

Les Figures 1 et 2 montrent l'activité locomotrice de vol spontané des trois génotypes en fonction du temps, respectivement en condition LD et DD. Le premier jour du premier pic représente le sixième jour après l'émergence.

Données en LD

La Figure 1 montre les courbes moyennes minutaires d'activité locomotrice de vol spontané de l'ensemble des moustiques *Anopheles coluzzii* étudiés, regroupés en trois génotypes en condition LD 12 : 12 pendant toute la période d'enregistrement. Ces courbes moyennes du rythme montrent clairement un profil similaire entre les trois génotypes, indépendamment du jour d'enregistrement et du mois mais avec des différences d'intensité (d'amplitude). Les anophèles sont très peu, voire, pas du tout actifs pendant la photophase (période de lumière) et très actifs pendant la scotophase (période d'obscurité) avec un pic d'activité se produisant chaque jour après l'extinction de la

lumière à 18h (activité crépusculaire). Cette activité crépusculaire est nettement différenciée du reste de l'activité nocturne indépendamment du mois. L'activité est cyclique.

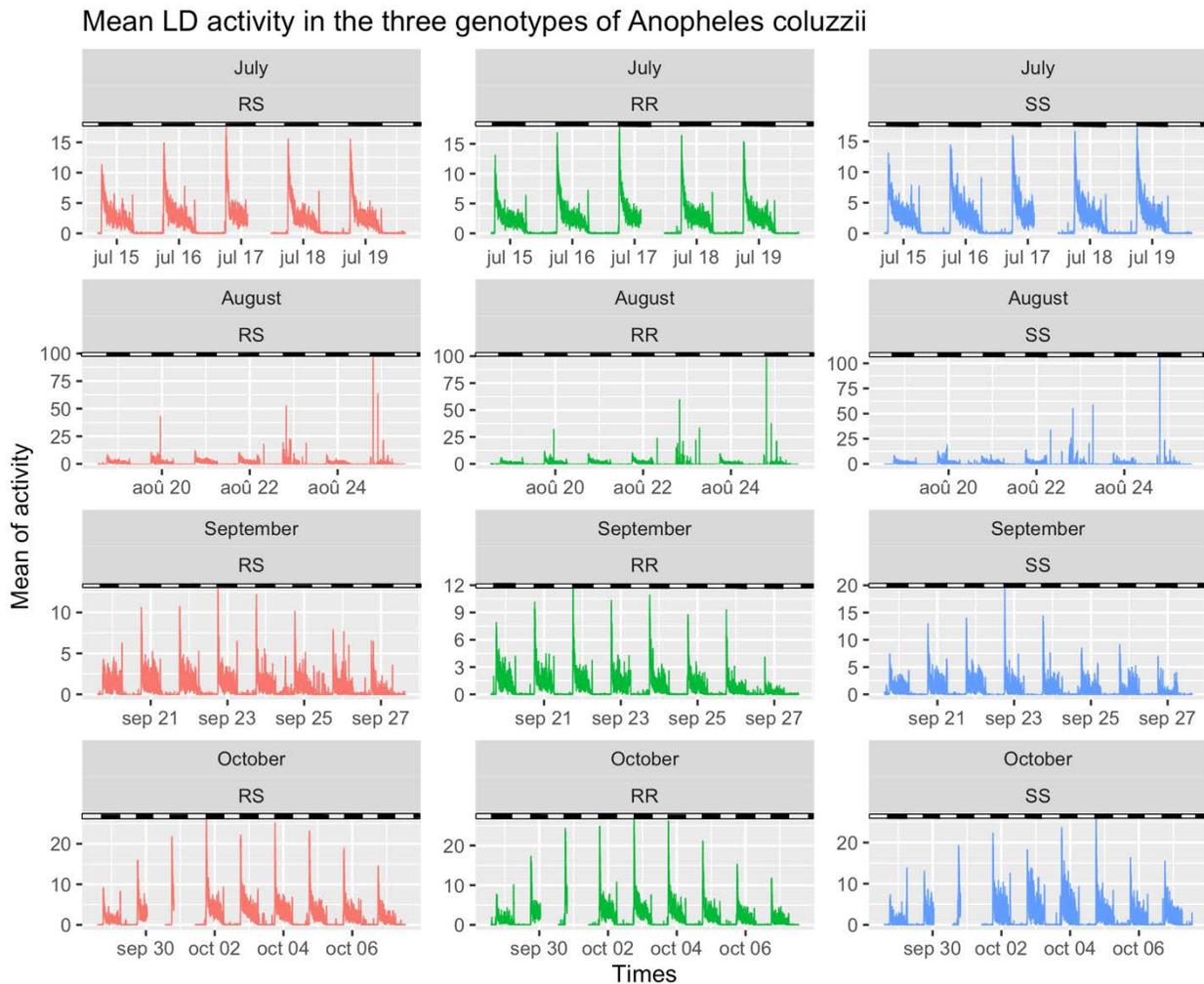


Figure 1: Courbes brutes de l'activité journalière de vol spontané d'*Anopheles coluzzii* en régime LD 12 : 12 des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre la moyenne minutaire de l'activité journalière. L'activité locomotrice est mesurée toutes les minutes en continu pendant toute la période d'enregistrement et correspond au nombre de passages par minute. Le graphique ne met en évidence aucune différence significative de l'activité locomotrice entre les différents génotypes au cours des mois. Les espaces vides (interruptions de courbes) présents aux mois de juillet (July) et d'octobre (October) représentent les périodes d'absence de données due à une coupure d'électricité.

L'analyse de l'activité locomotrice des trois génotypes n'a montré aucune différence significative entre les activités totales des trois génotypes (RS, RR et SS) quel que soit le mois (Tableau 2, Figure 2).

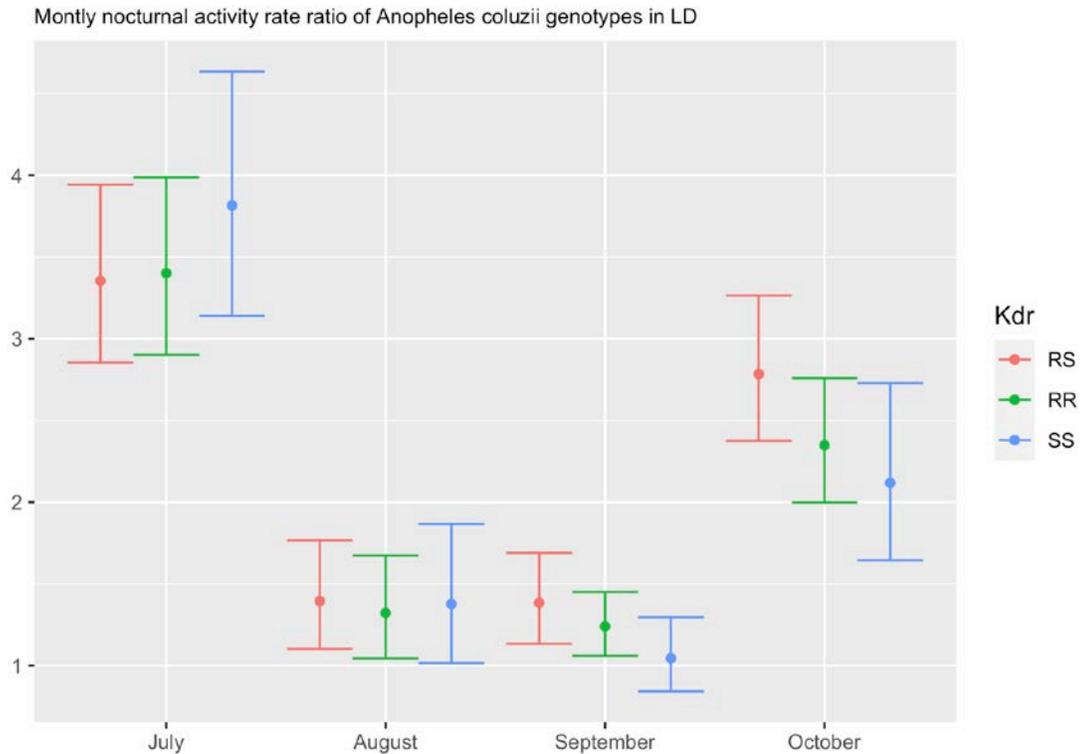


Figure 2: Comparaison des moyennes d'activité journalière de vol spontané en régime LD 12 : 12 entre des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre une différence significative de l'activité locomotrice entre tous les mois chez le génotype homozygote résistant RR à l'exception des mois d'août et septembre en LD ($RR_{RRaoût-septembre} = 1,07 [0,74 - 1,54], p = 0,97$).

Tableau 2 : Comparaison des ratios d'activité journalière par mois entre les génotypes RR, RS et SS en condition LD

Contrast	Month	ratio	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
RS / RR	July	0.9862454	0.1139540	1343552	0.7522784	1.292979	-0.1198689	0.9921097
RS / SS	July	0.8792533	0.1133921	1343552	0.6499010	1.189545	-0.9978148	0.5782313
RR / SS	July	0.8915157	0.1142623	1343552	0.6601980	1.203882	-0.8959625	0.6428555
RS / RR	August	1.0556480	0.1796564	1343552	0.7084257	1.573055	0.3182095	0.9457149
RS / SS	August	1.0134667	0.1991546	1343552	0.6394290	1.606300	0.0680725	0.9974485
RR / SS	August	0.9600423	0.1886611	1343552	0.6057146	1.521643	-0.2075075	0.9765418
RS / RR	September	1.1163803	0.1443721	1343552	0.8244822	1.511621	0.8513002	0.6710254
RS / SS	September	1.3249534	0.1983671	1343552	0.9328482	1.881873	1.8794038	0.1446415
RR / SS	September	1.1868298	0.1612877	1343552	0.8631056	1.631973	1.2604003	0.4177116
RS / RR	October	1.1857734	0.1369437	1343552	0.9045876	1.554364	1.4754254	0.3027624
RS / SS	October	1.3143111	0.2003824	1343552	0.9194199	1.878808	1.7926622	0.1720055
RR / SS	October	1.1083999	0.1697431	1343552	0.7741399	1.586987	0.6720373	0.7797651

L'analyse du niveau d'activité au sein d'un même génotype (Tableau 3) montrait une variation statistiquement significative du niveau (taux ou Rate Ratio : *RR*.) d'activité entre tous les mois à l'exception des mois d'août et septembre chez tous les génotypes ($RR_{RR\text{août-septembre}} = 1,07 [0,74 - 1,54]$, $p = 0,97$; $RR_{RS\text{août-septembre}} = 1,01 [0,67 - 1,51]$, $p = 0,99$; $RR_{SS\text{août-septembre}} = 1,32 [0,81 - 2,15]$, $p = 0,47$); en plus des mois de juillet et octobre chez les hétérozygotes RS ($RR_{RS\text{juillet-octobre}} = 1,20 [0,89 - 1,62]$, $p = 0,37$) et des mois d'août et octobre ($RR_{SS\text{août-octobre}} = 0,65 [0,39 - 1,09]$, $p = 0,14$) chez les homozygotes sensible SS.

Tableau 3 : Comparaison des ratios d'activité journalière entre les mois pour un même génotype en condition LD

Contrast	Kdr	ratio	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
July / August	RS	2.4036066	0.3504517	1343552	1.6526818	3.4957272	6.0147856	0.0000000
July / September	RS	2.4234268	0.3170257	1343552	1.7317098	3.3914444	6.7665655	0.0000000
July / October	RS	1.2047299	0.1391582	1343552	0.8953926	1.6209362	1.6124638	0.3714895
August / September	RS	1.0082461	0.1588301	1343552	0.6726769	1.5112159	0.0521309	0.9999492
August / October	RS	0.5012176	0.0727120	1343552	0.3452777	0.7275856	-4.7612288	0.0000114
September / October	RS	0.4971184	0.0646259	1343552	0.3559717	0.6942312	-5.3763174	0.0000005
July / August	RR	2.5727495	0.3733166	1343552	1.7721580	3.7350167	6.5123930	0.0000000
July / September	RR	2.7431974	0.3123064	1343552	2.0475545	3.6751804	8.8638180	0.0000000
July / October	RR	1.4484597	0.1673293	1343552	1.0765057	1.9489311	3.2071805	0.0073309
August / September	RR	1.0662513	0.1540403	1343552	0.7356531	1.5454183	0.4440329	0.9707790
August / October	RR	0.5630007	0.0820813	1343552	0.3871202	0.8187891	-3.9403550	0.0004722
September / October	RR	0.5280188	0.0605763	1343552	0.3932332	0.7090038	-5.5666181	0.0000002
July / August	SS	2.7705043	0.5107728	1343552	1.7252987	4.4489073	5.5273599	0.0000002
July / September	SS	3.6518800	0.5408440	1343552	2.4961963	5.3426198	8.7457169	0.0000000
July / October	SS	1.8008348	0.2933417	1343552	1.1850387	2.7366245	3.6112889	0.0017327
August / September	SS	1.3181283	0.2508409	1343552	0.8084179	2.1492130	1.4514530	0.4671752
August / October	SS	0.6500025	0.1313177	1343552	0.3868218	1.0922427	-2.1322911	0.1428722
September / October	SS	0.4931254	0.0836271	1343552	0.3189684	0.7623722	-4.1689323	0.0001794

Données en DD

La Figure 3 montre l'activité locomotrice de vol spontané par minute des trois génotypes d'*Anopheles coluzzii* en condition DD (obscurité constante) pendant toute la période d'enregistrement. Les moustiques ont été entraînés en condition LD 12 : 12 dès le stade nymphal puis placés à l'obscurité constante (DD) à partir de la période d'obscurité du dernier jour du cycle

d'entraînement. L'activité des anophèles se poursuit en DD avec un pic en début de période active qui peut parfois être peu différencié du reste de l'activité. Cependant, on remarque un décalage d'environ une heure par jour quant au début de l'activité par rapport aux femelles en LD.

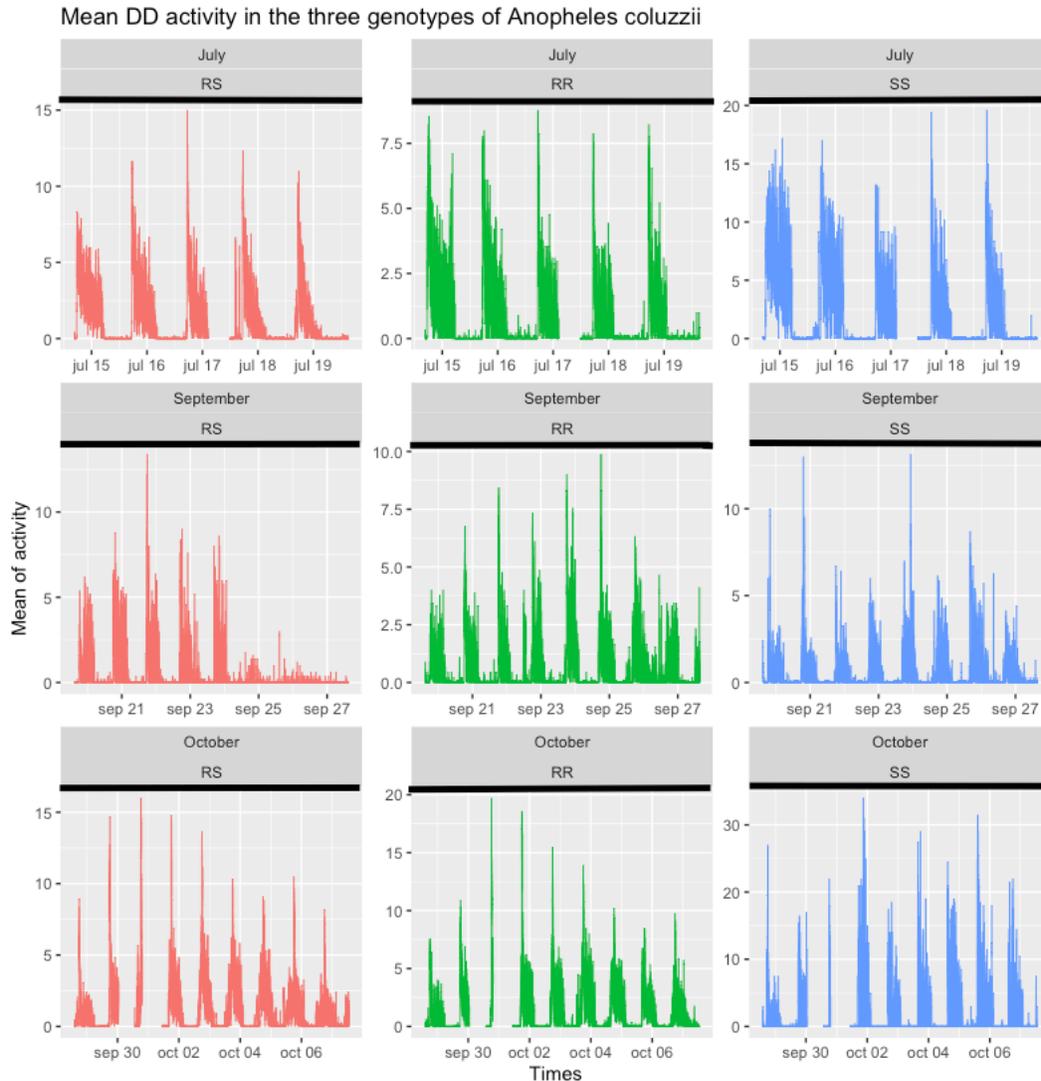


Figure 3: Courbes brutes de l'activité journalière de vol spontané d'*Anopheles coluzzii* en régime DD des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre la moyenne minutaire de l'activité journalière. L'activité locomotrice est mesurée toutes les minutes en continue pendant toute la période l'enregistrement et correspond au nombre de passage par minute. Le graphique ne met en évidence aucune différence significative de l'activité locomotrice entre les différents génotypes au cours des mois. Les espaces vides (interruptions de courbes) présents aux mois de juillet (July) et d'octobre (October) représentent les périodes d'absence de données due à une coupure d'électricité.

L'analyse du niveau d'activité des trois génotypes a montré une différence significative entre l'activité totale du génotype homozygote résistant RR et celle des deux autres génotypes (RS et SS) seulement pour le mois de juillet ($RR_{\text{JuilletRS-RR}} = 2.00 [1,12 - 3,57]$, $p = 0.014$; $RR_{\text{JuilletRR-SS}} = 0,43 [0,22 - 0,85]$, $p = 0,011$; $RR_{\text{JuilletRS-SS}} = 0,86 [0,43 - 0,88]$, $p = 0,87$) (Figure 4 ; Tableau 4).

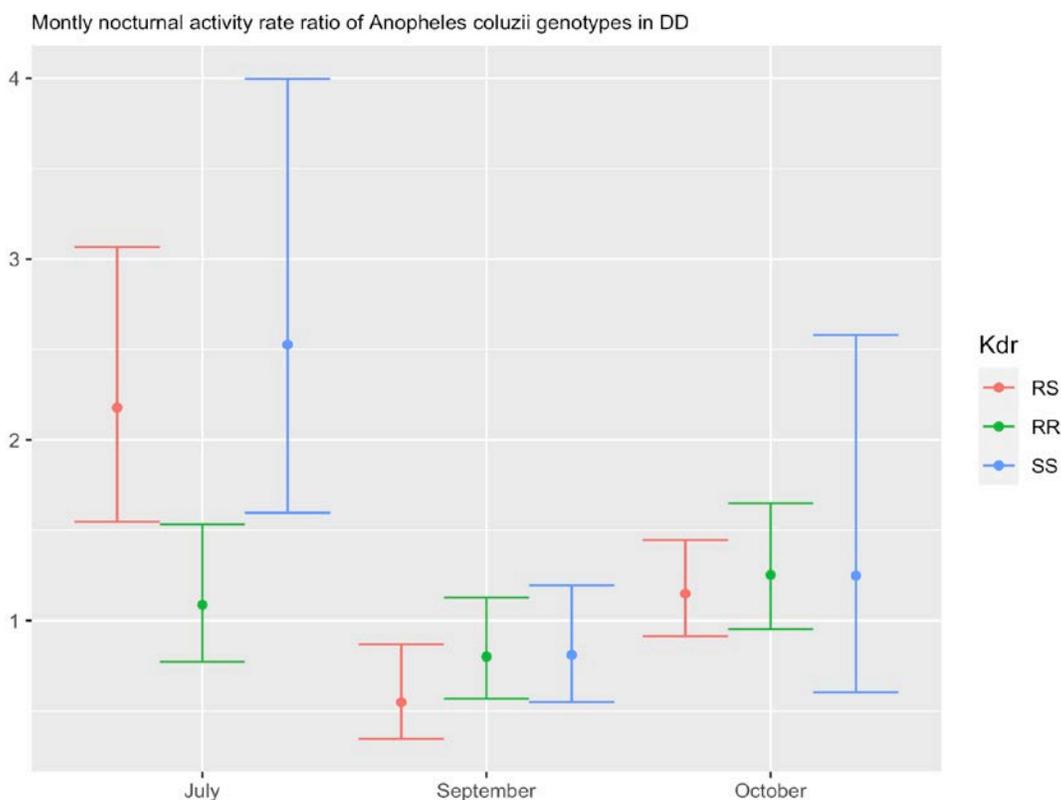


Figure 4: Comparaison des moyennes d'activité journalière de vol spontané en régime DD entre des génotypes RS (résistants hétérozygotes en rouge), RR (résistants homozygotes en vert) et SS (sensibles homozygotes bleu) de juillet à octobre. Le graphique montre une différence significative de l'activité locomotrice entre le génotype homozygote résistant RR et les deux autres SS et RS pour le mois de juillet ($RR_{\text{JuilletRS-RR}} = 2.00 [1,12 - 3,57]$, $p = 0.014$; $RR_{\text{JuilletRR-SS}} = 0,43 [0,22 - 0,85]$, $p = 0,011$; $RR_{\text{JuilletRS-SS}} = 0,86 [0,43 - 0,88]$, $p = 0,87$).

Tableau 4 : Comparaison des ratios d'activité journalière par mois entre les génotypes RR, RS et SS en condition DD

Contrast	Month	ratio	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
RS / RR	July	2.0027427	0.4945941	398146	1.1226828	3.5726730	2.8122862	0.0136368
RS / SS	July	0.8621861	0.2516729	398146	0.4349986	1.7088902	-0.5079949	0.8674495
RR / SS	July	0.4305027	0.1257594	398146	0.2170888	0.8537178	-2.8850989	0.0109207
RS / RR	September	0.6852049	0.2003926	398146	0.3452564	1.3598755	-1.2926275	0.3993077
RS / SS	September	0.6770425	0.2078299	398146	0.3297368	1.3901588	-1.2705632	0.4118680
RR / SS	September	0.9880876	0.2608788	398146	0.5321781	1.8345682	-0.0453895	0.9988648
RS / RR	October	0.9172301	0.1673027	398146	0.5981656	1.4064852	-0.4736675	0.8836996
RS / SS	October	0.9200529	0.3571509	398146	0.3704214	2.2852280	-0.2146505	0.9749199
RR / SS	October	1.0030775	0.3968944	398146	0.3968190	2.5355753	0.0077658	0.9999668

L'analyse du niveau d'activité au sein d'un même génotype (Tableau 5) montrait une variation statistiquement significative du niveau de l'activité entre tous les mois pour le génotype hétérozygote RS ($RR_{RS\text{juillet_septembre}} = 3,97 [2,00 - 7,88]$, $p < 0,0001$; $RR_{RS\text{juillet_octobre}} = 1,89 [1,16 - 3,10]$, $p = 0,007$; $RR_{RS\text{septembre_octobre}} = 0,48 [0,26 - 0,88]$, $p = 0,01$) contrairement au génotype homozygote résistant RR chez qui aucune variation n'a été constatée entre les mois. Quant au génotype homozygote sensible SS on notait seulement une variation signification du niveau de l'activité entre les mois de juillet et septembre ($RR_{SS\text{juillet_septembre}} = 3,12 [1,52 - 6,39]$, $p = 0,0007$).

Tableau 5 : Comparaison des ratios d'activité journalière entre les mois pour un même génotype en condition DD

contrast	KDR	ratio	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
July / September	RS	3.9698355	1.1604911	398146	2.0009001	7.876252	4.7163741	0.000072
July / October	RS	1.8949076	0.3980581	398146	1.1581631	3.100319	3.0426920	0.0066293
September / October	RS	0.4773265	0.1251326	398146	0.2582149	0.882368	-2.8210786	0.0132797
July / September	RR	1.3582128	0.3356298	398146	0.7611040	2.423771	1.2389949	0.4301348
July / October	RR	0.8678430	0.1943073	398146	0.5135070	1.466682	-0.6330791	0.8018927
September / October	RR	0.6389596	0.1429847	398146	0.3781814	1.079560	-2.0016056	0.1117926
July / September	SS	3.1173633	0.9556645	398146	1.5196780	6.394745	3.7088363	0.0006099
July / October	SS	2.0220869	0.8854933	398146	0.7245523	5.643257	1.6079311	0.2422234
September / October	SS	0.6486529	0.2722739	398146	0.2425294	1.734844	-1.0312198	0.5571109

Effet de la mutation KDR sur Activité crépusculaire

L'analyse de l'activité crépusculaire ici a porté sur les comparaisons du début de l'activité crépusculaire et du pic crépusculaire maximum.

Début de l'activité crépusculaire en LD

L'heure du début de l'activité crépusculaire a été arbitrairement définie comme étant la première minute d'activité du moustique suivie de deux minutes d'activité consécutive sans interruption (avec au moins une activité de vol, c'est-à-dire une rupture du faisceau infrarouge par minute) entre 17:30:00 et 19:30:00 pour la condition LD et entre 16:30:00 et 18:30:00 pour la condition DD. Cette heure du démarrage de l'activité de vol correspondait à la valeur des heures moyennes des débuts d'activité de tous les jours d'enregistrement

Lorsque nous avons comparé le début de l'activité crépusculaire entre les trois génotypes en condition LD en fonction du mois, nous avons relevé une différence statistiquement significative entre le début de l'activité crépusculaire du génotype SS et les deux autres pour les mois de septembre et octobre (Figure 5). En effet, en septembre, l'activité des SS commençait en moyenne 2,80 min après celle des RR qui commençait à 18:04:50 ($p = 0,03$) et 2,91 min après celle des RS débutant à 18:04:43 ($p = 0,03$). En octobre, elle commençait respectivement 2,06 min ($p = 0.03$) et 2,35 min ($p = 0.01$) après de celle des RR commençant à 18:03:36 et des RS débutant à 18:03:19.

Début de l'activité crépusculaire en DD

Contrairement à la condition LD, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les débuts de l'activité crépusculaire des trois génotypes en condition DD (Figure 6).

Effet de la mutation KDR sur Heure du pic d'activité crépusculaire en régime LD et DD

Nous avons cherché ici à déterminer s'il y avait des différences spécifiques aux génotypes et selon le mois dans le moment de l'apparition du pic maximum de l'activité de vol crépusculaire. L'heure précise du pic maximum d'activité de vol de chaque moustique selon le génotype a été déterminée par la valeur moyenne des heures du pic maximum de tous les jours d'enregistrement.

Nos tests statistiques n'ont révélé aucune différence dans l'heure d'apparition du pic d'activité selon les génotypes aussi bien en condition LD (Figure 7) qu'en condition DD (Figure 8).

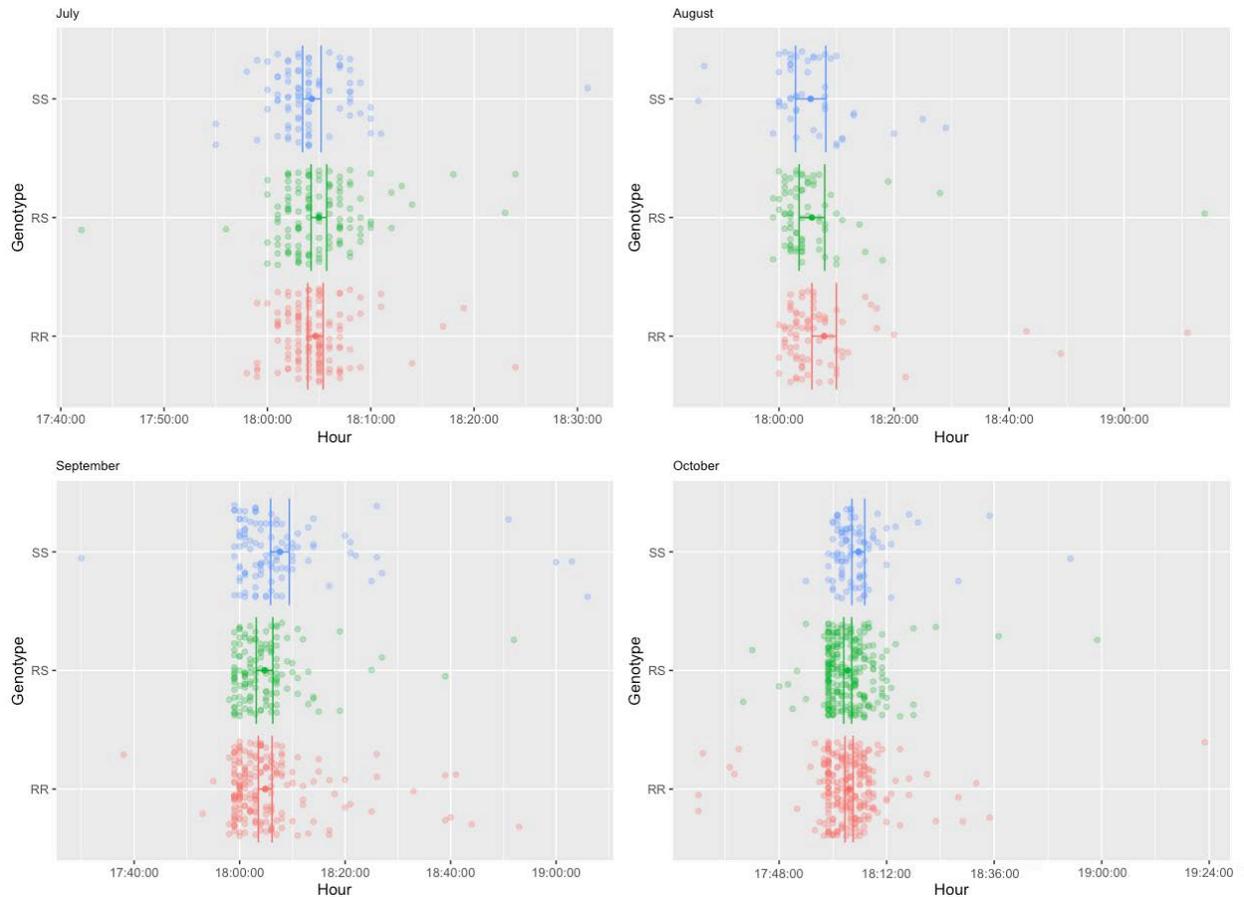


Figure 5: Heures du démarrage de l'activité de vol crépusculaire en régime LD 12 : 12 des trois génotypes. Le graphique montre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Le graphique montre une différence significative entre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire entre le génotype homozygote sensible SS et les deux autres génotypes RR et RS pour les mois de septembre (activité des SS commençant 2,80 min après celle des RR qui commençait à 18:04:50, $p = 0.03$ et 2,91 min après celle des RS débutant à 18:04:43, $p = 0.03$) et octobre (activité des SS commençant 2,06 min ($p = 0.03$) et 2,35 min ($p = 0.01$) respectivement après de celle des RR commençant à 18:03:36 et des RS débutant à 18:03:19).

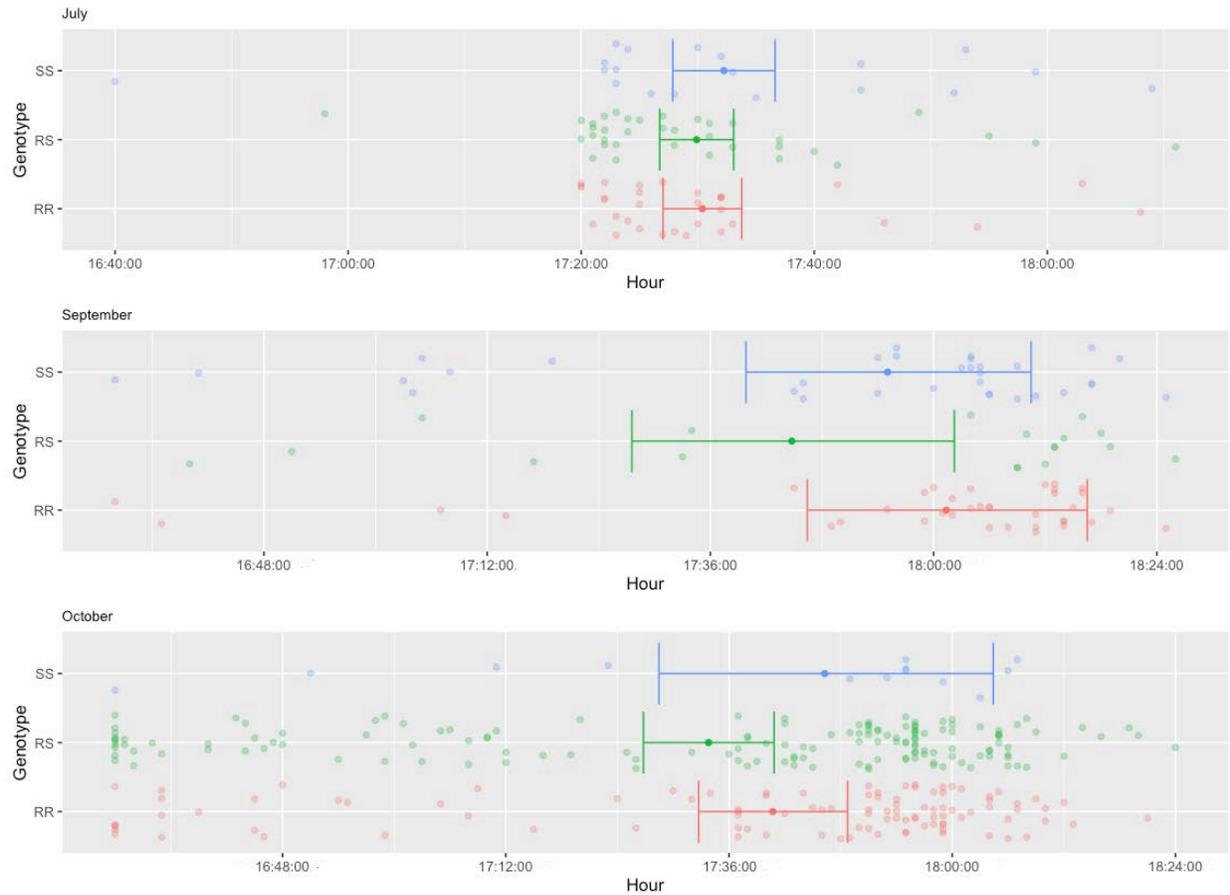


Figure 6: Heures du démarrage de l'activité de vol crépusculaire en régime DD des trois génotypes. Le graphique montre les heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative des heures du démarrage de l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative des heures du démarrage de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes.

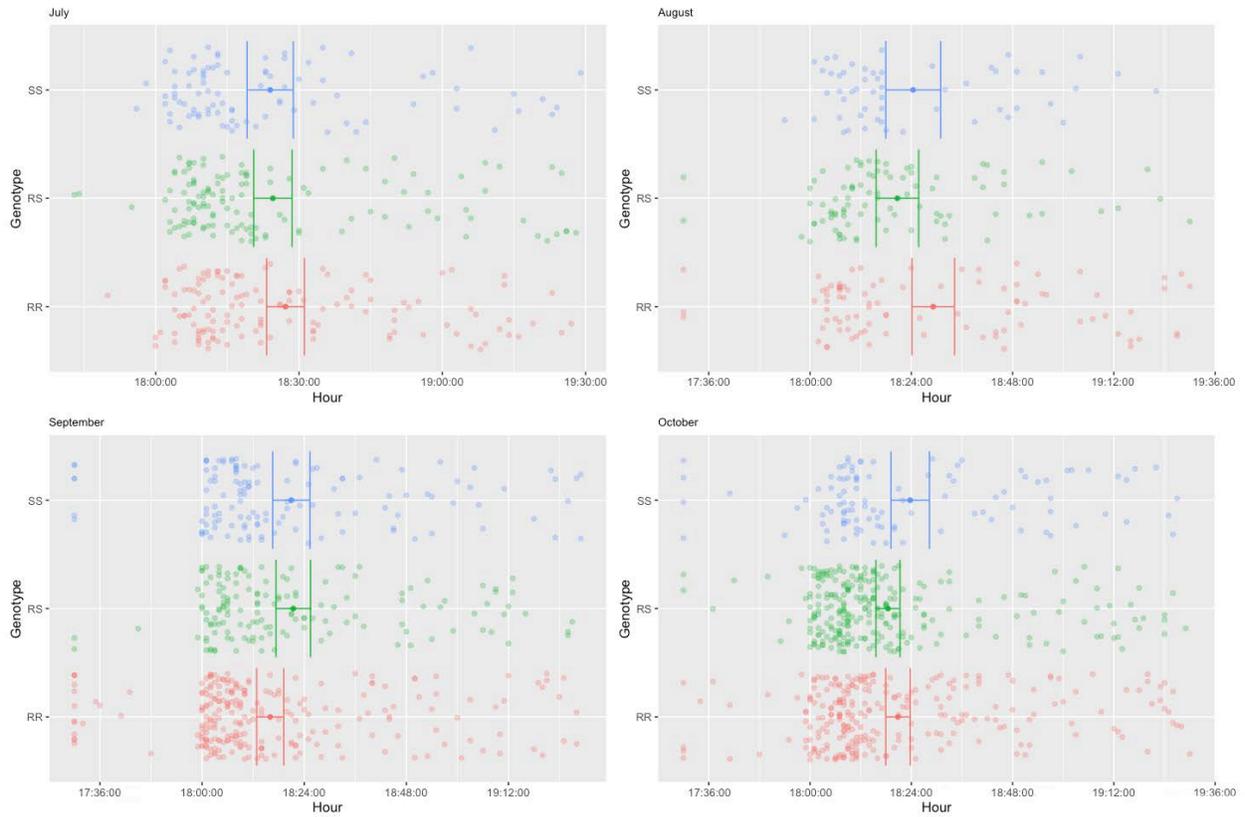


Figure 7: Heure du pic de l'activité de vol crépusculaire en régime LD 12 : 12 des trois génotypes selon le mois. Le graphique montre les heures du pic l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative de l'heure du pic de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes.

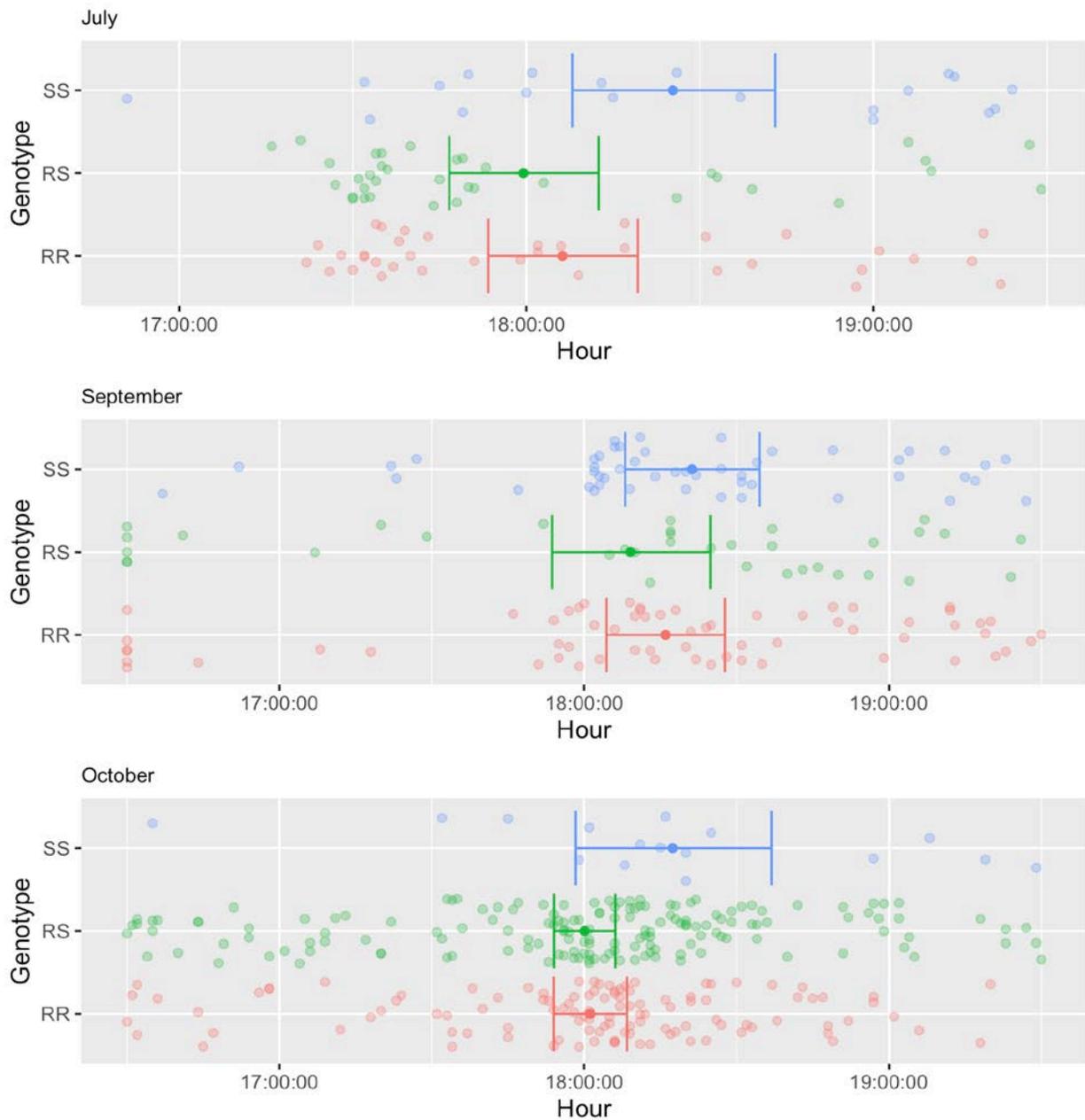


Figure 8: Heure du pic de l'activité de vol crépusculaire en régime DD des trois génotypes selon le mois. Le graphique montre les heures du pic l'activité crépusculaire au cours des mois. Aucune différence significative de l'heure du pic de l'activité crépusculaire n'a été mise en évidence entre les trois génotypes.

Discussion

Pour étudier l'effet de l'allèle de résistance aux insecticides L1014F du gène *VGSC* (*kdr*) sur le rythme d'activité d'*An. coluzzii*, nous avons mesuré l'activité de vol spontané de trois génotypes du gène de résistance *kdr* (RR, RS et SS) aussi bien en condition de régime LD qu'en régime d'obscurité constante. Nous avons recherché des différences temporelles potentielles au niveau de l'activité journalière totale, du début et du moment du pic de l'activité crépusculaire.

L'analyse de l'activité de vol spontané des trois génotypes en condition LD et DD a montré que les moustiques présentent des rythmes nocturnes quotidiens d'activité locomotrice, avec un pic d'activité intervenant en tout début de la scotophase comme cela a été décrit chez les membres du complexe *An. gambiae* (Jones et al. 1972 ; Jones et al. 1974 ; Rowland 1989 ; Rund et al. 2012 ; Sheppard et al. 2017) ainsi que chez d'autres espèces d'anophèles (Rowland 1989 ; Duffield et al. 2019). La persistance du profil d'activité de vol rythmique en condition de régime d'obscurité constante confirme que cette activité est sous le contrôle d'une horloge endogène circadienne (Jones et al. 1966).

Il est connu que le portage des allèles de résistance conférant la résistance aux insecticides (RDL, Ace 1^R, KDR) a un coût adaptatif sur les traits de vie des adultes dans la nature, même en l'absence d'insecticide (Rowland 1991 ; Kliot & Ghanim 2012 ; Diop et al. 2015). Aucune différence entre les activités journalières totales n'a été trouvée entre les trois génotypes tout au long des mois. Par conséquent, chez *An. coluzzii*, en absence d'insecticide, la mutation *kdr* n'a pas été associée à un changement significatif d'activité nocturne comme décrit par Rowland (1991) avec les anophèles résistants à la dieldrine ou par Porciani et al. (2017) dans des tests comportementaux chez les moustiques hétérozygotes pour la résistance *kdr*. Cependant, la présentation d'une activité totale significativement plus faible du génotype homozygote résistant (RR) par rapport aux deux autres génotypes (RS et SS) au mois de juillet en condition DD, c'est-à-dire en dehors de tout stimulus extérieur, suggère un coût d'adaptation en début de saison pluvieuse (mois juillet).

Nous n'avons pas trouvé de différence du niveau de l'activité totale en free-running (condition d'obscurité constante DD) entre les mois chez les homozygotes résistants RR, contrairement aux deux autres génotypes (RS et SS). Cependant, en condition LD, il y avait une différence dans l'activité totale entre tous les mois chez les résistants RR, à l'exception d'août et septembre qui

présentaient les plus faibles niveaux d'activité totale. Cette différence d'activité totale en condition LD suggère une influence plus marquée des facteurs extérieurs sur le rythme journalier des homozygotes résistants par rapport aux RS et SS. Il est connu que les insectes sont capables d'adapter leurs rythmes biologiques à leur environnement en synchronisant leurs horloges circadiennes avec les variations « nuit-jour » quotidiennes et la température (Pittendrigh & Minis 1964 ; Saunders et al. 1994 ; Hardin 2011 ; Edgar et al. 2012).

L'activité crépusculaire englobe un grand nombre de comportements connus chez les anophèles comme la migration, l'essaimage, la ponte et alimentation en sucre (Haddow & Ssenkubuge 1962 ; Clements 1963 ; Jones & Gubbins 1977, 1978 ; Charlwood & Jones 1979 ; Gary & Foster 2006). Chez les femelles ténérales, cette activité crépusculaire est généralement impliquée dans la recherche d'un essaim pour l'accouplement et aussi pour alimentation en sucre (Haddow & Ssenkubuge 1962 ; Jones & Gubbins 1978 ; Gary & Foster 2006). La preuve de la différence du timing de l'accouplement a été démontrée par Sawadogo et al. (2013a) et Rund et al. (2012) comme pouvant confirmer l'implication de l'isolement reproductif suspectée comme une des barrières précopulatoires conduisant à la spéciation entre les membres du complexe *An. gambiae* (Tripet et al. 2005 ; Diabaté et al. 2007 ; Manoukis et al. 2009). Nos résultats ont montré que l'activité crépusculaire des génotypes RR et RS débutait plus de 2 min avant celle du génotype SS pendant les mois de septembre et d'octobre en régime LD alors qu'aucune différence n'a été observée entre les débuts de l'activité crépusculaire durant tous les mois en free-running. Ce résultat laisse penser que les génotypes SS seraient plus plastiques quant au début de l'activité crépusculaire donc moins sensibles aux facteurs exogènes et environnementaux mensuels. Cette faible sensibilité pourrait ainsi être due aux effets maternels hérités de parents plus robustes.

Cette différence de timing du début de l'activité crépusculaire mérite d'être vérifié en condition naturelle pour voir si elle est retrouvée d'une part et d'autre part si elle est importante entre terme de durée. Si elle se confirme, elle pourrait être impliquée dans un processus pouvant conduire à un isolement reproductif entre le génotype sensible SS et les résistants (RR et RS). Cet isolement reproductif pourrait ainsi être compté parmi les mécanismes de freinage ou d'expansion de la résistance au sein d'une espèce et dans un endroit donné comme cela se voit un peu partout en Afrique avec des populations exclusivement résistantes ou sensibles selon les zones, malgré l'utilisation des insecticides en santé publique ou en agriculture (Moiroux et al. 2012).

Pris ensemble, les résultats de cette étude soutiennent l'idée que le gène *kdr* à lui seul n'a pas d'effet sur le rythme d'activité journalière chez *Anopheles coluzzii* en absence d'insecticide. Toutefois, en combinant l'effet du KDR aux stimuli environnementaux, des différences pourraient subsister entre les moustiques présentant des allèles différents au fil du temps. Les caractéristiques comportementales des moustiques portant des allèles de résistance (RR et RS) laissent supposer que le seuil de réponse de ces génotypes à divers stimuli environnementaux et internes a été diminué et transmis aux progénitures (effets maternels) contrairement aux moustiques portant l'allèle sensible SS. Les mutations de résistance ont pu rendre les canaux de sodium voltage-dépendant plus perméables aux ions sodium en augmentant ainsi les potentiels de repos du système nerveux, au point qu'un stimulus de plus petite intensité suffit à provoquer une réponse comportementale du fait du coût du portage de la mutation, à la différence des moustiques sensibles qui, exemptes du coût de la mutation, pourraient montrer une plasticité phénotypique.

Toutefois, ces résultats ont été obtenus dans les conditions de laboratoire avec une population venant du terrain. Il serait intéressant de les reprendre avec des individus venant juste d'émerger en conditions naturelles ou semi naturelles, mais aussi d'étendre ces expériences aux deux vecteurs du complexe *An. gambiae* que sont *An. gambiae* et *An. arabiensis* afin de voir si nos tendances se confirment.

Références

- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015; 526(7572):207–11.
- Charlwood JD, Graves PM. The effect of permethrin-impregnated bednets on a population of *Anopheles farauti* in coastal Papua New Guinea. *Med Vet Entomol*. 1987; 1(3):319–27.
- Charlwood J, JONES M. Mating behaviour in the mosquito, *Anopheles gambiae* s.l. I. Close range and contact behaviour. *Physiological Entomology*. 1979; 4:111–20.
- Christophers S. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure. London: The Syndics of the Cambridge University Press, Bentley House, 200, Euston Road, N.W.I. 1960.
- Clements AN. The Physiology of Mosquitoes. Kerkut GA, editor. Pergamon Press; 1963. (International series of monographs on pure and applied biology: Division, zoology).

- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73(5):483–97.
- Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(8):617–26.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, et al. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology.* 2009; 9(1):16.
- Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin J-B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J.* 2008; 7:189.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67(6):617–22.
- Diabaté A, Dabire RK, Millogo N, Lehmann T. Evaluating the Effect of Postmating Isolation Between Molecular Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* 2007; 44(1):60–4.
- Diop MM, Moiroux N, Chandre F, Martin-Herrou H, Milesi P, Boussari O, et al. Behavioral cost & overdominance in *Anopheles gambiae*. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0121755.
- Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black WC4. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? *Trends Parasitol.* 2009; 25(5):213–9.
- Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987; 19(1):11–5.
- Duffield GE, Aciri DJ, George GF, Sheppard AD, Beebe NW, Ritchie SA, et al. Diel flight activity of wild-caught *Anopheles farauti* (s.s.) and *An. hinesorum* malaria mosquitoes from northern Queensland, Australia. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1):48.
- Edgar RS, Green EW, Zhao Y, Ooijen G van, Olmedo M, Qin X, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature.* 2012; 485(7399):459–64.
- Gary REJ, Foster WA. Diel timing and frequency of sugar feeding in the mosquito *Anopheles gambiae*, depending on sex, gonotrophic state and resource availability. *Med Vet Entomol.* 2006; 20(3):308–16.
- Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). 2nd ed. Vol. 55. Publications of the South African Institute for Medical Research; 1987.

- Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Johannesburg: South African Institute for Medical Research. Second edition. 1968.
- Haddow AJ, Ssenkubuge Y. Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles. Ann Trop Med Parasitol. 1962; 56:352–5.
- Harbach RE, Knight KL. Taxonomists’s glossary of mosquito anatomy. Marlton, New Jersey: Plexus Publishing, Inc. 1980.
- Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in drosophila. Adv Genet. 2011; 74:141–73.
- Hartig F. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.3.3.0. 2020.
- Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. The Circadian Rhythm of Flight Activity of the Mosquito *Anopheles Gambiae*: The Light-Response Rhythm. Journal of Experimental Biology. 1972; 57(2):337–46.
- Jones MDR, Ford MG, Gillett JD. Light-on and light-off effects on the circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae*. Nature. 1966; 211(5051):871–2.
- Jones MDR, Gubbins SJ. Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* after insemination. Nature. 1977; 268(5622):731–2.
- Jones MDR, Gubbins SJ. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. Physiological Entomology. 1978; 3(3):213–20.
- Jones MDR, Gubbins SJ, Cubbin CM. Circadian flight activity in four sibling species of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). Bulletin of Entomological Research. 1974; 64(2):241–6.
- Kliot A, Ghanim M. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Manag Sci. 2012; 68(11):1431–7.
- Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Journal of Insect Physiology. 1992; 38(11):895–903.
- Lenth R, Buerkner P, Herve M, Love J, Riebl H, Singmann H. Package “emmeans”: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.5.2-1. 2020.
- Magnusson A, Skaug H, Nielsen A, Berg C, Kristensen K, Maechler M, Bolker B, Sadat N, Lüdecke D, Lenth R, O’Brien J, Brooks M. Package “glmmTMB”: Generalized Linear Mixed Models using Template Model Builder. R package version 1.0.2.1. 2020.
- Manoukis NC, Diabate A, Abdoulaye A, Diallo M, Dao A, Yaro AS, et al. Structure and dynamics of male swarms of *Anopheles gambiae*. Journal of medical entomology. 2009; 46(2):227–35.

- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998; 7(2):179–84.
- Mbogo CN, Baya NM, Ofulla AV, Githure JI, Snow RW. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med Vet Entomol*. 1996; 10(3):251–9.
- Moiroux N, Gomez MB, Penetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *J Infect Dis*. 2012; 206(10):1622–9.
- Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58(4):1762–7.
- Pittendrigh CS, Minis DH. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*. 1964; 98(902):261–94.
- Porciani A, Diop M, Moiroux N, Kadoke-Lambi T, Cohuet A, Chandre F, et al. Influence of pyrethroid-treated bed net on host seeking behavior of *Anopheles gambiae* s.s. Carrying the kdr allele. *PLoS One*. 2017; 12(7): e0164518.
- Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, et al. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*. 2011; 10:184.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V, Carnevale P. [The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985; 65 Suppl 2:201–14.
- Rowland M. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiological Entomology*. 1989; 14(1):77–84.
- Rowland M. Behaviour and fitness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Med Vet Entomol*. 1991; 5(2):193–206.
- Ruiz JL, Yerbanga RS, Lefèvre T, Ouedraogo JB, Corces VG, Gómez-Díaz E. Chromatin changes in *Anopheles gambiae* induced by *Plasmodium falciparum* infection. *Epigenetics & Chromatin*. 2019; 12(1):5.
- Rund SSC, Lee SJ, Bush BR, Duffield GE. Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2012; 58(12):1609–19.
- Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*. 2011; 10:80.

- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Torre A della. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008; 7:163.
- Saunders DS. *Insect clocks*. Pergamon Press, Oxford; 1982. (2nd ed.).
- Saunders DS, Gillanders SW, Lewis RD. Light-pulse phase response curves for the locomotor activity rhythm in Period mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology.* 1994; 40(11):957–68.
- Sawadogo SP, Costantini C, Pennetier C, Diabate A, Gibson G, Dabire RK. Differences in timing of mating swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formerly *An. gambiae* M and S molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors.* 2013a; 6:275.
- Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, et al. Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol.* 2013b; 50(2):285–93.
- Schellenberg JR, Abdulla S, Nathan R, Mukasa O, Marchant TJ, Kikumbih N, et al. Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. *Lancet.* 2001; 357(9264):1241–7.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671–5.
- Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, et al. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2019; 116(30):15086–95.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* 2009; 9:17.
- Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(6):591–6.
- Thomsen EK, Koimbu G, Pulford J, Jamea-Maiasa S, Ura Y, Keven JB, et al. Mosquito Behavior Change After Distribution of Bednets Results in Decreased Protection Against Malaria Exposure. *J Infect Dis.* 2017; 215(5):790–7.
- Tripet F, Thiemann T, Lanzaro GC. Effect of Seminal Fluids in Mating Between M and S Forms of *Anopheles gambiae*. *Journal of Medical Entomology.* 2005; 42(4):596–603.

DISCUSSION GENERALE

Les populations de principaux vecteurs du *Plasmodium* responsable du paludisme humain en Afrique sont connues pour leur adaptation continue à de nouvelles niches écologiques créées par l'action humaine avec pour conséquence dramatique l'émergence et la réémergence d'une transmission durable du paludisme dans des espaces et des temps nouveaux (Coluzzi et al. 1979 ; Costantini et al. 2009 ; Simard et al. 2009). Ainsi, des processus d'adaptation sont en cours face à l'utilisation généralisée d'insecticides, conduisant à l'apparition de nouveaux comportements de piqûres chez les anophèles (Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011 ; Moiroux et al. 2012 ; Thomsen et al. 2017 ; Sherrard-Smith et al. 2019). Si de nombreux travaux ont porté sur l'effet des outils de lutte antivectorielle à base d'insecticide dans la réduction de la densité des anophèles vecteurs et la susceptibilité de ces derniers aux insecticides utilisés en santé publique, moins d'attention cependant a été accordée aux modifications comportementales déclenchées par la pression d'insecticide, ou en réponse à une telle pression. En particulier, de quelle manière cette pression influe-t-elle sur le comportement périodique de recherche d'hôte des moustiques et sur les bases sous-jacentes de ces changements comportementaux ? Il est connu que l'adaptation et le succès des insectes dans la colonisation des environnements les plus divers sont associés à l'organisation temporelle de leur vie. Ainsi, une sélection de ces nouveaux comportements de piqûre des anophèles afin d'avoir accès à leur hôte pourrait limiter l'efficacité des outils de lutte antivectorielle actuels. Notre travail s'est donc focalisé sur la détermination des bases génétiques, physiologiques et environnementales des rythmes journaliers d'activité des anophèles vecteurs des parasites du paludisme.

Par une approche expérimentale, nous avons étudié le rythme de l'activité journalière d'*Anopheles coluzzii* afin de déceler des différences temporelles pouvant nous éclairer sur les bases sous-jacentes de ces changements de comportement de piqûres des anophèles observés en Afrique après le déploiement des MILD (Charlwood & Graves 1987 ; Mbogo et al. 1996 ; Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011 ; Corbel et al. 2012 ; Moiroux et al. 2012 ; Thomsen et al. 2017 ; Sherrard-Smith et al. 2019). Ainsi, nous avons cherché à évaluer d'une part, les effets de l'insémination et de l'alimentation (chapitre 3) et de d'autre part, les effets de la mutation kdr (chapitre 4), sur le rythme

d'activité locomotrice d'*Anopheles coluzzii*. Nous avons discuté dans chacun de ces chapitres les résultats expérimentaux obtenus.

Dans cette discussion générale, les effets de ces déterminants sur les rythmes d'activité locomotrice seront discutés dans le cadre général des changements du comportement de piqûre des anophèles à travers la compréhension des déterminants qui peuvent être impliqués.

Changement de comportement en relation avec les insecticides

Les auteurs ont démontré à travers l'évaluation des MILD que les changements de comportement des anophèles avaient un lien avec les insecticides (Charlwood & Graves 1987b ; Pates and Curtis 2005 ; Corbel et al. 2012). En effet, si les mécanismes de résistance physiologique comme la modification de la cible de l'insecticide (Ranson et al. 2000, 2000 ; Djogbénou et al. 2010), la résistance métabolique (Vulule et al. 1999 ; Wondji et al. 2012) et la résistance cuticulaire (Wood et al. 2010 ; Yahouédo et al. 2017) sont utilisés par les moustiques dits « résistants » pour continuer d'avoir accès à leur hôte (Hemingway 2000), les moustiques femelles « sensibles » utilisent généralement la résistance comportementale (Fornadel et al. 2010 ; Moiroux et al. 2012) afin d'éviter le contact avec les insecticides. Cette résistance comportementale se traduit généralement par un changement d'hôte de piqûre (zoophagie) ou des piqûres vers l'extérieur (exophagie) beaucoup plus marquées ou encore par un décalage des heures de piqûre coïncidant avec les périodes où les populations ne sont pas protégées par les outils de lutte antivectorielle (Moiroux et al. 2012). L'originalité de nos travaux sur l'effet de la mutation kdr chez les femelles, repose dans le fait de mieux comprendre les rythmes journaliers d'activité chez les populations sauvages.

Les études précédemment publiées avaient montré que la mutation kdr semblait modifier particulièrement certaines activités comportementales des moustiques en l'absence des insecticides comme une activité spontanée plus importante des hétérozygotes par rapport aux homozygotes sensibles et résistants (Porciani et al. 2017) ou une activité locomotrice journalière moins importante du génotype résistant par rapport aux génotypes RS et SS (Rowland 1991). Cependant, mes travaux ont permis de mettre en évidence que la mutation kdr, prise seule, n'a pas d'effet sur le rythme d'activité journalière chez *Anopheles coluzzii*. Les différences entre nos résultats et ses études précédentes seraient dues au fait que nous avons utilisé des populations de test plus proches des populations naturelles à la différence de Porciani et al. (2017) chez qui de multiples

introgressions ont été utilisées ou de Rowland (1991) qui travaillait sur un complexe d'espèces qu'était *An. gambiae s.l.* La mutation kdr peut donc être écartée comme une des composantes physiologiques pouvant induire l'apparition de nouvelles plages horaires de piqûre observées après la distribution massive de MILD chez *An. coluzzii* (Reddy et al. 2011 ; Russell et al. 2011 ; Corbel et al. 2012 ; Moiroux et al. 2012 ; Thomsen et al. 2017). Cela sous-entend que les recherches doivent s'orienter vers des moustiques ne portant pas cette mutation kdr L1014F et ou vers d'autres mécanismes de résistance comme les mutations qui sont présents dans de nombreux pays africains (Djogbénou et al. 2008, 2010) à cause de l'utilisation des carbamates dans la lutte contre les insectes ou même la mutation kdr L1014S (kdr "est") qui est de plus en plus présente en Afrique de l'ouest (Badolo et al. 2012 ; Mouhamadou et al. 2019).

Par ailleurs, nous avons montré à travers nos travaux des différences significatives dans le début de l'activité entre le génotype sensible et les deux autres génotypes portant un allèle de résistance (RR et RS). Le fait que les génotypes sensibles commençaient leur activité tardivement par rapport aux deux autres, peut aussi les amener à terminer leur activité beaucoup plus tard. Un début de réponse peut être apporté à cette hypothèse par la détermination du statut des résistances des population anophèles collectées sur le terrain à ces heures décalées dans les zones où la présence de la mutation kdr L1014F a été rapportée ou non, mais aussi en déterminant s'il existe des différences entre les heures de fin de l'activité nocturne chez les anophèles vecteurs. Ce résultat nous permet aussi de faire l'hypothèse selon laquelle le freinage ou l'expansion de la résistance au sein d'une espèce et dans un endroit donné comme cela s'observe un peu partout en Afrique avec des populations exclusivement résistantes ou sensibles selon les zones, malgré l'utilisation des insecticides en santé publique ou en agriculture serait dû à un mécanisme d'isolement reproductif découlant lui-même d'une différence significative dans le début de l'activité entre le génotypes sensibles et résistants.

A l'instar des différences observées dans le début de l'activité uniquement en condition LD et non en condition de « libre cours », des différences du niveau de l'activité journalière pour le mois de juillet entre le génotype résistant RR et les deux autres génotypes (RS et SS) uniquement en régime LD montrent que ces différences d'activité ne sont pas contrôlées par l'horloge circadienne mais plutôt par les facteurs environnementaux. Cependant, la possibilité du contrôle par l'horloge circadienne des rythmes non-circadiens a été avancée par Bur et al. (2009).

Changement de comportement en relation avec l'état physiologique des moustiques

La lumière et la température sont les *Zeitgebers* les plus forts, mais la disponibilité de la nourriture est également capable de synchroniser les rythmes circadiens, dans la mesure où ces cycles sont répétitifs et ont une valeur adaptative pour un individu, une population ou une espèce (Aschoff 1989, Dunlap et Loros 2004).

Les changements de comportement de piqûre peuvent aussi être indépendant de tout support génétique en étant uniquement lié à une combinaison entre la barrière physique que constitue les MILD et le statut physiologique ou nutritionnel des femelles. Ainsi Charlwood & Graves (1987) ont suggéré que le changement de piqûre marqué vers des heures précoces chez *An. farauti* en Papouasie-Nouvelle-Guinée avec l'introduction des MILD, serait uniquement dû à l'incapacité des femelles ayant pondu pendant la nuit à obtenir un repas sanguin avant l'aube. De ce fait, ces femelles restées affamées, tenteraient de trouver un repas dès le crépuscule.

L'impact de la prise du premier repas de sang sur le développement complet des ovaires (modification de la physiologie permettant la fécondité) ou dans l'accumulation davantage de réserves chez *An. gambiae s.l* a été démontré par Briegel (1990). Mes résultats ont montré que la prise du repas de sang modifiait le profil et l'intensité de l'activité locomotrice des anophèles. Presque faible jusqu'à 48h après la prise de repas de sang, l'activité regagnait en intensité. La baisse de l'activité après la prise de repas de sang peut être expliquée par des travaux antérieurs qui montraient qu'au cours du repas de sang, les femelles peuvent prendre un volume en sang correspondant à leur poids (Carnevale et al. 2009). Ainsi la distension abdominale due à l'alimentation sanguine ou au développement des ovaires inhibe l'activité de recherche d'hôte (Gary & Foster 2006). L'inactivité des femelles gorgées peut aussi s'expliquer par la dynamique de la digestion de la ressource. Le glucose serait plus facile à métaboliser que le sang.

Les études précédemment publiées (Jones and Gubbins 1977, 1978 ; Rowland 1989), ainsi que nos propres résultats montrent que l'insémination et la prise de repas sanguin entraînaient une baisse de l'activité locomotrice des anophèles femelles. Il serait donc intéressant dans les études de terrain sur les cycles d'agressivité des anophèles, de déterminer les statuts d'insémination des anophèles

piquant à des heures précoces ou tardive afin de valider l'insémination comme une composante des déterminants impliqués dans les changements de comportement de piquê.

Nos travaux ont montré une différence entre les périodes circadiennes (τ) de femelles vierges ayant pris le sang et les deux autres de femelles (vierges nourries au glucose et inséminées nourries au sang) en condition DD. Cependant, cette différence était absente en condition LD. On sait depuis longtemps que les rythmes de vol des moustiques sont contrôlés par l'horloge circadienne (Jones & Gubbins 1978) du fait de leur persistance et de leur auto-maintenance en absence de *Zeitgeber* (condition d'obscurité constante) avec une période spontanée proche, mais différente de 24h. Il clairement apparaît donc que ces différences de périodes entre ces groupes de femelles est due à une réponse différentielle aux conditions de l'environnement (lumière-obscurité, température, etc.), et non à une différence dans l'horloge circadienne. Cette étude est la première à démontrer que l'insémination et le repas de sang affectait l'horloge circadienne chez anophèles. Ces résultats montrent l'adaptation ou la sensibilité des anophèles au facteurs environnementaux.

Cette étude est également la première la première à mettre en évidence que l'insémination induit un retard du démarrage de l'activité crépusculaire chez les moustiques à travers une différence statistiquement significative observée entre les femelles vierges et les femelles inséminées, toutes deux nourries par une solution glucosée. Cette observation a été confirmée par l'absence de différence entre les débuts de l'activité crépusculaire chez les femelles vierges nourries ou au glucose. Ce résultat montre une structuration de l'espace temporelle en fonction du statut de l'insémination. On peut alors émettre l'hypothèse que si les femelles vierges utilisent cette période pour l'essaimage, les femelles inséminées pourraient par contre l'utiliser pour une recherche précoce d'hôte.

Nous avons au cours de nos travaux observé une grande sensibilité des rythmes d'activité ou des périodes d'*An. coluzzii* en LD aux conditions de l'environnement en fonction du statut d'insémination. Cette sensibilité des rythmes activité mérite d'être explorée davantage car les réponses rythmiques directes à des stimuli environnementaux peuvent avoir une valeur adaptative importante. Par exemple, les punaises *Triatominae* ont un rythme circadien de réponse aux signaux émis par l'hôte qui fait qu'ils vont à son contact uniquement en début de nuit lorsqu'il est au repos, même si l'hôte et le CO₂ sont présents tout le temps. Cependant, ces triatomes présente également un rythme exogène (gouverné par les conditions de lumière) de réponse à leur phéromone

d'agrégation qui les conduit aux abris. Le fait que ce deuxième rythme soit exogène est pertinent car ces insectes vivent à l'intérieur de la maison. Si une lumière s'allume au milieu de la nuit, leur sensibilité à la phéromone induisant un comportement de refuge va les conduire à se cacher (Bodin et al. 2008). En outre, chez ces mêmes insectes, la sensibilité des yeux composés est aussi contrôlée par un rythme circadien qui les permet d'anticiper la diminution de la luminosité à la différence des ocelles dont la sensibilité à la lumière est totalement dépendante des conditions d'éclairage engendrant un rythme qui suit l'environnement. Ainsi, si une lumière s'allume à un moment inattendu, les ocelles vont permettre à l'insecte de trouver un endroit sombre pour se cacher (Lazzari et al. 2011)

Nous avons travaillé durant toutes nos expériences de mesures du rythme d'activité dans des conditions environnementales (température, humidité et luminosité) constantes. Cependant, nous avons utilisé une intensité lumineuse (530 lumens) beaucoup plus élevée que ce qui est rapporté dans la plupart des études similaires sur les anophèles, même si nos tubes étaient revêtus de ruban adhésif filtrant grandement la luminosité pouvait être avancé comme une situation atténuante. Malgré cette différence, nos profils ainsi que les niveaux d'activités étaient très proches de ceux retrouvés dans la littérature. Le fait d'obtenir des résultats similaires avec des luminosités très différentes suscite de nombreuses interrogations quant au dosage des intensités lumineuses lors des études de laboratoire. Les intensités lumineuses à l'ombre, dans les conditions naturelles semblent beaucoup plus élevées que celle utilisés dans les expérimentations de laboratoires. De plus Jones et al. (1972a) n'avaient relevé aucune différence significative dans le démarrage de l'activité en testant deux régimes (50 lux et 200 lux) et chez les mâles et les femelles d'*An. gambiae s.l.*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

De nombreux pathogènes de maladies virales ou parasitaires comme le paludisme sont transmis par les insectes hématophages. Cette transmission étant étroitement liée au comportement de piqûre des insectes vecteurs, une meilleure compréhension de l'activité locomotrice journalière et de sa modulation par les stimuli exogènes (l'alimentation, cycle LD, environnement) ou endogènes (génétiques, physiologiques) peut apporter des éléments importants à l'étude de la dynamique de la piqûre voire plus loin de la transmission de ces agents pathogènes. Chez les anophèles, ces informations sur le comportement peuvent aider à comprendre ou expliquer le mécanisme des changements dans le comportement de piqûre et contribuer au développement de nouveaux outils ou de nouvelles stratégies pour une lutte plus efficace contre les vecteurs de *Plasmodiums* humains surtout dans les régions où des changements de comportement en matière de piqûre ont été rapportés après la mise en place de la distribution massive de moustiquaires imprégnées. Nos résultats ont permis de montrer qu'en absence de moustiquaire imprégné, le portage de la mutation kdr L1014F n'avait pas d'effet sur le rythme journalier d'activité d'*An. coluzzii* à la différence de l'état nutritionnel (repas de sang *versus* repas de sucre) et du statut d'insémination. Le régime alimentaire à base de sang modifiait le rythme journalier d'activité avec une diminution du niveau de l'activité totale journalière jusqu'à trois jours après la prise de repas de sang. De plus, les femelles inséminées présentaient un niveau d'activité plus faible que celui des femelles vierges et un retard dans le début de l'activité crépusculaire. Enfin, aucune différence n'a été trouvée entre les pics d'activité maximale aussi bien avec la mutation kdr qu'avec les statuts physiologiques des anophèles. Ainsi, la question des déterminants génétiques, physiologiques et environnementaux impliqués dans la l'apparition de nouvelles plages de piqûre demeure plus que d'actualité malgré nos résultats réduisant la liste des déterminants comme la mutation kdr L1014F, l'insémination et l'alimentation. De nouvelles recherches employant d'autres déterminants ayant été reconnus comme pouvant impacter les traits de vie des anophèles vecteurs aussi bien en conditions contrôlées que naturelles sont indispensables.

Perspectives

A la lumière de nos travaux et de la discussion de nos résultats, un certain nombre de questions reste en suspens. Ces questions, méritent d'être approfondies en poursuivant les études sur les rythmes d'activité des anophèles vecteurs dans différentes axes pouvant enrichir les connaissances dans la chronobiologie des insectes hématophages vecteurs de pathogènes, de même que dans leur bioécologie afin d'améliorer ou de développer de nouveaux outils de lutte antivectorielle.

Notre approche expérimentale sur des effets des déterminants génétiques et physiologiques sur les rythmes journaliers d'activité locomotrice d'*An. coluzzii*, fournit des résultats préliminaires qui doivent non seulement être vérifiés chez d'autres anophèles vecteurs de *Plasmodium* humains mais aussi dans les conditions naturelles.

Cette approche doit être étendue à d'autres types de mutations telle que la mutation présente dans les zones d'endémie palustre et reconnue comme conférant une résistance aux insecticides ; de même qu'aux autres mécanismes de résistance physiologique comme les résistances métaboliques et cuticulaires qui sont tous gouverner par des gènes. En effet, chez les insectes, l'épaississement continu de la cuticule au cours de leur vie est un processus régulé par des gènes. Il a été démontré que la cuticule se dépose selon un schéma circadien montrant un dimorphisme journalier avec des anneaux de croissance de structure lamellaire nocturne et non lamellaire diurne (Neville 1965 ; Tyndale-Biscoe 1984). Les effets de la rigidité de la cuticule sur le rythme journalier d'activité peuvent être intéressant à étudier chez les anophèles.

Les auteurs restent divisés sur la question de la modification du comportement de piqûre des anophèles par la manipulation du *Plasmodium* (Koella et al. 1998, 2002 ; Cator et al. 2013 ; Vantaux et al. 2015 ; Nguyen et al. 2017). Une étude sur la modification des rythmes journaliers d'activité locomotrice des anophèles par des *Plasmodium* humains pourrait éclairer sur la manipulation parasitaire.

Les odeurs corporelles humaines jouent un rôle important dans le comportement de recherche des hôtes par les anophèles anthropophiles (Takken and Knols 1999). L'effet d'odeur de l'hôte sur le rythme journalier des anophèles femelles affamées serait intéressant à évaluer afin de mieux comprendre le comportement de recherche d'hôte des anophèles affamés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Appawu MA, Dadzie SK, Baffoe-Wilmot A, Wilson MD. Lymphatic filariasis in Ghana: entomological investigation of transmission dynamics and intensity in communities served by irrigation systems in the Upper East Region of Ghana. *Trop Med Int Health*. 2001; 6(7):511–6.
- Araujo M da S, Guo F, Rosbash M. Video Recording Can Conveniently Assay Mosquito Locomotor Activity. *Scientific reports*. 2020 Mar;10(1):4994–4.
- Aschoff J. Temporal orientation: Circadian clocks in animals and humans. *Animal Behaviour*. 1989; 37(6):881–96.
- Badolo A, Traore A, Jones CM, Sanou A, Flood L, Guelbeogo WM, et al. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malar J*. 2012; 11:232.
- Barron MG, Paupy C, Rahola N, Akone-Ella O, Ngangue MF, Wilson-Bahun TA, et al. A new species in the major malaria vector complex sheds light on reticulated species evolution. *Sci Rep*. 2019; 9(1):14753.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015; 526(7572):207–11.
- Binka FN, Hodgson A, Adjuik M, Smith T. Mortality in a seven-and-a-half-year follow-up of a trial of insecticide-treated mosquito nets in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96(6):597–9.
- Boakye DA, Wilson MD, Appawu MA, Gyapong J. Vector competence, for *Wuchereria bancrofti*, of the *Anopheles* populations in the Bongo district of Ghana. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004; 98(5):501–8.
- Bodin A, Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR. Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 2008; 54(9):1343–8.
- Brault AC, Foy BD, Myles KM, Kelly CLH, Higgs S, Weaver SC, et al. Infection patterns of o'nyong nyong virus in the malaria-transmitting mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 2004; 13(6):625–35.
- Bregues J. La filariose de Bancroft en Afrique de l'Ouest. Mémoires ORSTOM N79, 229 p. ORSTOM, Paris ; 1975.
- Briegel H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J Med Entomol*. 1990; 27(5):839–50.

- Briet OJT, Chitnis N. Effects of changing mosquito host searching behaviour on the cost effectiveness of a mass distribution of long-lasting, insecticidal nets: a modelling study. *Malar J.* 2013; 12:215.
- Bur IM, Cohen-Solal AM, Carmignac D, Abecassis P-Y, Chauvet N, Martin AO, et al. The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. *J Biol Chem.* 2009; 284(14):9066–73.
- Carnevale P, Robert V. Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. IRD; 2009. (Didactiques).
- Cator LJ, George J, Blanford S, Murdock CC, Baker TC, Read AF, et al. 'Manipulation' without the parasite: altered feeding behaviour of mosquitoes is not dependent on infection with malaria parasites. *Proc Biol Sci.* 2013; 280(1763):20130711.
- Charlwood JD, Graves PM. The effect of permethrin-impregnated bednets on a population of *Anopheles farauti* in coastal Papua New Guinea. *Med Vet Entomol.* 1987; 1(3):319–27.
- Christophers S. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure. London: The Syndics of the Cambridge University Press, Bentley House, 200, Euston Road, N.W.I. 1960.
- Clements AN. The biology of mosquitoes. Vol. 2. Wallingford: CABI Publishing; 1999.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa.* 2013; 3619:246–74.
- Coluzzi M. The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia.* 1999; 41(1-3):277–83.
- Coluzzi M, Sabatini A. Cytogenetic observations on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia.* 1967; 9:73–88.
- Coluzzi M, Sabatini A. Cytogenetic observations on species C, merus and melas of the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia.* 1968; 10:155–65.
- Coluzzi M, Sabatini A. Cytogenetic observations on the salt water species, *Anopheles merus* and *Anopheles melas*, of the *gambiae* complex. *Parassitologia.* 1969; 11(3):177–86.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73(5):483–97.
- Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(8):617–26.

- Corbet PS, Williams MC, Gillett JD. O’Nyong-Nyong fever: an epidemic virus disease in East Africa. IV. Vector studies at epidemic sites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1961; 55:463–80.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, et al. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology.* 2009; 9(1):16.
- Coz J. Contribution à la biologie du complexe *Anopheles gambiae* Giles en Afrique occidentale. *Cahiers ORSTOM Série Entomologie Médicale et Parasitologie.* 1973a ; 11 : 33–40.
- Coz J. Contribution à l’étude du complexe *A. gambiae* : répartition géographique et saisonnière en Afrique de l’Ouest. *Cahiers ORSTOM Série Entomologie Médicale et Parasitologie.* 1973b ; 11:3–31.
- Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. Evaluation de l’efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. Document miméographié OMS, WHO/VBC/84899 /WHO/MAL/841008. 1984; 20 p.
- Davidson G. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles: a case of simple mendelian inheritance. *Nature.* 1956; 178(4538):863–4.
- Davidson G. *Anopheles gambiae* Complex. *Nature.* 1962; 196(4857):907–7.
- Davidson G. *Anopheles gambiae*, a complex of species. *Bulletin of the World Health Organization.* 1964; 31(5):625–34.
- Davidson G. Genetical control of *Anopheles gambiae*. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie.* 1969a; 7(2):151–4.
- Davidson G. The potential use of sterile hybrid males for the eradication of member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Bull World Health Organ.* 1969b; 40(2):221–8.
- Davidson G, Hunt RH. The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia.* 1973; 15:121–8.
- Davidson G, Jackson CE. Incipient speciation in *Anopheles gambiae* Giles. *Bull World Health Organ.* 1962; 27:303–5.
- Davidson G, Odetoyinbo JA, Colussa B, Coz J. Field attempt to assess the mating competitiveness of sterile males produced by crossing 2 member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Bulletin of the World Health Organization.* 1970;42(1):55–67.
- Derua YA, Alifrangis M, Hosea KM, Meyrowitsch DW, Magesa SM, Pedersen EM, et al. Change in composition of the *Anopheles gambiae* complex and its possible implications for the transmission of malaria and lymphatic filariasis in north-eastern Tanzania. *Malar J.* 2012; 11:188.
- Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67(6):617–22.

- Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, et al. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol.* 2005; 42(4):548–53.
- Djogbénu L, Chandre F, Berthomieu A, Dabiré R, Koffi A, Alout H, et al. Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2172.
- Djogbénu L, Noel V, Agnew P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J.* 2010; 9:12.
- Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987; 19(1):11–5.
- Duvallet G, Fontenille D, Robert V, editors. *Entomologie médicale et vétérinaire.* IRD Editions ; 2017.
- Favia G, Torre A della, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon N, Toure YT, et al. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol.* 1997; 6(4):377–83.
- Fornadel CM, Norris LC, Glass GE, Norris DE. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(4):848–53.
- Fournet F, Cussac M, Ouari A, Meyer P-E, Toe HK, Gouagna L-C, et al. Diversity in anopheline larval habitats and adult composition during the dry and wet seasons in Ouagadougou (Burkina Faso). *Malar J.* 2010; 9:78.
- Gary REJ, Foster WA. Diel timing and frequency of sugar feeding in the mosquito *Anopheles gambiae*, depending on sex, gonotrophic state and resource availability. *Med Vet Entomol.* 2006; 20: 308–16.
- Gentile C, Meireles-Filho ACA, Britto C, Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 2006; 36(11):878–84.
- Gillett JD, Corbet PS, Haddow AJ. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus). VI. *Ann Trop Med Parasitol.* 1961; 55:427–31.
- Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). 2nd ed. Vol. 55. Publications of the South African Institute for Medical Research; 1987.
- Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Johannesburg: South African Institute for Medical Research. Second edition. 1968.

- Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabiré RK, Simard F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Medical and veterinary entomology*. 2012; 26(1):9–17.
- Grassi B, Bignami A, Bastianelli G. Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone. Roma: Atti della Reale Accademia dei Lincei; 1899. (5th ser.; vol. 8).
- Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 1999; 44:51–75.
- Haddow AJ, Ssenkubuge Y. Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles. *Ann Trop Med Parasitol*. 1962; 56:352–5.
- Hamon J. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta) : cycles d'agressivité et variations saisonnières. *Annales de la Société Entomologique de France*. 1963 ; 132 :85–144.
- Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res*. 2004; 94(6):537–53.
- Hartig F. Package “DHARMA”: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.3.3.0. 2020.
- Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:371–91.
- Holstein MH. *Biologie d'Anopheles gambiae : recherches en Afrique-Occidentale Française*. World Health Organization; 1952. (Monographies N9 - OMS).
- Jones MDR. The automatic recording of mosquito activity. *Journal of Insect Physiology*. 1964; 10(2):343–51.
- Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. Light-on Effects and the Question of Bimodality in the Circadian Flight Activity of the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*. 1972a; 57(2):347–57.
- Jones MDR, Cubbin CM, Marsh D. The Circadian Rhythm of Flight Activity of the Mosquito *Anopheles Gambiae*: The Light-Response Rhythm. *Journal of Experimental Biology*. 1972b; 57(2):337–46.
- Jones MDR, Gubbins SJ. Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* after insemination. *Nature*. 1977; 268(5622):731–2.
- Jones MDR, Gubbins SJ. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiological Entomology*. 1978; 3(3):213–20.
- Jones MDR, Gubbins SJ, Cubbin CM. Circadian flight activity in four sibling species of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*. 1974; 64(2):241–6.

- Jones MDR, Hill M, Hope AM. The circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*: phase setting by the light regime. *J Exp Biol.* 1967; 47(3):503–11.
- Kaiser TS, Neumann D, Heckel DG. Timing the tides: genetic control of diurnal and lunar emergence times is correlated in the marine midge *Clunio marinus*. *BMC Genet.* 2011; 12:49.
- Kelly-Hope LA, Diggle PJ, Rowlingson BS, Gyapong JO, Kyelem D, Coleman M, et al. Short communication: Negative spatial association between lymphatic filariasis and malaria in West Africa. *Trop Med Int Health.* 2006; 11(2):129–35.
- Koella JC, Rieu L, Paul REL. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behavioral Ecology.* 2002; 13(6):816–20.
- Koella JC, Sørensen FL, Anderson RA. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci.* 1998; 265(1398):763–8.
- Koukkari WL, Sothorn RB. Introducing biological rhythms: A primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment. New York: Springer ©, editor. Springer US; 2006.
- Kyriacou CP, Oldroyd M, Wood J, Sharp M, Hill M. Clock mutations alter developmental timing in *Drosophila*. *Heredity (Edinb).* 1990; 64 (Pt 3):395–401.
- Lamontellerie M. [Results of surveys on the filariasis in western Upper Volta (Cercle de Banfora)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1972;47(6):783–838.
- Lazzari CR, Fischbein D, Insausti TC. Differential control of light-dark adaptation in the ocelli and compound eyes of *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol.* 2011; 57(11):1545–52.
- Lenth R, Buerkner P, Herve M, Love J, Riebl H, Singmann H. Package “emmeans”: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.5.2-1. 2020.
- Luce GG. Biological rhythms in psychiatry and medicine. Washington, DC: Natl Inst Mental Health, US Dept. Health, Education; Welfare, 183 pp. 1970.
- Lutwama JJ, Kayondo J, Savage HM, Burkot TR, Miller BR. Epidemic O’Nyong-Nyong fever in southcentral Uganda, 1996-1997: entomologic studies in Bbaale village, Rakai District. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(1):158–62.
- Macdonald G. The epidemiology and control of malaria. Amen House, Warwick Square, London E.C.4.: Oxford University Press; 1957.
- Magnusson A, Skaug H, Nielsen A, Berg C, Kristensen K, Maechler M, Bolker B, Sadat N, Lüdecke D, Lenth R, O’Brien J, Brooks M. Package “glmmTMB”: Generalized Linear Mixed Models using Template Model Builder. R package version 1.0.2.1. 2020.

- Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010; 10(2):159–77.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998; 7(2):179–84.
- Mbogo CN, Baya NM, Ofulla AV, Githure JI, Snow RW. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med Vet Entomol*. 1996; 10(3):251–9.
- Minis DH, Pittendrigh CS. Circadian oscillation controlling hatching: Its ontogeny during embryogenesis of a moth. *Science*. 1968; 159(3814):534–6.
- Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *J Infect Dis*. 2012; 206(10):1622–9.
- Mouhamadou CS, N’Dri PB, Fodjo BK, Sadia CG, Affoue F-PK, Koudou BG. Rapid spread of double East- and West-African kdr mutations in wild *Anopheles coluzzi* from Côte d’Ivoire. *Wellcome open research*. 2019; 4:31–1.
- Mullen GR, Durden LA. *Medical and Veterinary Entomology*, 1st Edition. Elsevier Science; 2002.
- Neumann D. Diel eclosion rhythm of a sublittoral population of the marine insect *Pontomyia pacifica*. *Marine Biology*. 1986; 90(3):461–5.
- Neville AC. Circadian organization of chitin in some insect skeletons. *Journal of Cell Science*. 1965; s3-106(76):315–25.
- Nguyen PL, Vantaux A, Hien DF, Dabiré KR, Yameogo BK, Gouagna L-C, et al. No evidence for manipulation of *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* host preference by *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*. 2017; 7(1):9415.
- North AR, Burt A, Godfray HCJ. Modelling the potential of genetic control of malaria mosquitoes at national scale. *BMC Biol*. 2019; 17(1):26.
- Paterson HE. The species, species control and antimalarial spraying campaigns. Implications of recent work on the *Anopheles gambiae* complex. *South African Journal of Medical Sciences*. 1963; 28(1-2):33–44 pp.
- Pates H, Curtis C. Mosquito behavior and vector control. *Annu Rev Entomol*. 2005; 50:53–70.
- Porciani A, Diop M, Moiroux N, Kadoke-Lambi T, Cohuet A, Chandre F, et al. Influence of pyrethroid-treated bed net on host seeking behavior of *Anopheles gambiae* s.s. Carrying the kdr allele. *PLoS One*. 2017; 12(7): e0164518.
- Qiu YT, Smallegange RC, Van Loon JJA, Ter Braak CJF, Takken W. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s. s. *Med Vet Entomol*. 2006; 20(3):280–7.

- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*. 2000; 9(5):491–7.
- Rao RU, Huang Y, Bockarie MJ, Susapu M, Laney SJ, Weil GJ. A qPCR-based multiplex assay for the detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(4):365–70.
- Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, et al. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*. 2011; 10:184.
- Robert V, Carnevale P. Les vecteurs des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes Médicales*. 1984;79–90.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V, Carnevale P. [The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985; 65 Suppl 2:201–14.
- Robert V, Petrarca V, Carnevale P, Ovazza L, Coluzzi M. Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans la région de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989 ; 64(4) :290–311.
- Rodhain F, Perez C. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire : notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Maloine; 1985.
- Ross R. Peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *Ind Med Gaz*. 1897; 32(9):357–8.
- Rowland M. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiological Entomology*. 1989; 14(1):77–84.
- Rowland M. Behaviour and fitness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An.stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Med Vet Entomol*. 1991; 5(2):193–206.
- Rowland M, Boersma E. Changes in the spontaneous flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* by parasitization with the rodent malaria *Plasmodium yoelii*. *Parasitology*. 1988; 97 (Pt 2):221–7.
- Ruiz JL, Yerbanga RS, Lefèvre T, Ouedraogo JB, Corces VG, Gómez-Díaz E. Chromatin changes in *Anopheles gambiae* induced by *Plasmodium falciparum* infection. *Epigenetics & Chromatin*. 2019; 12(1):5.
- Rund SSC, Lee SJ, Bush BR, Duffield GE. Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2012; 58(12):1609–19.

- Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J.* 2011; 10:80.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Torre A della. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008; 7:163.
- Saunders DS. *Insect clocks*. Pergamon Press, Oxford; 1982. (2nd ed.).
- Sawadogo SP, Diabate A, Toe HK, Sanon A, Lefevre T, Baldet T, et al. Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *J Med Entomol.* 2013; 50(2):285–93.
- Schellenberg JR, Abdulla S, Nathan R, Mukasa O, Marchant TJ, Kikumbih N, et al. Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. *Lancet.* 2001; 357(9264):1241–7.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671–5.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49(4):520–9.
- Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, et al. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2019; 116(30):15086–95.
- Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* 2009; 9:17.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors.* 2010; 3:117.
- Smits A, Roelants P, Van Bortel W, Coosemans M. Enzyme polymorphisms in the *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) complex related to feeding and resting behavior in the Imbo Valley, Burundi. *J Med Entomol.* 1996; 33(4):545–53.
- Takken W, Knols BG. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 1999; 44:131–57.
- Thomsen EK, Koimbu G, Pulford J, Jamea-Maiasa S, Ura Y, Keven JB, et al. Mosquito Behavior Change After Distribution of Bednets Results in Decreased Protection Against Malaria Exposure. *J Infect Dis.* 2017; 215(5):790–7.

- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, et al. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, west Africa. *Genetica*. 1994; 94(2-3):213–23.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, et al. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*. 1998; 40(4):477–511.
- Tripet F, Lounibos LP, Robbins D, Moran J, Nishimura N, Blosser EM. Competitive reduction by satyriization? Evidence for interspecific mating in nature and asymmetric reproductive competition between invasive mosquito vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(2):265–70.
- Tripet F, Toure YT, Dolo G, Lanzaro GC. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(1):1–5.
- Tripet F, Toure YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo G, Lanzaro GC. DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*. 2001; 10(7):1725–32.
- Tyndale-Biscoe M. Age-grading methods in adult insects: a review. *Bulletin of Entomological Research*. 1984; 74(3):341–77.
- Vantaux A, Sales Hien D de, Yaméogo B, Dabiré K, Thomas F, Cohuet A, et al. Host-seeking behaviors of mosquitoes experimentally infected with sympatric field isolates of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: no evidence for host manipulation. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2015; 3:86.
- Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, et al. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol*. 1999; 13(3):239–44.
- Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M, et al. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(47):19063–70.
- Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L, Brooke B. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors*. 2010; 3:67.
- WHO: World Health Organization; World malaria report 2019. Editor: Global Malaria Program, WHO Global; 2019.
- Yahouédo GA, Chandre F, Rossignol M, Ginibre C, Balabanidou V, Mendez NGA, et al. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci Rep*. 2017; 7(1):11091.

RESUMÉS

Title: Study of the genetic, physiological and environmental determinant of daily flight activity in Malaria vectors

Keywords: Anopheles, Rhythm of activity, Kdr, Behavior, Physiology

Abstract:

The appearance of new patterns in Anopheles biting behavior following the universal coverage of LLINs is worrying for malaria control. Indeed, the meticulous selection of vector populations that are able to escape the physical-chemical barrier of LLINs and bite when people are not protected is still ongoing. It is known that many Anopheles life rhythms are governed by an endogenous clock known as circadian which allows their temporal organization. In addition, several biotic (physiological resistance, nutritional status, parasitism, competition) or abiotic (light-dark cycle, temperature) environmental stimuli can modulate the insects' behavioral rhythms. As part of a better understanding of the shifted aggressive behavior observed in the field among malaria vector, and the determinants that may be involved, we have undertaken experimental studies on the daily rhythm flight activity of population of vectors that are involved in the transmission of malaria in Burkina Faso.

Titre : Étude des déterminants génétiques, physiologiques et environnementaux de rythmes journaliers d'activité chez les anophèles vecteurs du *Plasmodium*

Mots clés : Anophèles, Rythme d'activité, Kdr, Comportement, Physiologie

Résumé : L'apparition de nouveaux rythmes de comportement de piqûre des anophèles suite à la pression des insecticides utilisés aussi bien en santé humaine qu'en agriculture est inquiétante pour la lutte contre le paludisme. En effet, la menace de la sélection de populations de vecteurs capables de se soustraire de la barrière physico-chimique des MILD et piquant lorsque les personnes ne sont pas protégées demeure. Il est connu que bon nombre de rythmes de vie des anophèles sont gouvernés par une horloge endogène dite circadienne qui permet leur organisation temporelle. En outre, plusieurs stimuli environnementaux biotiques (résistance physiologique, état nutritionnel, parasitisme, compétition) ou abiotiques (le cycle lumière-obscurité, la température, humidité) peuvent moduler les rythmes de comportement des insectes. Dans le cadre d'une meilleure compréhension du comportement agressif décalé des anophèles vecteurs observé sur le terrain et des déterminants qui peuvent y être impliqués, nous avons entrepris des études expérimentales sur le rythme journalier d'activité locomotrice des populations d'anophèles vecteurs de *Plasmodium* et impliquée dans la transmission du paludisme au Burkina Faso.