

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

ECOLE DOCTORALE
Sciences Naturelles et Agronomie



N° d'ordre

THESE UNIQUE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE

DE BOBO-DIOULASSO

(DOCTORAT UNIQUE)

Doctorat Unique en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques
Par

HIEN Domonbabélé François de Sales

**Ecologie évolutive des interactions moustiques – *Plasmodium* :
influence des sources naturelles de nectar et manipulation
parasitaire**

Présentée et soutenue publiquement le 21/12/2016 devant le jury composé de :

Président : Pr Adrien Marie Gaston BELEM, Professeur titulaire (UPB)

Membres :

- **Pr Georges Anicet OUEDRAOGO**, Professeur titulaire (UPB) (Co-Directeur de thèse)
- **Dr Olivier GNANKINE**, Maître de Conférences à l'Université de Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO (Rapporteur)
- **Dr Thierry LEFEVRE**, Chargé de recherche au CNRS (Co-directeur de thèse)
- **Pr Roch Kounbohr DABIRE**, Directeur de recherche, IRSS-DRO/ CNRST (Co-directeur de thèse)

DEDICACES

A ma Mère, Somé Simone

A mon Père, Hien Abraham

A mon Oncle, Méda Jean Claude

A mon Cousin, Somé Léonard

A ma Fiancée, Palenfo Prisca Natacha

A toute la famille

Pour tout le dévouement et l'affection qu'ils m'ont toujours témoignés

REMERCIERMENTS

Les travaux de recherches qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés à l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso au sein de l'unité de recherche du paludisme et maladies tropicales négligées. Ces travaux ont bénéficié d'un appui financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) à travers le projet EMMA. Cette thèse marque la fin de trois belles années de dur labeur au cours desquels beaucoup de personnes m'ont soutenu et marqué à différents niveaux. Aujourd'hui j'aimerais pouvoir les remercier :

Pr Roch K Dabiré, Directeur de recherche, Directeur de L'IRSS/DRO, Directeur de thèse, je vous remercie pour tous les efforts personnels consentis pour la réalisation de cette thèse. Après notre master 2 au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP) Ouagadougou; vous nous avez encouragés à venir continuer en thèse dans votre brillante équipe d'entomologie médicale. Vous êtes un encadrant dont les mérites professionnels et moraux suscitent le respect et l'admiration de beaucoup de jeunes chercheurs. C'est avec respect et considération que je vous témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir encadré au cours de cette thèse.

Pr. Georges Anicet Ouedraogo, Professeur titulaire, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, malgré votre agenda chargé vous avez accepté de co-encadrer cette thèse. En plus de votre calendrier hyper chargé, vous avez toujours eu du temps à nous accorder, à nous écouter et à nous guider au cours de cette thèse. Recevez mes sincères reconnaissances.

Dr Thierry Lefèvre, Chargé de recherche, Co-directeur de thèse. Au cours de cette thèse, à travers vos rigueurs scientifiques, votre disponibilité, votre sens de l'écoute, votre dynamisme, votre accessibilité quelque soit la période et le temps, vos conseils, vos encouragements, votre gentillesse, votre générosité, votre sincérité, vous avez créé un climat propice au bon déroulement des travaux. En plus de vos valeurs scientifiques, vos soutiens illimités au delà du cadre professionnel ont été très bénéfiques pour moi. Vous n'êtes pas qu'un encadrant seulement, mais un ami, un frère. C'est avec un grand enthousiasme que je vous témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir encadré avec fermeté comme un maître. Je vous dis 1000 fois merci.

Pr Jean-Bosco Ouedraogo, Directeur de recherche, Chef de l'unité de recherche du paludisme et maladies tropicales négligées de l'IRSS. Veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de votre unité

Dr Serge Rakiswende Yerbanga, Responsable de l'équipe infectivité de l'institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) de Bobo-Dioulasso, vos suggestions, observations pertinentes, votre accessibilité quelque soit la période et le temps, vos conseils, vos encouragements, votre gentillesse, votre générosité, votre sincérité ont façonné de bout en bout ce présent travail. Vous représentez pour moi pas seulement un modèle dans la recherche mais grand frère, un ami, un confident. Nous vous réitérons notre profonde gratitude.

Dr Abdoulaye Diabaté, Malgré vos multiples occupations vous êtes disponibles pour les étudiants que nous sommes. Ceci est le témoignage de votre dévouement à la formation des jeunes. Votre rigueur, votre sens du devoir bien accompli, font de vous un scientifique et un chercheur digne de ces noms. Je vous suis reconnaissant pour l'appui technique et scientifique mais aussi pour la compréhension dont j'ai bénéficié tout le long de ce travail. Soyez rassuré de ma profonde gratitude.

Dr Léa Paré/ Toé, pour vos multiples conseils, vous n'hésitez jamais à nous remettre sur le droit chemin. Je vous en suis plus que reconnaissant.

Dr Anna Cohuet, Chargé de Recherche à l'IRD pour tout l'appui technique et scientifique dont j'ai bénéficié, veuillez accepter, mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Dr Amélie Vantaux, Femme de rigueur et de principe à travers vos encouragements, votre dynamisme, vos conseils, votre sincérité, vous avez apporté un plus à notre vision scientifique, veuillez accepter, mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Dr Olivier le Roux, Merci pour votre intérêt accordé à ce travail, votre disponibilité, vos différents conseils, encouragements et suggestions très pertinentes.

Dr Olivier Gnankiné, Maître de Conférences à l'Université de Ouaga I Pr Joseph KIZERBO à l'Unité de Formation et de Recherche en Science de la Vie et de la Terre (UFR/SVT), option Biologie Animale, **Dr Guiguibaza-Kossigan Dayo**, *Maître de Recherches CAMES (Génétique Animale)*, Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la lutte intégrée (URBIO) au Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) et le **Dr Isabelle Morlais**, C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

A toute l'équipe infectivité, **Dr Serge Yerbanga, Dr Thierry Lefèvre, Dr Karine Mouline, Dr Olivier Roux, Dr Frank A Yao, Dr Da Dari Frédéric, Dr Sangaré Ibrahim, Bienvenue K. Yaméogo, Guissou Edwige, Somé Bernard, Seydou Bienvenu Ouattara, Raymond Hien, Bali Jean Bazié, Souleymane Tamboula, Dabiré Baudouin, Da Fulgence, Hélène Somé** pour toute l'attention et l'aide accordée à ce travail

Aux aînés **Docteurs, Serge Yerbanga, Olivier Gnankiné, Hamidou Ilboudo, Moussa Namountougou, Sawadogo P. Simon, Sangaré Ibrahim, Da Dari Frédéric, Somé Fabrice, Da Olo, Frédéric Nikiéma, Frank A Yao, Hamidou Maïga, Abdoulaye Niang, Guenne Samson, Robert K Ouédraogo** je vous remercie pour vos conseils et aides multiformes.

Une attention particulière à mes amis, **Dr Serge Yerbanga, Dr Thierry Lefèvre, Dr Hamidou Ilboudo, Bienvenue K. Yaméogo, Guissou Edwige, Dr Da Olo, Kwama Bayili, Dr Frédéric Nikiéma, Dr Franck A Yao, Dr Moussa Namountougou, Dr Hamidou Maïga, Dr Sawadogo P. Simon, Etienne Bilgo, Tapsoba W Janvier** pour votre amitié sincère et vos soutiens multiformes.

Je suis particulièrement sensible à l'intérêt que les messieurs de l'équipe d'entomologie de l'IRSS, **Ali Ouari, Tantie Natogma Traore, Ines Yameogo, Sougrinoma Zoungrana, Souleymane Sanou, Roger Sanou, Hervé Somda, Hamidou Traore, Hyacinthe Guel, Sény Ilboudo, Abdoulrasmané Kabré, Ibrahim Diabate, Abdoulaye Ouattara, Fulgence Da, Ali Ouedraogo, Noufou Diabaté, Bakary Diabaté, Stéphane Somda, Kousièle Ziémé**

Dabiré, Richard Bationo, N'Do Séverin, Serge Pooda, Diloma Dieudonné Soma, Séverin Somda, Bayili Kwama ont manifesté pour ce travail. Vous m'avez témoigné un intérêt particulier et une disponibilité exceptionnelle pour ce travail. Trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Aux collègues Doctorants et en Master notamment, **Bienvenue K Yaméogo, Hermann Sié Pooda, Etienne Bilgo, Dimitri Wangrawa , Awa Gneme, Aminata Fofana, Patrik Epopa, Serge Pooda, Séverin Somda, Hien Aristide, Bayili Kwama, Abel Millogo, Azize Millogo, Diloma Dieudonné Soma, Thomas Bazié, Ebou Cathérine Neya.**

A l'équipe d'entomologie médicale du National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP) ouagadougou, **Dr N'Falé Sagnon, Dr Moussa W Guelbeogo, Dr Athanase Badolo, Seydou Ouédraogo, Joseph Koudougou, Idrissa Drame, Issa Konate, Elie Valea, Ouseni Diallo, Pierre Ouédraogo, Moustapha Bamogo, Madi Nabile, Mamoudou Traore, Issa Pare,** pour tous les efforts consentis à la Réalisation de notre master 2 dans votre laboratoire.

A **Mr Karama Lassina**, professeur certifié de français au Lycée Ouezzin Coulibaly de Bobo-Dioulasso, **Mme Palenfo Brigitte**, professeur d'histoire et Géographie au Lycée national de Bobo-Dioulasso, **Mme Séni Antoinette et Mme Toé** pour vos conseils et suggestions.

Je ne saurai terminer sans adresser mes vifs remerciements aux parents et amis qui m'ont apporté leurs soutiens multiformes pour l'aboutissement de cette thèse.

Sommaire

DEDICACES.....	I
REMERCIEMENTS	II
Sommaire	V
LISTE DES ABBREVIATIONS	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XII
Résumé.....	XIII
Abstract	XIV
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. Le parasitisme.....	7
2. Le paludisme.....	8
2.1. Le paludisme: un problème majeur de santé publique	8
2.2 Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	9
2.2.1 Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> chez l'Homme	9
2.2.2 Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> chez l'anophèle	10
3. Biologie du moustique.....	11
3.1 Emergence et accouplement.....	11
3.2 Cycle gonotrophique	13
4. La transmission du paludisme par les anophèles vecteurs	14
4.1 Les vecteurs du paludisme sur le continent Africain.....	14
4.2. La capacité vectorielle	16
5. La compétence vectorielle	17

5.1. Les déterminants génétiques et moléculaires de la compétence des moustiques pour les parasites <i>Plasmodium</i>	18
5.1.1. Les facteurs génétiques du moustique	18
5.1.2 Les facteurs génétiques du parasite.....	18
5.1.3 Les interactions génotype du moustique génotype du parasite.....	19
5.2. Les déterminants environnementaux de la compétence des moustiques pour les parasites <i>Plasmodium</i>	20
5.2.1 La température.....	21
5.2.2. La co-infection	22
5.2.3. Les effets maternels	23
5.2.4 La prédation	24
5.2.5 Les facteurs intrinsèques des moustiques	24
5.2.6 La nutrition	25
6. Conséquences évolutives et épidémiologiques	26
6.1 Manipulation parasitaire	26
6.2 Automédication.....	28
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODOLOGIES.....	29
1.Travaux de laboratoire.	30
1.1 Origine et élevage des moustiques	30
1.2 Prospections parasitologiques et techniques d'infections expérimentales.....	30
1.2.1 Recherche des porteurs de gamétocytes.....	30
1.2.2 Technique d'infection expérimentale	31
1.3 Technique de dissection de l'estomac et de la tête thorax du moustique	33
2. Extraction et Polymérase Chain Reaction (PCR).....	34
2.1 Extraction de l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN).....	34
2.1.1 La PCR classique	35
2.1.2 La PCR en temps réel ou (qPCR)	35
3. Considération éthique.....	36

CHAPITRE 3: ACTIVITES DE RECHERCHES	37
ACTIVITE DE RECHERCHE 1: Les sucres naturels consommés par les anophèles femelles influencent le développement et la transmission du paludisme	38
1.1 Introduction	38
1.2 Méthodologie	40
1.2.1 Choix des sources de nectars de plantes.....	40
1.2.2 Les différentes plantes utilisées	40
1.2.3 Le test d’anthrone	42
1.2.4 Effet des sucres de plantes sur la taille du repas de sang.....	43
1.2.5 Expérience 1: Déterminer l’effet de sucre naturel de plantes sur le développement des oocystes de <i>P. falciparum</i> , ainsi que sur la survie et la fécondité du moustique	44
1.2.6 Expérience 2: Déterminer l’effet du sucre des plantes sur l’index sporozoïtique et de la période d’incubation extrinsèque (PIE).	45
1.2.7 Expérience 3: Déterminer comment l’infection parasitaire et les espèces d’hôte de plante interagissent pour influencer la longévité des moustiques.	46
1.2.8 Modèle mathématique	46
1.2.9 Analyses statistiques	49
1.3 Résultats	49
1.3.1 Les sucres végétaux influencent le développement précoce de <i>P. falciparum</i> , ainsi que la survie et la fécondité du vecteur	49
1.3.2 Les sucres végétaux influencent l'indice sporozoïtique et le PIE	51
1.3.3 Les sucres végétaux influencent de manière similaire la longévité des moustiques infectés et des moustiques non-infectés	53
1.3.4 Les sucres végétaux affectent l'intensité de la transmission du paludisme	54
1.3.5 Résultats du test d’anthrone.....	56
1.3.6 Résultats des effets des sucres de plantes sur la taille du repas de sang.....	57
1.4 Discussion.....	58
1.5 Conclusion partielle.....	61
ACTIVITE DE RECHERCHE 2: Influence de l’infection du moustique, <i>Anopheles coluzzii</i> avec <i>Plasmodium falciparum</i> sur le choix des sources naturelles de nectar	62

2.1 Introduction.....	62
2.2 Méthodologie	63
2.2.1 Infection expérimentale	63
2.2.2 Etude du comportement de choix des sucres végétaux	63
2.2.3 Analyses statistiques	66
2.3 Résultats	67
2.3.1 Infection	67
2.3.2 Activation	67
2.3.3 Attraction relative	68
2.4 Discussion	69
2.5 Conclusion partielle	71
ACTIVITE DE RECHERCHE 3: Etude du comportement de recherche des hôtes vertébrés par des moustiques infectés expérimentalement avec des isolats naturels de <i>Plasmodium falciparum</i>	72
3.1 Introduction.....	72
3.2 Matériels et méthodes	75
3.2.1 Etude du comportement du moustique à longue distance	75
3.2.2 Etude du comportement du moustique à courte distance: expérience 1	78
3.2.3 Etude du comportement du moustique à courte distance: expérience 2	79
3.3 Analyses statistiques	81
3.3.1 Comportement du moustique à longue distance	81
3.3.2 Comportement du moustique à courte distance	81
3.4 Résultats	81
3.4.1 Comportement du moustique à longue distance	81
3.4.2 Comportement du moustique à courte distance: expérience 1	84
3.4.3 Comportement du moustique à courte distance: expérience 2	86
3.5 Discussion	87
3.6 Conclusion partielle	89

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
ANNEXES.....	113
PUBLICATIONS ET CONFERENCES.....	113

LISTE DES ABBREVIATIONS

% :	Pourcentage
°C:	Dégré Celsius
µl :	Microlitre
An:	<i>Anopheles</i>
ADN:	Acide Désoxyribo Nucléique
aq:	amodiaquine
as:	Artesunate
B :	<i>Barleria</i>
bp:	Paire de Base
C:	Capacité
CE-CM :	Comité Ethique du Centre-Muraz
Cm/S:	Centimètre par seconde
CSPS:	Centre de Santé et de Promotion Sociales
CTAB 2% :	Cetyl trimethylammonium bromide 2%
dNTP :	Désoxyribonucléotides
F:	Fécondité
G _H :	Génotype de l'Hôte
GLM:	Generalized Linear Mixed (LModèle Linéaire Généralisé)
GLMM :	Generalized Linear Mixed Models (Modèles Mixtes Linéaires generalizes)
G _p :	Génotype du Parasite
IRSS DRO :	Direction Régionale de l'Institut de Recherche en Science de la Santé
J:	Jour
JPI :	Jour Post-Infection
kg :	Kilogramme
L x l x h :	Longueur x largeurs x hauteurs
L :	<i>Lannea</i>
LHS :	Latin Hypercube Sampling
LRT :	likelihood ratio tests (tests de ratio de probabilité)
M & S:	Mopti & Savana
m :	Mètre
M :	<i>mangifera</i>
mg :	Milligramme
MgCl ₂ :	Chlorure de Magnésium
MILDA:	Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action
ml :	millilitre
mm :	millimètre
mM:	millimolaire
N/J:	Nuit/ Jour
Ø :	Diamètre
OMS:	Oganisation Mondiale de la Santé
P :	<i>P-Value</i>
PCR:	Polymerase Chain Reaction
Pfs47 :	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein of 47 kDa
PID:	Pulvérisation Intra-Domiciliaire
PIE:	Période d'Incubation Extrinsèque

pmoles :	Pico-moles
PNLP:	Programme National de Lutte contre le Paludisme
qPCR:	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RBM:	Roll Back Malaria
rpm :	Rotation Par Minute
s.l :	sens large
s.s :	sens stricte
T :	<i>Thevetia</i>
USA:	United States of America (Etats unis d'Amérique)
VBT:	Vaccin Bloquant la Transmission

LISTE DES FIGURES

Figure 1:Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'Homme et le moustique vecteur. (White et al. 2014).....	11
Figure 2:Les différentes phases du cycle biologique de la femelle anophèle, modifié selon <i>International Water Management Institute</i>	12
Figure 3:Schéma des cycles gonotrophiques des anophèles modifié d'après <i>International Water Management Institute</i>	14
Figure 4:Une carte mondiale des espèces dominantes de vecteurs du paludisme d'après Sinka et al, 2012.....	15
Figure 5:Diversité par laquelle les facteurs non-génétiques peuvent influencer la compétence du moustique vecteur pour <i>Plasmodium</i> . (Lefèvre et al. 2013).	21
Figure 6: Carte du Burkina Faso avec les différents sites de prospections parasitologiques aux alentours de Bobo-Dioulasso.....	31
Figure 7:(A) Dispositif complet, avec le bain marie, les cellules de gorgement et (B) les cellules de gorgement et les gobelets en dessous avec des moustiques	32
Figure 8: Représentation des différentes étapes d'une infection expérimentale	33
Figure 9:Détection microscopique d'oocystes dans l'estomac du moustique	34
Figure 10: Photo du dispositif de l'appareil qPCR.....	36
Figure 11 : Liste des différentes plantes testées au cours de notre première année de thèse.	40
Figure 12:Les espèces de plantes naturelles utilisées dans ces expériences.....	41
Figure 13:Disposition des sources de sucre dans les cages. (a) Bouquet de fleur de <i>Thevetia neriifolia</i> . (b) Bouquet de fleur de <i>Barleria lupulina</i> . (c) Fruit de <i>Mangifera indica</i> . (d) Les fruits de <i>Lannea microcarpa</i> (e) Solution de glucose 5% imbibée sur du coton.....	42
Figure 14: Photos montrant la prise de jus sucré par les moustiques sur les différents traitements.....	43
Figure 15: Effet des traitements de sucre sur le développement de la phase oocyste des moustiques, <i>Anopheles coluzzii</i> exposés au <i>P. falciparum</i> , et sur leur longévité et fécondité	51
Figure 16: Effet des traitements de sucre sur l'index sporozoïtique, la survie des moustiques jusqu'en phase sporozoïte et la période d'incubation extrinsèque	52
Figure 17: Effets des traitements de sucre et du statut d'infection sur la longévité des moustiques.....	54
Figure 18: Différence théorique dans la distribution épidémiologique en fonction de l'abondance relative des plantes	56
Figure 19: Concentration de l'hématine en fonction des traitements de plantes reçus	58

Figure 20: Dispositif comportemental utilisé pour étudier la préférence des moustiques pour les plantes.....	65
Figure 21 : Traitements utilisés au cours des expériences.....	66
Figure 22: Activation des moustiques infectés et non infectés à trois périodes différentes pour l'infection n°1 et n°2. J2 et J7 correspondent à la phase de développement des oocystes et J14 à la phase transmissible (sporozoïtes dans les glandes salivaires) chez les individus infectés.	68
Figure 23: Relation entre l'activation des moustiques et l'intensité des oocystes	68
Figure 24: Attraction relative moyenne de chaque traitement de sucre pour les moustiques infectés et non infectés à trois périodes différentes pour l'infection n°1 et n°2	69
Figure 25: (A) représentation schématique de l'olfactomètre à double entrées, (B) photo de la partie intérieure de l'olfactomètre, (C) photo de la partie intérieure de l'olfactomètre.....	76
Figure 26: (A) représentation schématique du système d'enregistrement des activités de locomotion, (B) Photo du dispositif (C) représentation schématique des périodes de tests	79
Figure 27 : Moustiques infectés avec succès dans le test comportemental à longue distance	82
Figure 28: Activation des moustiques à longue distance	83
Figure 29: Réponse comportementale des moustiques à longue distance.....	84
Figure 30: Moustiques infectés avec succès dans les tests comportementaux à courte distance	85
Figure 31: Réponse comportementale des moustiques à courte distance (expérience1).....	86
Figure 32 : Réponse comportementale des moustiques à courte distance (expérience2).....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Valeurs des paramètres du modèle.....	48
Tableau II: Proportion de moustiques positifs au test d'anthrone ayant pris un repas de sucre de plantes après deux jours de contact.	57

Résumé

La plupart des études sur les relations moustiques-*Plasmodium* se sont concentrées sur les interactions directes et génétiques entre le parasite et son vecteur, et l'influence de plusieurs facteurs écologiques demeurent inconnue. En particulier aucune information n'existe concernant le rôle des sources naturelles de sucres sur la compétence vectorielle des moustiques. En outre, la majorité des études se sont concentrés sur des modèles artificiels et non pas naturels. Les variations environnementales telle que le régime alimentaire peuvent affecter les interactions entre moustique et *Plasmodium* mais il existe aujourd'hui un besoin urgent d'examiner ces relations au sein de systèmes naturels et d'utiliser des paramètres environnementaux pertinents (. source naturelle de sucre). De la même manière, aucune étude n'a, à ce jour, examiné la capacité de *P. falciparum* à modifier le comportement de son vecteur dans un sens qui augmente sa transmission (manipulation parasitaire) en utilisant des infections expérimentales avec une association moustique-*Plasmodium* naturelle.

L'objectif de cette thèse était de combler ces lacunes en étudiant la manière dont les sources naturelles de nectars peuvent affecter l'issue de l'infection moustique- *Plasmodium falciparum*, et de tester dans quelle mesure l'hôte et le parasite sont capables d'exploiter l'environnement dans leur propre intérêt (manipulation parasitaire ou automédication).

Nos résultats indiquent que les sources de nectar telles que *Thevetia neriifolia*, *Mangifera indica*, *Barleria lupulina* et *Lanea microcarpa* affectent différemment la prévalence et l'intensité de l'infection, la durée du développement du parasite et certains traits d'histoire de vie des moustiques, *Anopheles coluzzii*. L'utilisation d'un modèle en épidémiologie suggère que ces sources naturelles de sucre peuvent affecter significativement la transmission du paludisme. Lors de tests comportementaux, les moustiques sains et infectés ont présenté les mêmes niveaux de préférence parmi les différentes sources naturelles de sucres. Ainsi, nos observations ne permettent pas à ce stade de soutenir l'hypothèse d'automédication chez les moustiques. Enfin l'étude de la manipulation parasitaire au sein de l'association naturelle *An. coluzzii* –*P. falciparum* n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif de l'infection sur le comportement de recherche de l'hôte chez les moustiques. Ainsi la manipulation du comportement chez les vecteurs n'est peut-être pas un phénomène général mais dépend sans doute de phénomènes d'adaptations locales.

Les travaux effectués ont permis d'accroître nos connaissances concernant l'évolution, et l'écologie des interactions moustiques-*Plasmodium*. Dans une perspective de contrôle du paludisme, d'autres études utilisant une plus large gamme de plantes devront être menées afin de mettre en évidence des espèces végétales bloquant la transmission du parasite. Enfin concernant l'hypothèse de manipulation et d'automédication, des études utilisant différentes combinaisons sympatriques et allopatriques d'hôtes et de parasites pourront permettre de mettre en évidence de possibles phénomènes d'adaptations locales.

Mots-clé: Paludisme, *An. coluzzi*, *P. falciparum*, sources naturelles de nectar, *Thevetia neriifolia*, *magifera indica*, *Barleria lupulina*, *Lanea microcarpa*, automédication, manipulation parasitaire.

Abstract

Most previous studies on mosquito-*Plasmodium* relationships have focused on direct and genetic interactions between the parasite and its vector, and the influence of several environmental factors remain unknown. In particular, there is no information on the role of natural sources of sugars on mosquito competence for malaria parasites. Furthermore, most studies have focused on artificial and not natural models. Environmental changes such as diet can affect the interactions between mosquito and malaria parasites but there is now an urgent need to examine these relationships in natural systems and to use relevant environmental parameters (eg natural sugar source). Similarly, no study to date, have examined the ability of *P. falciparum* to change the behavior of its vector in a way that increases its transmission (parasitic manipulation) using experimental infections with a natural mosquito-*Plasmodium* combination. The objective of this thesis was to fill these gaps by studying how the natural sources of nectar may affect the outcome of mosquito infection with *P. falciparum*, and test how the host and the parasite are able to exploit the environment for their own benefit (parasitic manipulation or self-medication).

Our results indicate that nectar sources such as *Thevetia neriifolia*, *Mangifera indica*, *Barleria lupulina* and *Lannea microcarpa* differently affect the prevalence and intensity of infection, the period of development of the parasite and some life history traits of the mosquito *Anopheles coluzzii*. An epidemiological model suggests that these natural sources of sugar can significantly affect the transmission of malaria. During behavioral testing, uninfected and infected mosquitoes showed the same levels of preference among different natural sources of sugars. Thus, our observations do not allow at this stage to support the self-medication hypothesis in mosquitoes. Finally, the study of parasitic manipulation in the natural *An. coluzzii* -*P. falciparum* association failed to demonstrate a significant effect of infection on mosquito host-seeking behaviors. Thus the manipulation of behavior in vectors is perhaps not a general phenomenon but probably depends on local adaptations.

This work helped to increase our knowledge of the evolution and ecology of mosquito-*Plasmodium* interactions. From the perspective of malaria control, further studies using a wider range of plants species will be conducted to highlight possible plant-derived transmission blocking-activities. Finally, regarding the hypothesis of manipulation and self-medication, studies using different combinations of sympatric and allopatric hosts and parasites will help to highlight possible phenomena of local adaptations.

Keywords: Malaria, *An. coluzzii*, *P. falciparum*, natural nectar sources, *Thevetia neriifolia*, *mangifera indica*, *Barleria lupulina*, *Lannea microcarpa*, self-medication, parasite

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme demeure un problème de santé publique dans le monde avec 212 millions de cas et 429 000 décès dans le monde par an, le paludisme prédomine dans la ceinture de la pauvreté du globe (OMS 2016). L'Afrique est le continent le plus affecté avec près de 90% des cas et 92% de décès par an (OMS 2016). L'absence d'un vaccin protégeant à 100% contre cette maladie et les problèmes de chimiorésistance rendent les traitements difficiles et coûteux. En effet, au niveau individuel, le coût économique lié au paludisme inclut les frais d'hospitalisation, la baisse des rendements dans les champs, aux services ou des jours d'école perdus. Au Burkina Faso, le paludisme représente 54% des motifs de consultation, 63% d'hospitalisation et 50% des décès dans les formations sanitaires (PNLP 2014). Dans le monde, le financement destiné pour le contrôle et l'élimination du paludisme a été estimé à 2,9 milliards de dollars en 2015 dont 32% de cette somme provient de la contribution des gouvernements des pays endémiques.

Le paludisme est une parasitose due à un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'hôte vertébré par un moustique du genre *Anopheles*. Plus de 85% des cas et 90% des décès du au paludisme proviennent de l'Afrique Sub-Saharienne, et sont causés par *Plasmodium falciparum* dont les vecteurs majeurs appartiennent au complexe *Anopheles gambiae* s.l. (White *et al.* 2014). Alors, les interactions *P.falciparum-An.gambiae* ont donc un rôle particulièrement important en terme de santé publique.

Dans le souci d'une lutte intégrée contre le paludisme, la communauté scientifique préconise de nos jours pour son contrôle des luttes associatives contre le parasite et contre le vecteur. La lutte contre les vecteurs a suscité un grand espoir juste après la deuxième guerre mondiale avec l'utilisation de la Dichloro Diphényl Trichloroéthane (DDT), Carbamates, Pyréthrinoïdes...pour éliminer les larves dans les gîtes larvaires et les adultes au niveau des habitations. Cependant, dans les années 50 ce miracle s'est vite transformé en mirage avec l'apparition des gènes de résistance chez les moustiques vecteurs (Rivero *et al.* 2010). Par exemple, la résistance aux Pyréthrinoïdes, des insecticides utilisés dans l'imprégnation des moustiquaires et la pulvérisation intra-domiciliaire (PID), a été noté dans 27 pays de l'Afrique et 41 pays dans le monde (Fane *et al.* 2012; Namountougou *et al.* 2013; Santolamazza *et al.* 2008). Face à la jonction de tous ces problèmes qui mettent à rude épreuve la lutte anti-vectorielle, il y a une nécessité d'établir de nouvelles stratégies et pistes de recherches de contrôle du paludisme (Breman & Brandling-Bennett, 2011). De nos jours, bloquer le développement du parasite chez le moustique vecteur apparaît comme une stratégie d'avenir

complémentaire aux autres stratégies existantes. En effet, une fois le parasite ingéré par le moustique, les étapes de son développement peuvent déterminer l'issue de la transmission du *Plasmodium*. Des études ont montré qu'il existe une chute drastique de la charge parasitaire lors de son cycle de développement chez le moustique notamment lors du passage des gamètes en ookinètes, ookinètes en oocystes, lors de la duplication intense du génome d'oocyste, des pertes de parasites ont été aussi notifiées dans l'hémocèle et lors de la traversée de la membrane des glandes salivaires (Blandin & Levashina, 2004).

Des études basées sur le blocage de la transmission du *Plasmodium* du moustique à l'Homme ont été développées (Kaslow 1997) ciblant les paramètres clés de la compétence vectorielle et la capacité vectorielle. En plus, des vaccins altruistes ou vaccins bloquant la transmission ou Transmission Blocking Vaccine (TBV) pour lesquels des antigènes ont stimulé la production d'anticorps chez l'homme pour bloquer la transmission des stades de parasites dans le moustique vecteur ont vu le jour et sont en expérimentation (Bousema et al. 2011; Carter, 2001; Da et al. 2013). Ces stratégies ont pour finalité de réduire la compétence vectorielle et la capacité vectorielle. Il devient de plus en plus urgent d'explorer d'autres aspects du système hôte-parasite qui demeurent inexploités jusqu'à nos jours.

Le parasitisme est le mode de vie le plus commun du monde vivant (Poulin & Morand, 2000). De ce fait disposer de meilleures connaissances sur les interactions entre les organismes hôtes et leurs parasites est d'une importante capitale afin de mieux prédire les conséquences des maladies chez les êtres humains, en agriculture et dans les populations sauvages (Daszak et al. 2000). Les hôtes et les parasites sont engagés dans une course coévolutive. En effet, aux nouveaux mécanismes de résistances mis en place par l'hôte, le parasite répond en contournant ces nouvelles lignes de défenses. De nombreuses études ont montré que les traits phénotypiques des parasites et des hôtes sont génétiquement déterminés (Carius et al. 2001; Lefèvre et al. 2011; Thompson & Burdon, 1992) et que leur expression peut dépendre des interactions spécifiques entre génotypes de l'organisme hôte et celui de son parasite (Harris et al. 2010). Cependant, le rôle de l'environnement abiotique, biotique et interne du moustique est très déterminant dans la définition des traits phénotypiques des hôtes et leur parasite (Lefèvre et al. 2013; Wolinska & King, 2009). Mais, très peu d'études ont testé les effets environnementaux sur les interactions entre *An. gambiae*, le vecteur principal du paludisme en Afrique Sub-saharienne et son parasite *Plasmodium falciparum*. Les rares travaux menés dans ce sens ont porté sur des modèles d'études artificiels au laboratoire comme par exemple

l'association entre le parasite murin *Plasmodium chabaudi* et un anophèle asiatique, *Anopheles gambiae* (Okech et al. 2004; Blanford et al. 2009; Paaijmans et al. 2010). Ce qui fait que, certains auteurs pensent qu'il y a un besoin urgent d'examiner au sein des systèmes naturels, des paramètres environnementaux pertinents comme par exemple la source naturelle de sucre (Tripet et al. 2008) sur les interactions moustiques-*Plasmodium*. Aujourd'hui, les publications sur le génome de *P. falciparum* et *An. gambiae* (Gardner et al. 2002; Holt et al. 2002) ont fourni d'importantes informations et apporté de grands espoirs dans la recherche de solutions aux problèmes du paludisme. Par conséquent, la communauté scientifique s'accorde sur le fait que la compréhension de la complexité des interactions vecteurs-*Plasmodium* passera par une approche intégrée en combinant des informations génomiques aux études fondamentales de laboratoires et de terrains tout en prenant en compte la variabilité environnementale.

Des études ont montré que les moustiques des deux sexes et de tout âge ingèrent fréquemment le nectar et autres sources de sucres notamment le miellat, la sève et les fruits comme source d'énergie nécessaire à leur vol et la maturation des follicules ovariennes (Foster 1995). Aussi, ces études ont montré que les femelles hématophages utilisent les protéines issues de leurs repas de sang pour la maturation des œufs, leur survie et la fécondité (Manda et al. 2007b). Enfin, des études ont montré que les femelles sont capables de localiser et de présenter des préférences parmi certaines espèces de plantes (Manda et al. 2007a). En outre, les interactions moustique – *Plasmodium* sont caractérisées par des processus coévolutifs (Molina-Cruz et al., 2015). Cependant, Jusqu'à présent, la plupart des études se sont concentrées sur les interactions directes et génétiques entre les *Plasmodium* et leurs moustiques vecteurs, et ont largement ignoré le rôle de l'environnement (Lefèvre et al. 2013). Cette approche se révèle limitée, car plusieurs études récentes montrent que les conditions environnementales peuvent fortement influencer sur l'issue de l'infection (compétence vectorielle) et donc sur la transmission. Et, aucune étude n'a exploré l'effet de la diversité des plantes sur la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis du *Plasmodium*. En particulier aucune information n'existe concernant le rôle des sources naturelles de sucres sur la compétence vectorielle des moustiques. Mais, la majorité des études existantes se sont concentrées sur des modèles artificiels et non pas naturels. En résumé, les variations environnementales (régime alimentaire) peuvent affecter les interactions entre moustique et *Plasmodium* donc il existe aujourd'hui un besoin urgent d'examiner ces relations au sein de systèmes naturels et d'utiliser des paramètres environnementaux pertinents (par exemple les sources naturelles de sucre).

D'où la nécessité d'évaluer les effets de différentes sources d'énergies (nectar, sève et fruit) présente au niveau de certaines plantes sur les moustiques infectés, serait un atout fondamental dans la recherche de nouvelles méthodes de lutte contre le paludisme.

De la même manière, aucune étude n'a, à ce jour, examiné la capacité de *P. falciparum* à modifier le comportement de son vecteur dans un sens qui augmente sa transmission (manipulation parasitaire) en utilisant des infections expérimentales avec une association moustique-*Plasmodium* naturelle. C'est dans ce contexte que cette thèse a été initiée avec un objectif global, qui s'inscrit dans une approche de lutte intégrée, d'évaluer l'influence des sources naturelles de nectars sur l'issue de l'infection moustique- *Plasmodium falciparum*, et de tester dans quelle mesure l'hôte et le parasite sont capables d'exploiter l'environnement dans leur propre intérêt (manipulation parasitaire ou automédication).

Il s'agit plus spécifiquement :

- de déterminer les effets de différentes sources naturelles de sucre sur la compétence vectorielle et sur la dynamique de transmission du paludisme (**Activité de recherche 1**)
- d'examiner la capacité des moustiques à choisir les espèces de plantes qui leur permettront de mieux combattre l'infection (auto-médication) ou la capacité du parasite à exploiter les espèces de plantes (indirectement en modifiant le choix de son vecteur) qui lui permettront un développement optimal (manipulation parasitaire) (**Activité de recherche 2**)
- d'évaluer la capacité de *P. falciparum* à modifier le comportement de recherche de l'hôte Humain par son vecteur à travers un dispositif en olfactomètre et un système de locomotion (**Activité de recherche 3**).

L'organisation de ces travaux se fera autour du plan suivant :

- le deuxième chapitre, résume l'ensemble du matériel et méthodologies utilisés au cours des différents travaux de cette thèse ;
- un troisième chapitre « **Activités des recherches** » représentant chacun les 3 objectifs spécifiques de cette thèse. Chacune de ces activités représente un article publié, sous presse ou en préparation. Ces activités de recherches sont structurées en introduction, méthodologie, résultats, discussion et conclusion partielle.
- enfin, en dernière partie de cette thèse, une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le parasitisme

Le mot *parasitisme* vient du Grec ancien «*parasitos*» qui étymologiquement signifie une personne qui vit au dépend d'autrui (Michalakis, 2009). Il est défini comme un mode de vie dans lequel un organisme (le parasite) utilise durablement un autre organisme (l'hôte) duquel il tire des bénéfices (ressources, habitats, transports, soins parentaux) et auquel il inflige des coûts sur la valeur sélective (croissance, fécondité, survie) (Clayton & Moore 1997; Poulin 2007; Combes 2001). Le parasite peut se nourrir à l'intérieur ou à l'extérieur de l'hôte pendant une partie ou la totalité de son existence; et il peut, au cours de son cycle, vivre sur un ou plusieurs hôtes.

Les relations entre les hôtes et les parasites sont d'une incroyable diversité. C'est un mode de vie qui est apparu plusieurs fois indépendamment dans de nombreux taxons au cours de l'évolution: virus, bactéries, champignons, protozoaires, arthropodes, helminthes, plantes, et vertébrés (par exemple : les coucous) (De-Meeûs & Renaud 2002; Poulin 2007). Les parasites constituent une part importante de la diversité biologique: jusqu'à 50% de la biodiversité selon certaines estimations (Poulin 2014; Windsor 1998). Aucune espèce d'hôte n'échappe au parasitisme et aux contraintes liées à cette exploitation durable dans le temps écologique et dans le temps historique (évolutif). L'Homme, à lui seul, peut être l'hôte de plus de 350 espèces de protozoaires et d'helminthes (Despommier *et al.* 2005). Les parasites sont présents dans tous les écosystèmes et sous tous les climats.

Les interactions hôte-parasite sont des phénomènes évolutifs dynamiques dans le temps et l'espace. Elles sont caractérisées par des processus coévolutifs: aux nouveaux mécanismes de résistance mis en place par l'hôte, le parasite répond, il coévolue en contournant ces nouvelles lignes de défense. De nombreux travaux ont démontré l'importance des parasites en tant qu'agent régulateur de la dynamique des populations hôtes (Morand & Deter, 2007) et de structuration des communautés (Wood *et al.* 2007). Certaines études ont également montré que les parasites peuvent être à l'origine du maintien du polymorphisme génétique chez les hôtes (Prugnolle *et al.* 2005), jouer un rôle sur la sélection sexuelle et le maintien des caractères sexuels extravagants (Hamilton & Zuk, 1982; Hamilton 1980), ainsi que sur l'évolution des traits d'histoire de vie et le comportement des hôtes (Michalakis 2009). En raison de tous ces effets, certains auteurs comme Combes (2001) n'hésitent pas à dire qu'il est difficile d'imaginer comment serait le monde vivant en l'absence de parasites.

2. Le paludisme

Le paludisme (du latin paludis, «marais»), appelé aussi malaria (de l'italien mal'aria, mauvais air) est une parasitose causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* (étymologiquement, du grec «a» privatif et «Opheles» utile, autrement dit insecte dénué d'utilité), pouvant provoquer des fièvres intermittentes.

Les recherches menées sur l'agent responsable du paludisme ont permis de découvrir environ 172 espèces de *Plasmodium*. Ces espèces sont réparties comme suit: 89 chez les reptiles, 32 chez les oiseaux et 51 chez les mammifères. Parmi ces espèces, 5 sont responsables du paludisme humain : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malaria*, *P. ovale* et *P. knowlesi* (Paul *et al.* 2003). Des cinq espèces de *Plasmodium* humain, *P. falciparum* est responsable de la forme la plus sévère de la maladie et de la plupart des décès dus au paludisme (OMS 2015).

2.1. Le paludisme: un problème majeur de santé publique

Le paludisme demeure un problème de santé publique dans le monde avec 212 millions de cas et 429 000 décès dans le monde par ans, le paludisme prédomine dans la ceinture de la pauvreté du globe(OMS 2016). Cependant, c'est l'Afrique qui est le continent le plus affecté avec près de 90% de cas et 92% de décès par ans (OMS 2016). Au Burkina Faso, le paludisme représente 54% des motifs de consultation, 63% d'hospitalisation et 50% des décès dans les formations sanitaires (PNLP 2014).

Le paludisme occupait jadis plus des 2/3 du globe, mais a été éliminé des Etats Unis d'Amérique (USA), du Canada, d'Europe et de Russie. Il a ressurgi dans les pays tropicaux dans les années 1970 et 1990 à cause notamment d'un manque de surveillance des efforts de contrôle, et surtout d'une augmentation de la résistance des parasites aux antipaludiques, et des moustiques vecteurs aux insecticides (White *et al.* 2014). Depuis lors, l'augmentation du budget alloué à la lutte contre le paludisme a substantiellement réduit le nombre de cas et a redonné un peu d'espoir pour l'élimination et l'éradication (Alonso *et al.* 2011; Feachem *et al.* 2010) notamment grâce à la vulgarisation de l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) et des pulvérisations intra-domiciliaires (PID) sous la bannière des programmes de lutte nationaux des pays endémiques du paludisme.

Aujourd'hui de nombreuses autres pistes prometteuses de lutte sont explorées. Au delà des recherches sur la création et la mise en place d'un vaccin efficace, la communauté scientifique développe de nouvelles stratégies comme par exemple l'utilisation des vaccins

bloquant la transmission (VBT) (Da *et al.* 2013), la dissémination des gènes réfractaires au *Plasmodium* dans la population sauvage de moustique (Ito *et al.* 2002), les bactéries commensales du moustique (*Wolbachia*) (Baldini *et al.* 2014) ou les champignons transgéniques (Kamareddine 2012). Comme pilier de ces approches, une préoccupation importante est de connaître les facteurs qui déterminent la compétence vectorielle des moustiques pour les parasites du paludisme. Autrement dit, pourquoi certains moustiques sont capables de résister à l'infection tandis que d'autres restent sensibles, assurant ainsi la transmission continue de la maladie (Molina-Cruz *et al.* 2015)? Pour aborder cette question, des études génétiques, moléculaires, cellulaires, et physiologiques ont été entreprises au cours des dernières années pour investiguer la réponse immunitaire du moustique vecteur contre le parasite. Ces études ont révélé un certain nombre de mécanismes impliqués dans la résistance ou la limitation du développement du parasite (Cirimotich *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2009). Cependant de nombreuses questions fondamentales demeurent encore sans réponses. Par exemple, comment et dans quelle mesure le parasite est capable de modifier le comportement de son vecteur dans un sens qui augmente la transmission? Comment les facteurs environnementaux (température, nutrition, etc) peuvent influencer le développement du parasite à l'intérieur du moustique? Ces questions sont primordiales car la manière dont l'environnement module l'infection chez le moustique peut conditionner la réussite ou l'échec de ces nouvelles stratégies basées sur le blocage de la transmission.

2.2 Cycle biologique du *Plasmodium*

Le cycle biologique du *Plasmodium* responsable du paludisme humain nécessite deux hôtes: l'homme qui est l'hôte intermédiaire chez qui, se succèdent des phases de réplication asexuée, et l'hôte définitif : l'anophèle femelle chez qui a lieu la reproduction sexuée (Figure 1).

2.2.1 Cycle biologique du *Plasmodium* chez l'Homme

L'inoculation des sporozoïtes de *Plasmodium* par le moustique à l'hôte vertébré lors de la prise d'un repas de sang provoque la libération de ces derniers dans la circulation sanguine qui migrent vers le foie où ils se multiplient dans les hépatocytes. Durant une période de 7 à 12 jours, la multiplication se poursuit jusqu'à éclatement des hépatocytes infectés. Les sporozoïtes, devenus des mérozoïtes, sont libérés dans la circulation sanguine où ils envahissent les hématies et se multiplient de nouveau. Les hématies infectées sont détruites et les parasites libérés vont envahir de nouvelles, répétant ainsi le cycle érythrocytaire. Après

plusieurs cycles, les *Plasmodium* présents dans le sang peuvent donner naissance à des formes sexuées, les gamétocytes.

2.2.2 Cycle biologique du *Plasmodium* chez l'anophèle

Pour poursuivre leur cycle, les gamétocytes doivent être transmis de l'hôte vertébré aux moustiques vecteurs; ainsi si un anophèle pique une personne infectée par les gamétocytes, elle absorbe ces derniers contenus dans le sang. Une fois dans l'estomac du moustique les gamétocytes mâles subissent des transformations initiées par 8 kinéosomes suivis de la formation de 8 flagelles qui quittent le corps globulaire du microgamétoyte activé (Sinden 1998). Ce phénomène a été nommé exflagellation (Robert & Boudin, 2003). Après l'exflagellation les gamètes mâles et femelles vont fusionner (fécondation) et donner un œuf mobile (ookinète) au cours des premières heures qui suivent le repas de sang infectieux. Cette forme mobile traverse la paroi stomacale du moustique puis se fixe sur sa face externe et se transforme en oocyste 24 à 36h post-infection. A l'intérieur de chaque oocyste se déroule des divisions mitotiques aboutissant à la formation de milliers de sporozoïtes (Sinden 2009). Les oocystes se fissent, libérant ainsi les sporozoïtes qui vont migrer dans les glandes salivaires en traversant l'hémolymphe 9 à 15 jours post-infection. Enfin, une fois dans les glandes salivaires, les sporozoïtes pourront être transmis par le moustique à un hôte vertébré au cours de son prochain repas de sang.

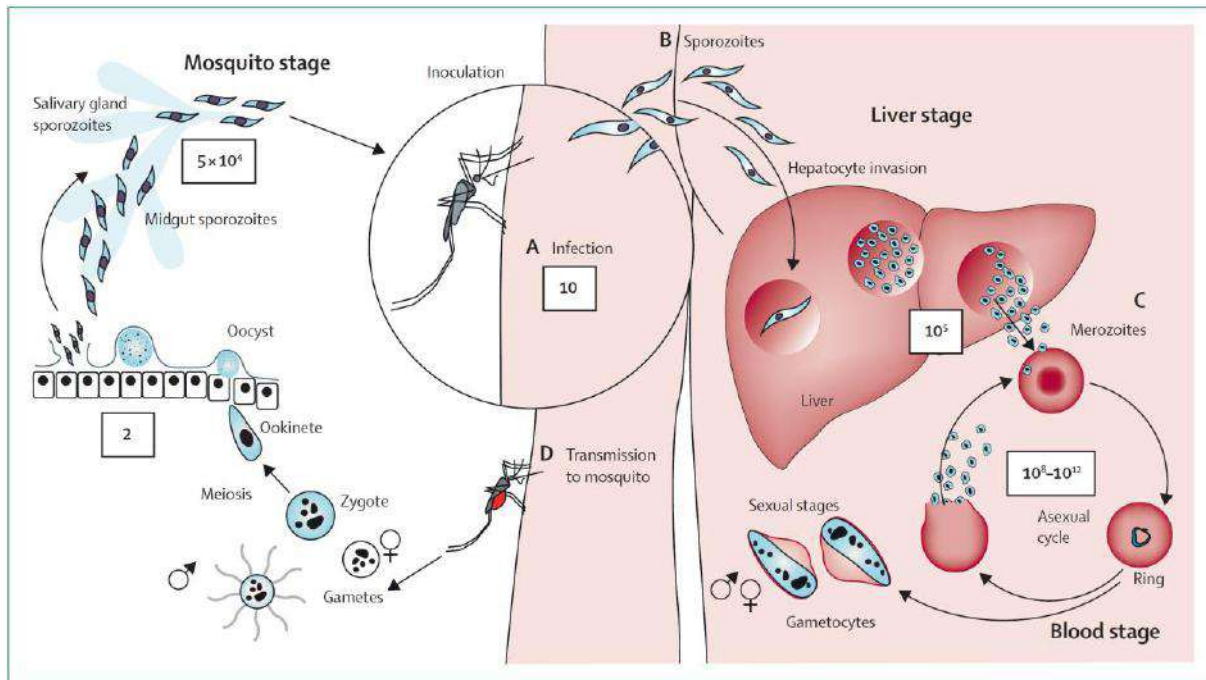


Figure 1: Cycle de vie du *Plasmodium falciparum* chez l'Homme et le moustique vecteur. (White et al. 2014)

3. Biologie du moustique

La biologie du moustique adulte est définie par deux phases principales: l'alimentation et la reproduction qui, chez la femelle, est caractérisée par leur dispersion à la recherche successive de l'hôte vertébré, du site de repos et du gîte de ponte (Figure 2). L'ensemble de ces comportements définit ce qu'on appelle le «cycle gonotrophique» qui ne concerne que la femelle car le mâle se nourrit exclusivement de jus sucré et n'est pas hématophage (Figure 3).

3.1 Emergence et accouplement

Les premiers jours de la vie imaginaire sont caractérisés par le durcissement de la cuticule, la prise de repas sucré et la maturation des organes de reproduction sexuels. Une période de 24h est nécessaire à la femelle pour que ses pièces buccales soient assez rigides pour pouvoir percer l'épiderme des hôtes vertébrés et prendre un repas de sang. Chez les anophèles, seule la femelle est hématophage, et c'est au cours d'un repas de sang qu'elle peut ingérer et/ou transmettre le parasite responsable du paludisme. Le repas de jus sucré concerne les deux sexes de moustiques et de tout âge (Foster 1995). Le sucre est utilisé comme source d'énergie nécessaire pour le vol (Manda et al. 2007a; Foster 1995). Chez les femelles, il peut stimuler le début de développement des ovarioles. Le repas de jus sucré est pris par la femelle durant toute sa vie et à n'importe quel instant de son cycle biologique en fonction de ses besoins. De

plus, des études montrent que les femelles sont capables de localiser les sources de nectars de plantes et de présenter des préférences parmi différentes espèces de plantes (Manda et al. 2007b). Chez la femelle l'accouplement intervient majoritairement entre le 2ème et 3ème jour de sa vie imaginaire, avant ou après le premier repas de sang (Figure 3).

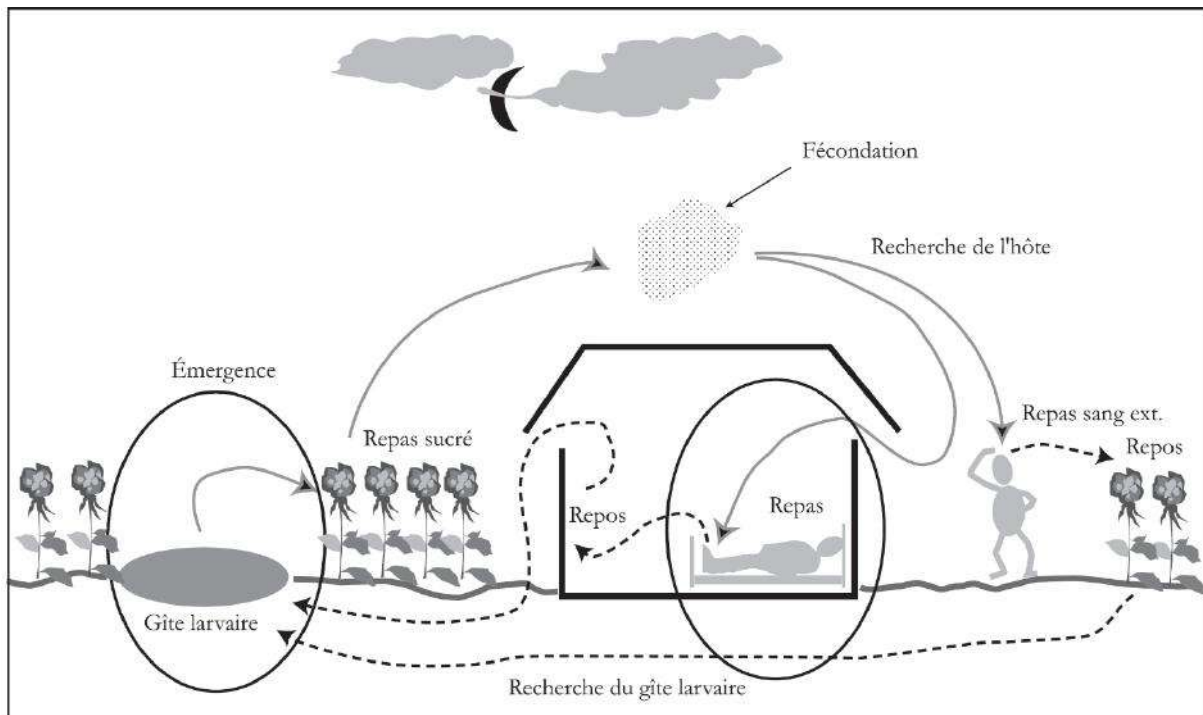


Figure 2: Les différentes phases du cycle biologique de la femelle anophèle, modifié selon *International Water Management Institute*

La maturité sexuelle des mâles se fait autour du 3ème jour de leur vie imaginaire après l'hémirotation de 180° de l'appareil génital et de l'extrémité abdominale. L'accouplement est souvent précédé de la formation des essaims par les mâles à quelques mètres du sol et qui fait aujourd'hui l'objet d'un nombre croissant d'études (Charlwood et al. 2002; Diabate et al. 2003, 2006; Dabiré et al. 2014). Les essaims se forment généralement au crépuscule, mais parfois à l'aube (Charlwood et al. 2002; Diabaté et al. 2006), à des heures très répétitives, et à des points d'essaimages constants du jour au lendemain, d'année en année, si et seulement si il n'y a pas de perturbations à ces endroits. La taille de ces essaims peut varier de quelques dizaines à plusieurs milliers de mâles. Il semble que les stimuli qui attirent la femelle dans un essaim seraient d'ordre optique, olfactif (phéromones) et auditif tandis qu'à plus courte distance le mâle serait attiré par la fréquence des vibrations des ailes de la femelle (Clements, 1999). Les mâles des différentes espèces auraient des fréquences de battement d'ailes caractéristiques (Pennetier et al. 2010) et ces essaims réagiraient à plusieurs sons (Nachtigall

1974). La copulation peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre lorsque le couple (la femelle accrochée par les claspers du mâle) est au sol. Cette copulation est de courte durée (quelques secondes) et le mâle rejoint ensuite l'essaim dans l'attente d'autres partenaires. La plupart du temps la femelle s'accouple une fois au cours de sa vie. Mais quelques rares cas d'accouplements multiples ont été observés (Tripet *et al.* 2003) par l'analyse de l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) des spermatozoïdes de la spermathèque de femelles sauvages d'*An. gambiae*. Cependant, il est généralement admis que seul le premier accouplement serait efficace en termes de transfert de spermatozoïdes dans la spermathèque (Dabire *et al.* 2013; Sawadogo *et al.* 2014). Chez la femelle il existe un bouchon appelé « spermatophore » qui pourrait provenir à la fois de la sécrétion des glandes accessoires du mâle et des glandes génitales de la femelle et ce dernier peut se dissoudre quelques heures si bien que sa présence témoigne d'une copulation récente (Baldini *et al.* 2012; Rogers *et al.* 2009). La copulation peut avoir lieu avant ou après le premier repas de sang (Bregues & Coz 1973). Elle ne doit pas être confondue avec la fécondation des ovarioles par les spermatozoïdes stockés dans la spermathèque qui a lieu lors de la ponte.

3.2 Cycle gonotrophique

Le cycle gonotrophique (ou encore, trophogonique pour certains auteurs), est la succession des phénomènes physiologiques et comportementaux qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs (Figure 3). Ce cycle peut être découpé en 3 phases:

-Phase1: la recherche de l'hôte par la femelle à jeun pour son repas de sang qui aboutit à la prise du repas de sang

-Phase2: l'ingestion et la digestion du repas de sang accompagnées de la maturation des follicules ovariens « concordance gonotrophique ». En région tropicale, cette concordance du processus gonotrophique (alimentation et digestion sanguines suivies de la maturation ovarienne) est beaucoup plus fréquente chez les femelles pares, mais 5% de femelles présenteraient une discordance gonotrophique avec la nécessité de plusieurs repas pour que le développement des follicules soit complet (Scott & Takken 2012).

-Phase3: la recherche du gîte larvaire idéal de la femelle gravide en fonction de l'espèce et l'oviposition

Les phases 1 et 3 correspondent à une période d'intense activité pour les femelles, contrairement à la phase 2 qui se déroule au repos. La durée de chacune de ces 3 phases est

influencée par la disponibilité des hôtes et des lieux de ponte, les conditions climatiques (température, humidité relative, photopériode) et micro-climatiques (intérieur/extérieur des maisons, etc.), les comportements des anophèles, ainsi que des facteurs intrinsèques d'ordre génétique qui restent à élucider.

Le cycle gonotrophique est l'élément de base de la biologie des femelles d'anophèles; il incorpore la phase de maturation des ovaires, consécutive à l'alimentation sanguine. Il rythme ainsi la fréquence des contacts entre le vecteur et l'hôte et il revêt donc une importance épidémiologique considérable en conditionnant le passage éventuel du parasite de l'un à l'autre.

Le cycle gonotrophique est de durée différente chez les femelles qui n'ont pas encore pondu (nullipares) ou qui ont déjà effectué au moins un épisode d'oviposition (pares). En outre, entre deux cycles gonotrophiques, la femelle est capable d'aller prendre un repas de jus sucré.

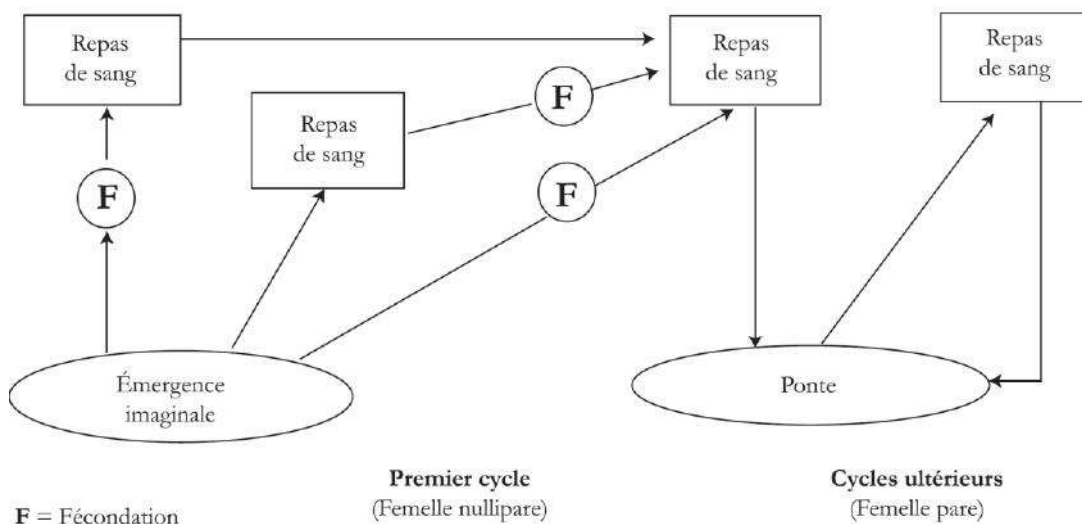


Figure 3:Schéma des cycles gonotrophiques des anophèles modifié d'après *International Water Management Institute*

4. La transmission du paludisme par les anophèles vecteurs

4.1 Les vecteurs du paludisme sur le continent Africain

Les *Anophèles* vecteurs du paludisme sur le continent Africain appartiennent au

-Règne: *Animalia*,

-Sous règne: *Eu-Metazoa*,

- Embranchement (Phylum): *Arthropoda*,

-Sous embranchement (Sous phylum): *Euarthropodes Antennata* ou *Mandibulata*

- Classe: *Insecta*,
- Sous classe: *Pterygota*,
- Section: *Oligoneoptera*
- Super ordre: *Mecopteroidea*
- Ordre: *Diptera*,
- Sous ordre: *Nematocera*,
- Famille: *Culicinae*,
- Sous famille: *Anophelinae*
- Genre: *Anopheles*, classification d'après Rodhain & Perez 1985 actualisée.

De par sa forte implication dans la transmission du paludisme, ce genre est l'un des plus importants en termes de santé publique. Sur 465 espèces d'anophèles décrites, environ 70 sont capables de transmettre des *Plasmodium* humain (Sinka *et al.* 2012).

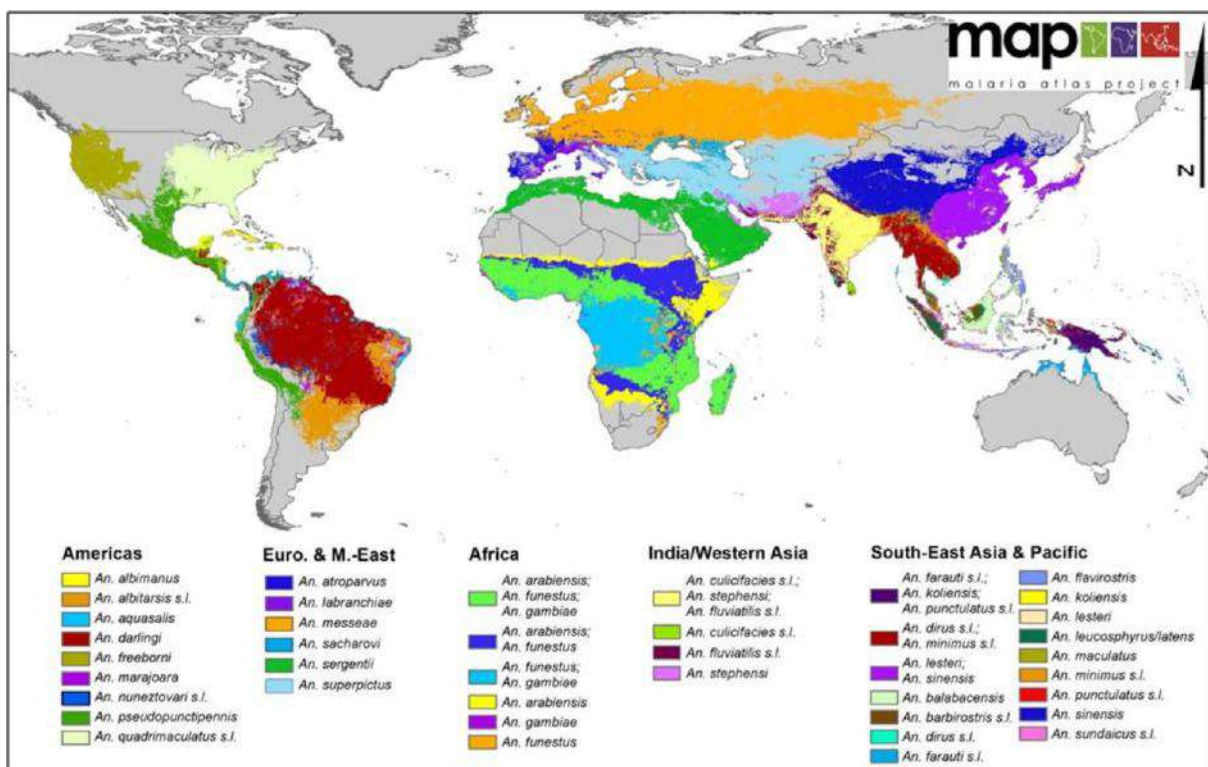


Figure 4: Une carte mondiale des espèces dominantes de vecteurs du paludisme d'après Sinka *et al.* 2012

En Afrique les vecteurs majeurs impliqués dans la transmission du paludisme sont: *Anopheles gambiae* s.l., *Anopheles funestus*, *Anopheles nili*, *Anopheles moucheti*, *Anopheles melas* et *Anopheles merus* (Sinka *et al.* 2012, 2010).

Certaines espèces plutôt secondaires ou locales sont rencontrées surtout sur le littoral et le milieu insulaire tels que *An. melas* sur les côtes lagunaires d’Afrique de l’Ouest, *An. merus* sur les côtes Est du Sud de l’Afrique et l’île de Madagascar auxquels s’ajoute *An. mascarensis* sur l’île de Madagascar (Le Goff et al. 2003; Ravoahangimalala et al. 2003; Dabiré et al. 2007).

En Afrique Sub-saharienne, les vecteurs majeurs du paludisme appartiennent au complexe *Anopheles gambiae s.l* (Sinka et al. 2010). Ce complexe a longtemps été considéré comme un groupe de cinq espèces jumelles morphologiquement identiques incluant *An. gambiae s.s* et *An. arabiensis*. Des analyses cytogénétiques portant sur le polymorphisme des inversions chromosomiques ont montré cinq formes chromosomiques dénommées Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savana chez *An. gambiae s.s* en Afrique sub-saharienne (Coluzzi et al. 1985; Petrarca et al. 1986). Des analyses moléculaires ont permis de regrouper ces cinq formes moléculaires en deux formes moléculaires M et S (Favia et al. 2001). Ces deux formes s’hybrident au laboratoire (Diabaté et al. 2007) mais restent rares dans la population naturelle (Wondji et al. 2005). Cependant, des travaux récents ont montré une spéciation entre ces deux formes moléculaires et les ont érigées au rang d’espèces *An. coluzzii* (forme moléculaire M) et *An. gambiae* (forme moléculaire S) (Coetzee et al. 2013).

Au Burkina Faso, les cytotypes Mopti et Savana sont rencontrées (Costantini et al. 1996). Le cytotype Mopti correspond à la forme moléculaire M et le cytotype Savanna correspond à la forme moléculaire S. Au Burkina Faso, quatre vecteurs majeurs sont responsables de la transmission du paludisme humain: *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus* (Robert et al. 1985; Diabate et al. 2003).

4.2. La capacité vectorielle

L’indice qui permet d’estimer l’intensité de la transmission des *Plasmodium* par les anophèles est appelée capacité vectorielle (C). Elle dépend de l’abondance des vecteurs, d’une longévité suffisante, et des contacts étroits entre les hôtes vertébrés et la population de moustiques vecteurs. Plus précisément, la capacité vectorielle d’une population de vecteur donnée peut être décrite par la formule :
$$C = \frac{ma^2VP^n}{-\ln(P)}$$

(Garrett-Jones & Shidrawi, 1969; MacDonald 1956; Smith et al. 2011) où m représente la densité de vecteur par rapport à la densité d’hôtes vertébrés; a le taux de pique; V la compétence vectorielle; P la survie du vecteur; et n la Période d’ Incubation Extrinsèque

(PIE). Autrement dit, la capacité vectorielle représente le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'un individu peut générer, par l'intermédiaire de la population vectrice, par unité de temps, et constitue donc un indicateur du risque de transmission de la maladie. Un homme impaludé, infectant, est piqué chaque jour par ma anophèles; certaines de ces femelles vont survivre, devenir infectées et infectantes et vivre un certain nombre de jours au-delà de l'âge épidémiologiquement dangereux (n) et transmettre le parasite. Leur espérance de vie infectante est p^n/lnp ; pendant cette période, les femelles survivantes piquent quotidiennement des sujets humains. Ces piqûres infectantes représentent donc autant de nouvelles infections distribuées dans la communauté humaine par la population anophélienne considérée. Un des paramètres clé de la capacité vectorielle est la compétence vectorielle: quand la compétence d'une population de moustique est égale à zéro, il n'y a aucune transmission.

5. La compétence vectorielle

La compétence vectorielle peut être définie comme la capacité du moustique à supporter le développement et la transmission du parasite. Il s'agit d'une estimation combinée de l'infectivité du parasite (la capacité du parasite à se développer avec succès dans le moustique) et la susceptibilité du vecteur à cette infection. Elle englobe ainsi les mécanismes de résistance utilisés par le moustique pour combattre le parasite et les mécanismes d'infection mis en place par le parasite pour contourner les défenses de l'hôte. Il s'agit ainsi d'un trait partagé entre le moustique et le parasite et qui est le résultat de la coévolution (Molina-Cruz *et al.* 2015). La compétence du moustique pour les *Plasmodium* est donc un trait phénotypique complexe déterminé par les facteurs génétiques de l'hôte et du parasite, les facteurs environnementaux et l'interaction entre ces différents facteurs.

D'intenses efforts ont été menés pour comprendre les déterminants génétiques de la compétence dans le but de trouver des solutions efficaces pour bloquer la transmission tels que la production des moustiques réfractaires (Ito *et al.* 2002) (i.e avec une compétence égale à zéro) ou la création d'un vaccin bloquant la transmission (Da *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015). En conséquence, les bases moléculaires et génétiques de la compétence du moustique au parasite responsable du paludisme ont été relativement bien caractérisées pour un certain nombre d'associations moustique-*Plasmodium*. Cependant, les déterminants environnementaux de la compétence vectorielle sont moins bien décrits.

5.1. Les déterminants génétiques et moléculaires de la compétence des moustiques pour les parasites *Plasmodium*.

La transmission de l'agent pathogène du paludisme aux être humains dépend de la compétence de certains moustiques *Anopheles* vis-à-vis du *Plasmodium*. Cette compétence à transmettre le *Plasmodium* est très spécifique et dépend fortement des bases génétiques (Molina-Cruz *et al.* 2015).

5.1.1. Les facteurs génétiques du moustique

Il existe une importante variation de compétence parmi les différentes espèces de moustiques vecteurs. Par exemple, *An. gambiae* affiche une bonne compétence à la souche de *P. falciparum* NF54 tandis qu'*An. albimanus* y est fortement réfractaire (Baton & Ranford-cartwright, 2012; Grieco *et al.* 2005). Des variations similaires de compatibilité ont également été rapportées entre *P. vivax* et ses différentes espèces de vecteurs (Joy *et al.* 2008; Li *et al.* 2001). Ces variations peuvent également s'illustrer au niveau intra-spécifique. Ainsi, l'espèce de moustique *An. gambiae* affiche une vaste gamme de compétences pour un génotype de parasite donné (Collins *et al.* 1986) et, au sein de cette espèce, des souches résistantes à *P. falciparum* ont pu être sélectionnées. Ces variations de compétence sont dues à des variations de la réponse immunitaire. En particulier, en réponse à l'infection, le système immunitaire se met en marche à travers l'expression de certains gènes de l'immunité (Blandin *et al.* 2008; Cirimotich *et al.* 2010). Par exemple, certains travaux ont montré que les gènes Rel1 et Rel2 chez *An. gambiae* jouent un rôle particulièrement important dans le contrôle de l'infection avec le parasite *P. berghei*. De plus, ces études ont montré que Rel2 contrôle la résistance d'*An. gambiae* au *P. falciparum* responsable du paludisme humain, bien que le Rel1 réduit le niveau de l'infection (Garver *et al.* 2009).

5.1.2 Les facteurs génétiques du parasite.

Le génome de *P. falciparum* contient approximativement 5400 gènes (Gardner *et al.* 2002). Parmi ces gènes, certains peuvent être d'un intérêt vital pour le parasite pour son développement à l'intérieur du moustique. Dans le but de mieux comprendre ces mécanismes qui régissent la survie du parasite chez le moustique, certains travaux ont évalué la survie de deux lignées différentes de *P. falciparum* : la souche 7G8 provenant du Brésil, et la souche NF54 *P. falciparum* d'origine Africaine qui a une meilleure survie (Collins *et al.* 1986). Au cours de ces travaux, une souche de *An. gambiae* donnée a été exposée aux souches de

parasites 7G8 et NF54 et il a été observé que la NF54 survivait mieux que la 7G8 (Molina-Cruz *et al.* 2012). Ce qui suggère que certains *P. falciparum* d'origine Africaine utiliseraient des mécanismes qui leur permettraient de désactiver le système immunitaire du moustique. Par exemple, il a été montré que le gène Pfs47 du parasite *P. falciparum* permettait au parasite d'infecter le moustique sans activer son système immunitaire. En d'autres termes, ce gène serait essentiel à la survie de *P. falciparum* chez *An. gambiae*, vecteur majeur du paludisme en Afrique (Molina-Cruz *et al.* 2013). Cependant, d'autres gènes non élucidés jusqu'à nos jours pourraient jouer le même rôle que le Pfs47 voire plus, d'où la nécessité d'explorer davantage ce domaine en le combinant à d'autres aspects naturels pouvant avoir des effets négatifs sur ces mécanismes dans une perspective de lutte contre le paludisme.

5.1.3 Les interactions génotype du moustique génotype du parasite

Bien que les études précédentes aient généré d'importantes connaissances sur les mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents à la compétence vectorielle des moustiques pour les parasites du paludisme, ils ont, pour la plupart, utilisé au laboratoire des associations hôte-parasite non naturelles, qui peuvent être des approximations lointaines de ce qui se passe dans les écosystèmes naturels (Cohuet *et al.* 2006; Lefèvre *et al.* 2013; Tripet *et al.* 2008). Mais, force est de constater que dans la nature, plusieurs génotypes différents de parasites et de moustiques interagissent pour déterminer la compétence. En d'autres termes, au niveau intra-populationnel (au sein d'une population donnée de moustiques), il n'y pas un génotype de parasite qui se développe de la même manière chez tous les génotypes de moustiques vecteurs. Inversement, il n'y a pas un génotype de moustique qui résiste aussi bien à tous les génotypes de parasites (Lambrechts *et al.* 2005).

Une étude a montré que les isolats de *P. falciparum* provenant d'Afrique, d'Asie et d'Amérique ont une faible compatibilité avec les vecteurs issus d'un continent différent. En plus, au cours de cette étude il a été identifié 42 haplo-types de Pfs47 de *P. falciparum* qui permet au parasite d'être invisible au système immunitaire du moustique. Cependant, le remplacement du gène Pfs47 de NF54 du *P. falciparum* avec différent haplotype changerait énormément la compatibilité des différents vecteurs (Molina-Cruz *et al.* 2015). Ces travaux suggèrent que la susceptibilité des moustiques au *P. falciparum* serait due à une interaction coévolutive entre les génotypes de l'hôte (G_H) et le génotype du parasite (G_P) en d'autres termes $G_H \times G_P$.

Au niveau inter-populationnel (parmi différentes populations de moustiques vecteurs), des travaux ont comparé la compétence d'*An. coluzzii* du Cameroun et du Burkina Faso pour des isolats naturels de *P. falciparum* du Cameroun et du Burkina Faso. Les résultats ont montré une compétence plus faible chez les associations sympatriques (i.e. moustiques du Burkina Faso avec parasites du Burkina Faso et moustiques du Cameroun avec parasites du Cameroun) que chez les associations allopatriques (i.e. moustiques du Burkina Faso avec parasites du Cameroun et moustiques du Cameroun avec parasites du Burkina Faso) (Harris *et al.* 2012).

5.2. Les déterminants environnementaux de la compétence des moustiques pour les parasites *Plasmodium*

Outre, les effets des facteurs génétiques sur la compétence du moustique, la croissance rapide du domaine de l'immuno-écologie (Schulenburg *et al.* 2009) démontre que les facteurs abiotiques (humidité, température et les pesticides), les facteurs biotiques (la disponibilité et la qualité des sources nutritives et la prédation chez les larves) et l'environnement maternel du moustique peuvent également jouer un rôle critique dans la modulation des interactions moustique-*Plasmodium* (Lefèvre *et al.* 2013; Tripet *et al.* 2008), et donc sur la compétence vectorielle du moustique (Figure 5).

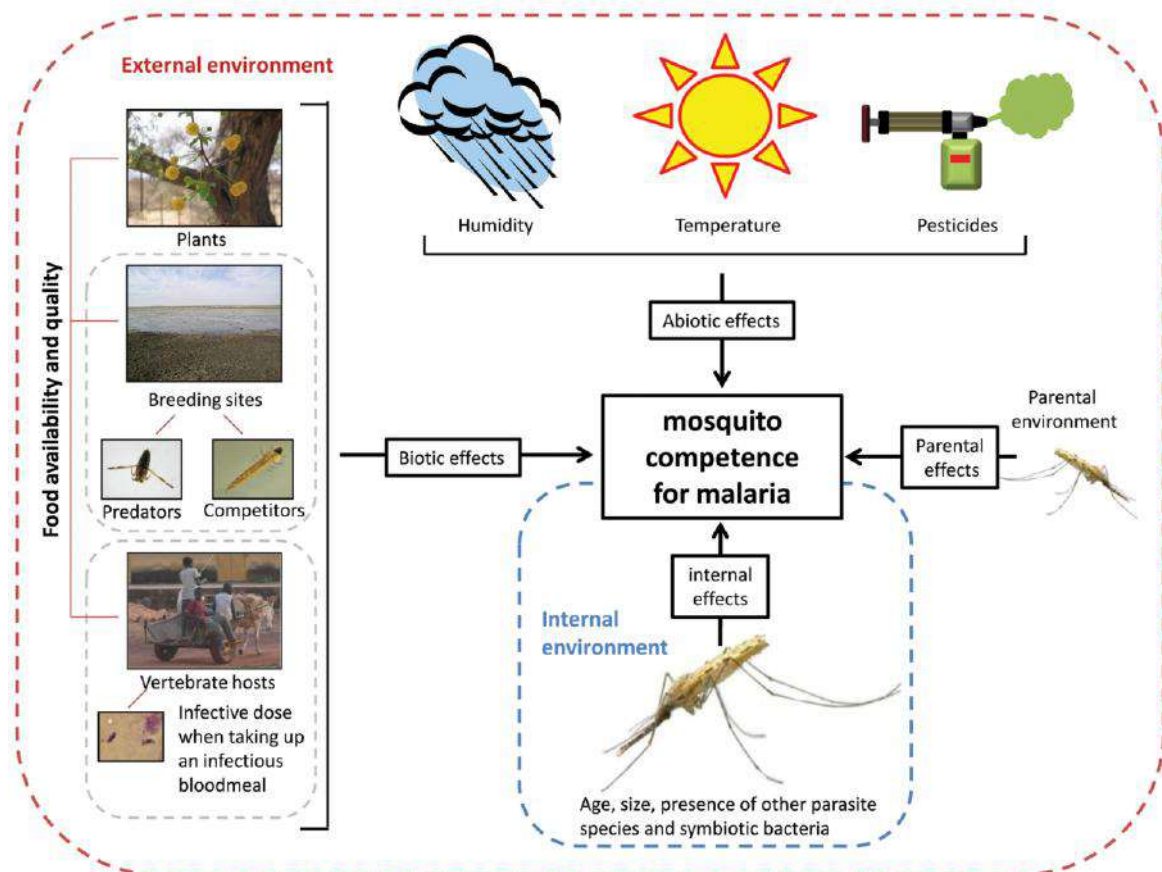


Figure 5: Diversité par laquelle les facteurs non-génétiques peuvent influencer la compétence du moustique vecteur pour *Plasmodium*. Les effets nets de ces facteurs sur la compétence vectorielle dépendra de la manière dont ils affectent la capacité du parasite à s'établir et à se développer dans l'insecte hôte et la capacité du moustique à résister et/ ou à tolérer l'infection (Lefèvre *et al.* 2013).

5.2.1 La température

Les moustiques sont de petites tailles (entre 3 à 40 mm mais ne dépassent que très rarement les 10 mm). Etant ectothermes, de nombreux traits d'histoire de vie tels que le développement larvaire, la survie des adultes et leur réponse immunitaire dépendent de la température ambiante (Lyons *et al.* 2012; Suwanchaichinda & Paskewitz 1998). De même, le développement de beaucoup de pathogènes chez le moustique est connu pour être sensible à la température (Murdock *et al.* 2012). En particulier, les premières recherches sur la température ont montré que le développement du cycle sporogonique du *Plasmodium* se situe entre 16°C et 35°C (Boyd 1949, 1932; Detinova 1962; Grassi 1901). Ces premières études ont aussi montré que les parasites se développent plus rapidement aux températures élevées, suggérant ainsi que la transmission du paludisme sera plus intense dans des conditions plus chaudes (Boyd 1949; Detinova 1962; Vanderberg & Yoeli, 1966). Cependant, la compétence

diminue autour de 30°C au sein de l'association *An. gambiae*-*P. falciparum* (Okech *et al.* 2004), 21-24°C pour *An. quadrimaculatus*/*An. stephensi*-*P. berghei* (Vanderberg & Yoeli, 1966) et 24–26°C pour *An. stephensi*-*P. yoelli* (Paaijmans *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent que la transmission du paludisme pourrait chuter quand la température augmente. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec beaucoup de précautions car les moustiques ne subissent pas un régime de température constant dans la nature. Paaijmans *et al.* 2010 par exemple, ont démontré que la compétence d'*An. stephensi* pour *P. chabaudi* peut être influencée de façon complexe par des régimes de températures fluctuants. Comparé à une température constante équivalente, la compétence augmente quand les fluctuations du jour tournent autour des basses températures moyennes, mais diminue lorsque ces fluctuations tournent autour des températures moyennes les plus élevées (Paaijmans *et al.* 2010). En outre, les moustiques, à travers leur thermorégulation comportementale, peuvent choisir les températures et microclimats appropriés à leur survie et à leur développement. Enfin, les estimations extérieures de la température standard ambiante utilisée dans les expériences décrites ci-dessus peuvent refléter de façon erronée les conditions réelles rencontrées par les moustiques et les parasites dans la nature (Paaijmans & Thomas, 2011).

5.2.2. La co-infection

Récemment, on assiste à un intérêt croissant sur le rôle de la communauté bactérienne de l'estomac des moustiques sur la compétence vectorielle (Cirimotich *et al.*, 2011). L'abondance et la diversité des bactéries paraissent en effet jouer un rôle important sur la compétence, avec des densités et certains isolats de bactéries spécifiques associés à l'inhibition du développement des premiers stades du *Plasmodium* (Dong *et al.* 2009; Meister *et al.* 2009). Cette résistance au *Plasmodium* que confère la flore bactérienne à son insecte hôte a été mise en évidence par plusieurs études (Van-Tol & Dimopoulos, 2016). Par exemple, Cirimotich *et al.* 2011, ont montré que la présence d'une bactérie *Enterobacter* dans l'estomac des moustiques leur conférait une réfraction totale à l'infection par *P. falciparum*.

En plus du microbiote, les moustiques peuvent héberger une vaste gamme d'autres organismes infectieux qui peuvent avoir un impact sur le développement du *Plasmodium*. Par exemple, des études récentes montrent que les microsporidies, les champignons et les filaires peuvent réduire de façon concomitante les infections aux *Plasmodium* (Aliota *et al.* 2011; Bargielowski & Koella, 2009; Blanford *et al.* 2005). Des études récentes, ont montré qu'il existe une corrélation négative entre la présence des parasites du genre *Plasmodium* et la

bactérie *Wolbachia* chez *An. Coluzzi* (Shaw *et al.* 2016). La co-infection par plusieurs espèces de *Plasmodium* a aussi été décrite (Imwong *et al.* 2011), mais les conséquences sur la compétence vectorielle sont en grande partie inconnues. Dans une expérience, l'infection simultanée avec deux espèces de parasites de *Plasmodium* d'oiseaux *P. gallinaceum* et *P. juxtannucleare* a abouti à une diminution de la compétence pour *P. gallinaceum*, cela est probablement due à une compétition interspécifique négative au cours de la fertilisation (Paul *et al.* 2002).

Les infections consécutives, intervenant lorsqu'un moustique déjà infecté est exposé à un deuxième repas de sang infectieux, peuvent être fréquentes dans les conditions naturelles et peuvent avoir un impact sur la compétence vectorielle. Une étude a montré une réduction de la compétence chez les moustiques ayant reçu une deuxième infection et hébergeant des bactéries dans leur estomac, suggérant ainsi, que le système immunitaire des moustiques a été stimulé par une première infection (Rodrigues *et al.* 2010). Cependant, d'autres travaux ont montré que la deuxième infection avec les mêmes espèces de *Plasmodium* peut augmenter la compétence des moustiques (Pollitt *et al.* 2015).

5.2.3. Les effets maternels

Les effets maternels peuvent avoir un rôle important sur l'issue de l'infection chez les vecteurs. Chez les insectes, plusieurs travaux ont montré que des effets trans-générationnels peuvent conduire à une augmentation de la résistance de la progéniture au travers du transfert dans les œufs de facteurs immuns de protection (Hasselquist & Nilsson, 2009; Tidbury *et al.* 2011). Par exemple, l'infection des parents avec les bactéries microsporidies a diminué la compétence chez la descendance (i.e 70% de la descendance des mères sans microsporidies ont été infectés avec *P. berghei* contre 42% des femelles infectées avec *Vavraia culicis* (Lorenz & Koella, 2011). Une autre étude a montré que la prévalence et l'intensité d'infection des femelles de moustiques issues d'une génération parentale infectée à *P. relictum* ne différaient pas de celles de mères non-infectées (Pigeault *et al.* 2015).

De façon alternative, les individus infectés peuvent transférer le coût de l'infection à leur descendance. Par exemple, les femelles de moustiques issues de mères infectées à *P. falciparum* et exposées au sang infectieux contenant la même espèce de *Plasmodium* avaient légèrement plus de parasites que les individus issus de mères contrôles non-infectées. Ceci pourrait s'expliquer par une forte allocation des mères infectées à la défense immunitaire

compromettant ainsi sa descendance en produisant une progéniture plus petite et plus susceptible à l'infection (Vantaux *et al.* 2014).

5.2.4 La prédation

Les interactions entre espèces comme la compétition et la prédation peuvent influencer l'issue de l'infection avec les parasites. Par exemple, la présence de prédateurs dans l'environnement peut inciter l'expression de comportements de défenses chez les proies, pouvant aboutir à un changement de susceptibilité aux parasites (Decaestecker *et al.* 2002; Yin *et al.*, 2011). La seule étude qui ait exploré l'impact de la prédation sur l'interaction moustique-*Plasmodium*, indique que l'exposition de larves d'*An. coluzzii* à un prédateur aquatique, les notonectes, n'avait aucune conséquence sur la compétence des adultes à *P. falciparum* (Roux *et al.* 2016).

5.2.5 Les facteurs intrinsèques des moustiques

En conditions naturelles, les populations de moustiques sont constituées d'individus qui diffèrent non seulement par leur bagage génétique, mais également à l'égard de facteurs tels que l'âge, le statut de reproduction, et la taille du corps. Cette hétérogénéité peut avoir des conséquences importantes sur la compétence vectorielle. Par exemple, le système immunitaire de l'hôte peut se détériorer avec l'âge, ce qui entraîne une susceptibilité accrue aux agents pathogènes. Cette immunosénescence a été décrite chez plusieurs insectes dont la drosophile, les criquets, les mouches scorpions, et le moustique *Ae. aegypti* (Hillyer *et al.* 2005; Stanley 2012). C'est le cas des vecteurs du paludisme, pour lesquels une étude a suggéré que la capacité d'*An. gambiae* à mélaniser des entités étrangères (billes de sephadex) a été réduite chez les vieilles femelles (Chun *et al.* 1995). Cependant, d'autres résultats n'ont révélé aucun effet de l'âge sur la compétence d'*An. gambiae* pour les champignons (Mnyone *et al.* 2011) ni pour *P. falciparum* (Okech *et al.* 2004). Enfin, une étude a montré que les moustiques *Culex pipiens* âgés de 7 jours, hébergeant *Plasmodium relictum* étaient moins compétents que ceux âgés de 17 jours, suggérant un effet positif de l'âge sur la résistance. Cependant cette différence disparaissait dès lors qu'un second repas de sang était donné aux moustiques âgés de 17 jours.

Malgré une grande variation de la taille du corps au sein des populations de moustiques, les conséquences sur la compétence vectorielle sont pas bien documentées. En général, il est souvent avancé que les hôtes de grande taille hébergent moins de parasites que

les petits hôtes, parce qu'ils peuvent investir davantage d'énergie dans les défenses immunitaires (Fellous & Lazzaro, 2010). Ceci étant, les grands hôtes disposant de plus de ressources nutritionnelles, pourraient également permettre un meilleur développement des parasites (Bize *et al.* 2008). Par exemple, une étude a observé que la mélanisation d'objets étrangers (billes de sephadex) était plus forte dans les grandes que dans les petites femelles (Suwanchaichinda & Paskewitz, 1998), tandis que d'autres études ont montré que les individus plus petits avaient moins d'oocystes que les individus de grande taille, probablement due à la différence de la taille du repas de sang infectieux (Kitthawee *et al.* 1990; Lyimo & Koella, 1992).

5.2.6 La nutrition

La quantité et la qualité des nutriments ingérés par les hôtes peuvent jouer un rôle prépondérant sur l'immunité et l'infection (Cory & Hoover 2006). L'influence du régime alimentaire des hôtes sur les interactions avec leurs parasites peut intervenir au travers d'effets directs, par exemple la présence de métabolites secondaires toxiques pour les parasites (Lefèvre *et al.* 2010) ou d'effets indirects de la valeur énergétique nutritionnelle agissant sur l'immunité de l'hôte (Alaux *et al.* 2010).

Au sein du système moustique –*Plasmodium*, plusieurs études ont montré que la nutrition des vecteurs peut influencer leur compétence. Ceci étant, ces études se sont concentrées sur des variations quantitatives de nourriture et en utilisant des sources artificielles (par exemple des solutions de glucose plus ou moins concentrée) (Ferguson & Read 2002a; Lambrechts *et al.* 2006).

Les femelles hématophages des moustiques utilisent généralement certaines protéines issues de leur repas de sang pour la maturation des œufs, mais de manière moins connue, elles utilisent également le nectar pour leurs besoins énergétiques (Foster 1995; Yuval *et al.* 1994) et pour assurer leur survie et leur fécondité (Manda *et al.* 2007b). L'abondance des sources d'énergie peut influencer la capacité vectorielle des moustiques (Gary & Foster, 2001; Okech *et al.* 2003). Bien que, la disponibilité du nectar dans l'environnement augmente la longévité des moustiques (augmentant ainsi la capacité vectorielle (Stone *et al.* 2012), elle peut aussi provoquer la satiété des femelles à l'égard de leur repas de sang (diminuant ainsi le contact avec les hôtes vertébrés et donc la capacité vectorielle) (Foster 1995; Gary & Foster 2001, 2004). Enfin quelques études ont montré que les moustiques femelles sont capables de

localiser les sources de nectar de plantes et de présenter des préférences parmi différentes espèces de plantes (Manda et al. 2007a; Nyasembe et al. 2014).

Les effets des ressources nutritives sur les interactions hôtes-parasites peuvent être gouvernés par certaines substances (métabolites secondaires toxiques). C'est le cas des études effectuées sur les insectes utilisant le nectar comme principale source de nourriture (Richardson et al. 2015). Cependant, les sécrétions des plantes utilisées comme sources de nectars ne contiennent pas exclusivement du nectar et des acides aminés (Baker & Baker, 1973), mais aussi d'autres composés secondaires. L'ingestion de telles substances toxiques d'origine exogène, pour la défense, a été démontrée dans plusieurs interactions plantes-insectes (Rothschild 1972). Par exemple, certains travaux effectués sur les *Phlebotomus papatasi* vecteur de *Leishmania major*, montrent que les lectines et toxines issues des plantes à partir desquelles le vecteur se nourrit, peuvent avoir un effet direct sur *L. major* (Jacobson & Schlein, 1999).

6. Conséquences évolutives et épidémiologiques

En plus d'augmenter nos connaissances sur les déterminants de la compétence vectorielle, l'étude des facteurs environnementaux sur les interactions hôte-parasite peut aussi fournir des informations précieuses quant à l'automédication des hôtes et la manipulation comportementale des hôtes par leurs parasites.

Les parasites ont souvent des effets frappants sur le comportement de leurs hôtes. Ces changements de comportement peuvent être classés comme des adaptations de la part de l'hôte ou du parasite, ou comme des sous-produits de l'infection n'ayant aucune valeur adaptative pour les deux partenaires. Alors que la manipulation parasitaire décrit les cas pour lesquels l'altération du comportement de l'hôte est bénéfique pour le parasite (Lefèvre et al. 2009a), l'auto-médication est une réponse adaptative de l'hôte à l'infection, servant, soit à éliminer le parasite, soit à atténuer ses effets négatifs (Hart 2005; Lozano 1998).

6.1 Manipulation parasitaire

Plusieurs parasites peuvent augmenter leur transmission en influençant le comportement de leur hôte. Ces modifications comportementales ont été décrites chez les virus, champignons, bactéries, protozoaires, nématodes, nematomorphes, trématodes, cestodes, acanthocéphales et les parasitoïdes (Moore 2002; Thomas et al. 2005; Lefèvre et al. 2009a; Poulin 2010). Aussi, les parasites du paludisme peuvent modifier le comportement de leur insecte hôte de manière

à favoriser leur propre développement et leur transmission (Hurd 2003; Lefèvre *et al.* 2006). Une telle manipulation du comportement du vecteur par le parasite a été relativement bien décrite dans le contexte de la prise de repas de sang des moustiques, où les sporozoïtes augmentent l'agressivité du vecteur pour augmenter le taux de contact avec les hôtes vertébrés (Cator *et al.* 2012; Lefèvre & Thomas, 2008). En effet, les moustiques infectés par les sporozoïtes de *Plasmodium* sont non seulement plus enclins à se nourrir que les moustiques sains (i.e. augmentation de la persistance, du taux de piqûre et de la durée des repas sanguins), mais sont également plus attirés par les odeurs de leurs hôtes vertébrés (Cator *et al.* 2013; Smallegange *et al.* 2013). A l'inverse, lorsque le développement du parasite n'est pas achevé (stade oocyste), ces modifications comportementales sont inversées (i.e. diminution de la persistance, du taux de piqûre et, à plus longue distance, diminution de l'attraction par des stimuli olfactifs) (Anderson *et al.* 1999; Koella *et al.* 2002; Cator *et al.* 2013). Ainsi, lorsque des moustiques *Anopheles stephensi* ont été exposés pendant 10 minutes à un des bras de l'expérimentateur, 67% des moustiques sains persistèrent dans leurs tentatives d'alimentation contre 80% chez les moustiques infectés par les stades sporozoïtes transmissibles du parasite murin *Plasmodium yoelii nigeriensis* et seulement 47% chez les moustiques infectés par les stades oocystes non-transmissibles. Cependant, *An. stephensi* n'étant pas le vecteur naturel de *P. yoelii nigeriensis*, de tels résultats ne sont pertinents d'un point de vue écologique et épidémiologique que s'ils sont corroborés pour des combinaisons naturelles d'espèces de parasites et vecteurs.

A notre connaissance, trois études portant sur des associations naturelles ont pu confirmer que les stades transmissibles du parasite provoquent une intensification du taux de contact entre les moustiques et des hôtes vertébrés. La première a montré que des moustiques de l'espèce *An. gambiae* collectés sur le terrain et naturellement infectés par les sporozoïtes de *P. falciparum* présentaient une augmentation du taux de piqûres sur des hamsters au laboratoire (Wekesa *et al.* 1992). La seconde a montré que, comparés à des estomacs de femelles *An. gambiae* saines, les estomacs de femelles fraîchement gorgées collectées sur le terrain, et infectées par les sporozoïtes de *P. falciparum* avaient plus de chances de contenir du sang provenant de différents individus (Koella *et al.* 1998). Enfin, une étude récente au laboratoire a montré que des *An. gambiae* infectés expérimentalement par *P. falciparum* étaient trois fois plus stimulés et attirés par des odeurs d'homme que des *An. gambiae* sains (Smallegange *et al.* 2013). Cette dernière étude a utilisé une souche de *P. falciparum* cultivée au laboratoire (NF54) et aucune étude n'a, à ce jour, exploré la manipulation du

comportement hématophage des moustiques infectés expérimentalement avec des isolats naturels de parasite.

6.2 Automédication

L'automédication peut se traduire par deux formes distinctes: (i) l'automédication prophylactique chez les individus sains et parasités qui consiste à prévenir l'infection et (ii) l'automédication thérapeutique, utilisée seulement chez les individus infectés afin de lutter et/ou d'éliminer l'infection (Hart 2005). L'automédication prophylactique est applicable dans la situation où le risque parasitaire est fort et prévisible dans le temps et l'espace tandis que l'automédication thérapeutique est bénéfique lorsque le risque parasitaire est faible et imprévisible (Hart 2005). Plusieurs travaux rapportent que le parasite du paludisme impose un coût sévère sur la valeur sélective du moustique vecteur (Ahmed & Hurd, 2006; Dawes *et al.* 2009; Fred-Aboagye *et al.* 2010; Hogg & Hurd, 1997; Tripet *et al.* 2008). Par exemple, l'infection à *Plasmodium* peut avoir des impacts négatifs sur la reproduction et / ou la survie du moustique (Hogg & Hurd, 1997; Vézilier *et al.* 2012). En outre, le système immunitaire inné de l'insecte réagit fortement à la présence du parasite (Blandin *et al.* 2008; Cirimotich *et al.* 2010), ce qui suggère que les avantages des réponses immunitaires physiologiques sont nombreuses et permettent de compenser le coût de l'infection palustre. Etant donné que le *Plasmodium* diminue la valeur sélective des moustiques, la sélection naturelle devrait favoriser le développement de mécanismes de défense du moustique contre le parasite. Outre les défenses immunologiques, les insectes hôtes peuvent utiliser leur comportement comme des mécanismes de défense par exemple en évitant de se faire parasiter, en élevant leur température corporelle ou en pratiquant l'automédication, pour mieux résister ou tolérer à leurs parasites (Lefèvre *et al.* 2010, 2011; De-Roode & Lefèvre 2012). Malgré les preuves croissantes de la modulation environnementale de la compétence vectorielle pour les *Plasmodium*, l'immunité comportementale des moustiques reste une stratégie de défense négligée.

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODOLOGIES

1. Travaux de laboratoire.

1.1 Origine et élevage des moustiques

L'ensemble des activités de recherches présentées dans le chapitre 3 ont été menées avec *An. coluzzii* au laboratoire de l'IRSS DRO de Bobo Dioulasso. La souche a été mise en place en décembre 2012 à partir de femelles gravides collectées à la Vallée du Kou (4°24'O, 11°23'N). Les larves ont été nourries avec de la TetraMin®Baby dans les conditions standard de température ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité ($75 \pm 5\%$), avec 12h de jour/nuit maintenues dans des cages de 30cm x 30cm x 30cm. Pour la production des œufs, les femelles prenaient des repas de sang sur du lapin, aussi les mâles et femelles avaient pour source d'énergie une solution de glucose 5%.

1.2 Prospections parasitologiques et techniques d'infections expérimentales

1.2.1 Recherche des porteurs de gamétocytes

Les prospections parasitologiques sont les étapes fondamentales de base pour aboutir à une infection expérimentale. Elles ont été menées dans les villages de Soumousso (11°00'46''N, 4°02'45''W) et Dandé (11°34'59" N et 4°33'25" W), localisés respectivement à 40 km au Nord Est et 60 km au Nord Ouest de Bobo-Dioulasso dans le Sud Ouest du Burkina Faso. Les gouttes épaisses ont été réalisées sur des volontaires dont l'âge variait entre 5 et 12 ans sous l'aval d'un consentement éclairé des parents ou du tuteur ou tutrice légal (e) dans les deux villages (contrat no. A003-2012 / CE-CM). Les volontaires devaient être asymptomatiques, avec une température corporelle $< 37,5^\circ\text{C}$ et non anémiés (Taux d'hémoglobine $> 10 \text{ g/dl}$); présentant une mono-infection à *P. falciparum*. Ils devaient déclarer aucune prise de médicaments antipaludiques ou de décoction à base de plantes dans les 10 jours qui précédaient la prospection parasitologique.

Une fois séchées, les gouttes épaisses étaient ramenées au laboratoire de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) pour la coloration au Giemsa. Ensuite, la détection des stades infectants du parasite (gamétocyte) pour le moustique se faisait à la microscopie (quantifié pour 1000 leucocytes par microlitre de sang à l'objectif x100). Une fois des porteurs de gamétocyte détectés, ils étaient ramenés le lendemain au laboratoire et avant l'infection expérimentale une goutte épaisse additionnelle était nécessaire pour vérifier la présence de gamétocytes. Les enfants qui souffraient du paludisme étaient référés au Centre

de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) le plus proche et pris en charge par le projet. De plus, les enfants qui avaient une densité parasitaire de trophozoïte $> 1000/\mu\text{l}$ de sang, recevaient systématiquement un traitement thérapeutique à base de combinaison de deux molécules, l'Artesunate (as) et l'amodiaquine (aq): asaq, conformément aux recommandations du programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) adoptées en 2005 (Ouedraogo *et al.*, 2012).

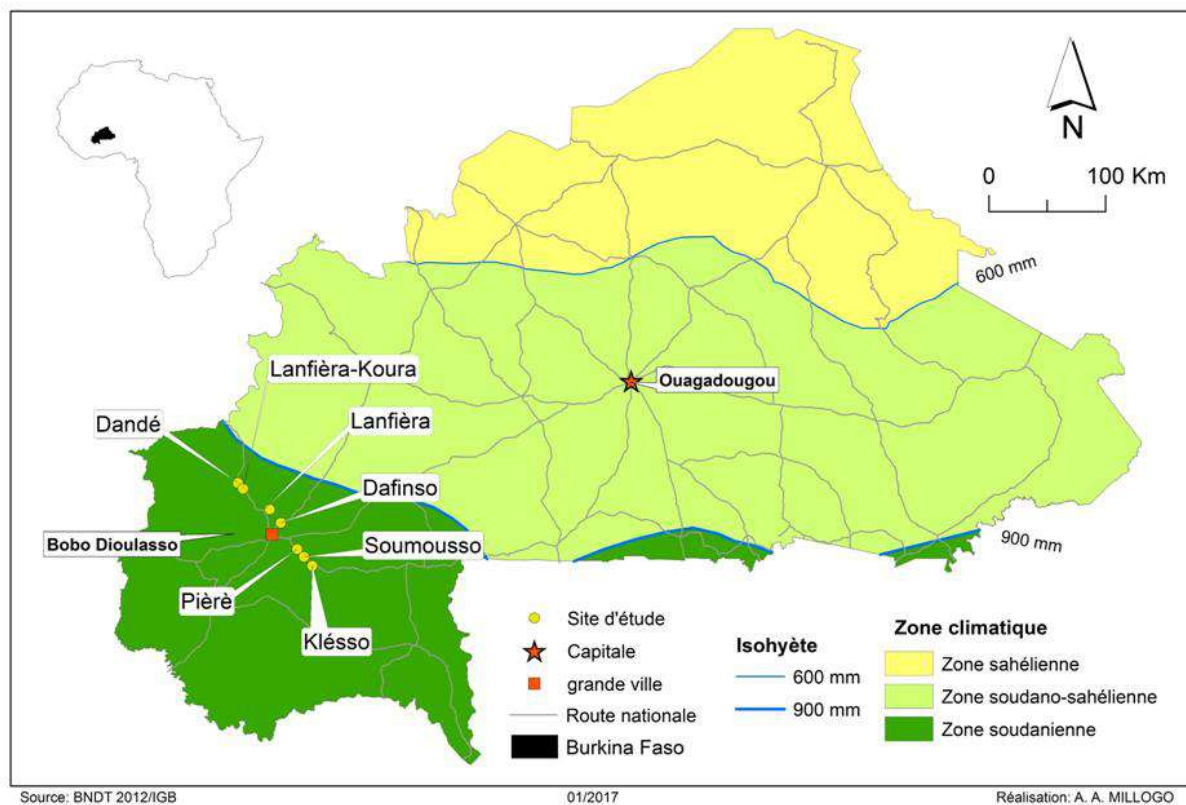


Figure 6: Carte du Burkina Faso avec les différents sites de prospections parasitologiques aux alentours de Bobo-Dioulasso

1.2.2 Technique d'infection expérimentale

La technique d'infection expérimentale a vu le jour dans les années 1970 (Sinden et Canning 1972; Canning et Sinden 1973; Sinden et Garnham 1973) et a pour principe de faire gorgier des moustiques de façon artificielle sur du sang contenant des gamétocytes. Le dispositif est constitué d'une série de petites cellules en verre appelées cellules de gorgement (« feeders » en anglais) (Figure 7).

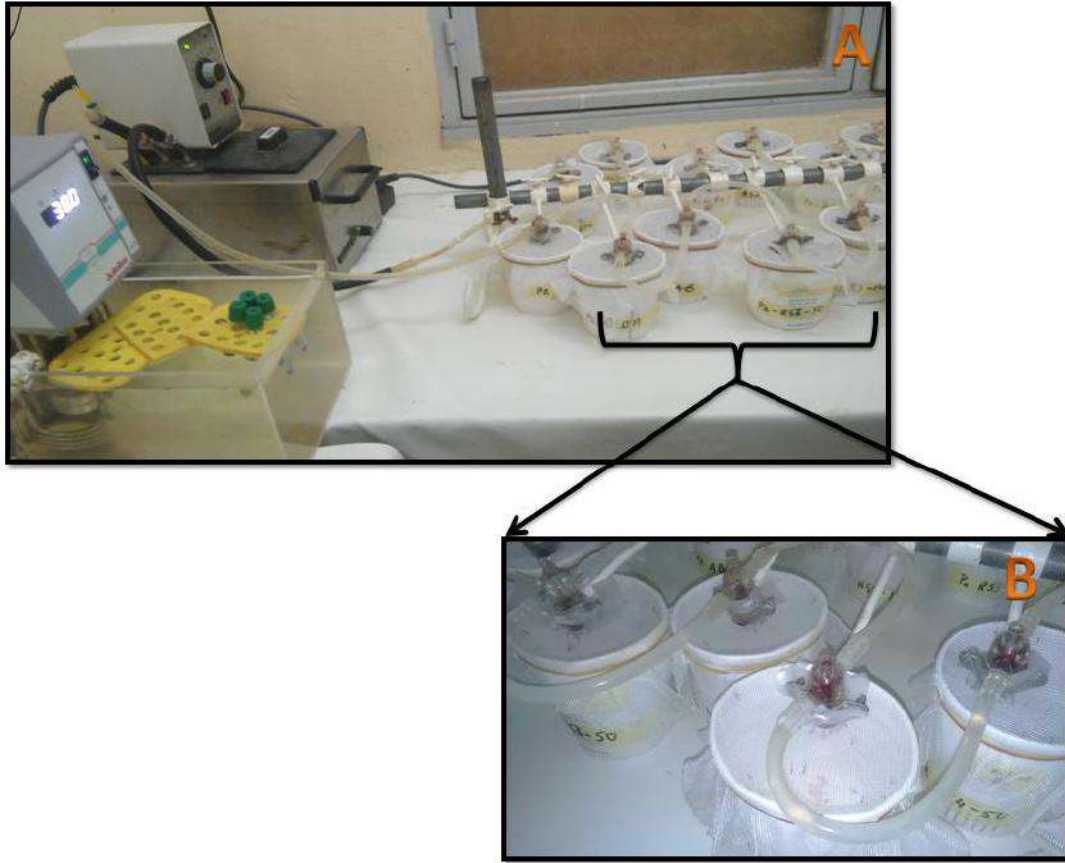


Figure 7:(A) Dispositif complet, avec le bain marie, les cellules de gorgement et (B) les cellules de gorgement et les gobelets en dessous avec des moustiques

Chaque cellule est constituée de deux compartiments: le compartiment qui reçoit le sang avec un orifice supérieur pour la collecte de sang et un orifice inférieur scellé par une membrane de parafilm pour le gorgement des moustiques, et le compartiment de circulation d'eau pour le maintien de la température à 37°C avec un orifice entrée et un orifice sortie d'eau. Les cellules de gorgement sont fixées à un support métallique et reliées entre elles par un tube flexible connecté à un bain marin réglé à 37°C (température corporelle humaine). Pour le gorgement, avant l'infection, les moustiques femelles sont affamés 24 heures dans des cages de 30cm x 30cm x 30cm communes avec les mâles. Le jour de l'infection, un nombre de 60 à 80 femelles dont l'âge variaient entre 3 et 5 jours est trié et mis dans des gobelets puis conservées à l'obscurité le temps nécessaire pour vérifier la gamétocytiémie des porteurs sélectionnés la veille et le prélèvement du sang veineux.

Des groupes de moustiques femelles non infectées (contrôles) ont été nourris avec le même sang dans lequel les gamétocytes étaient inactivés à la chaleur (Sangare et *al.* 2013). L'inactivation des gamétocytes a été effectuée en plaçant le sang collecté dans un thermomélangeur et en le chauffant à 43°C pendant 15 minutes et centrifugé à 900 rotations par minute (rpm) et refroidi à 37°C avant remplissage des feeders tandis que le sang infecté était maintenu à 37°C (Sangare et *al.* 2013). Pour chaque groupe (sang infectieux et sang inactivé) les cellules de gorgement ont été remplies à chaque fois avec 500 µl de sang. Après l'infection, les moustiques non gorgés ou partiellement gorgés ou ayant pris uniquement du sérum étaient écartés pour la suite des expériences. La figure 8 résume les différentes étapes de l'infection expérimentale.

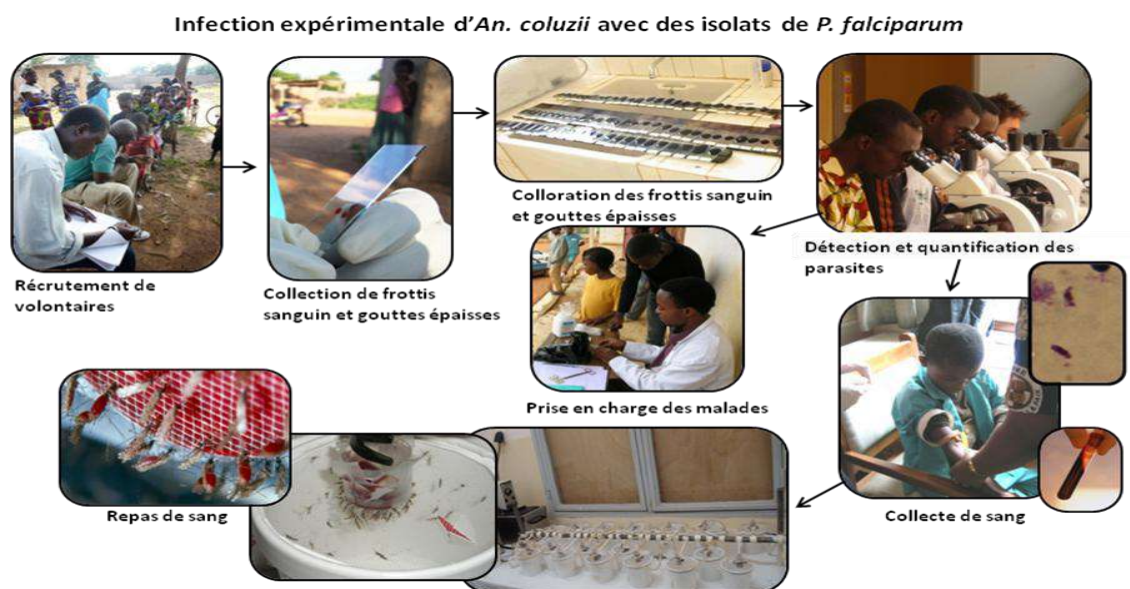


Figure 8 : Représentation des différentes étapes d'une infection expérimentale

1.3 Technique de dissection de l'estomac et de la tête thorax du moustique

Sept (7) jours post-infection les estomacs des moustiques étaient disséqués. Cette dissection s'effectuait sous une loupe binoculaire, à l'aide de pinces Dumont n°5 dans du mercurochrome 2%. Le moustique était maintenu par une pince au niveau du thorax puis étiré à l'aide d'une seconde pince placée au niveau de l'avant dernier segment abdominal. L'exosquelette en se déchirant entraîne l'estomac hors de l'abdomen. Celui-ci est délicatement détaché aux deux extrémités et placé entre lame et lamelle, puis est examiné au microscope aux grossissements x10 à x40 de l'objectif pour la détection et le comptage des oocystes.

7 jours post-infection



Figure 9:Détection microscopique d'oocystes dans l'estomac du moustique

14 jours post-infection, la dissection de la tête thorax nous renseignait sur la présence des stades sporozoïtes transmissibles. Celle-ci se faisait avec deux pinces également et de la même manière que précédemment mais cette fois-ci l'abdomen est pincé et tiré au niveau du premier segment, ensuite la tête et le thorax sont stockés dans un tube 1,5ml et gardé à -20°C pour un diagnostic PCR.

2. Extraction et Polymérase Chain Reaction (PCR)

2.1 Extraction de l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN)

Les femelles qui avaient pris un repas de sang contenant les gamétocytes, ont été maintenues dans des cages de 30cm^3 dans les conditions normales d'insectarium jusqu'à 14 jours post-infection. Ensuite, à 14 jours post-infection, les moustiques ont été anesthésiés à -20°C et la tête thorax de chaque moustique a été disséqué gardés à -20°C dans des tubes Eppendorf 1,5ml. Enfin, l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) de ces parties a été extrait en utilisant le Cetyl trimethyl ammonium bromide 2% (CTAB 2%). Cette extraction avait nécessité d'abord la lyse cellulaire qui se faisait par broyage mécanique de chaque moustique dans $200\ \mu\text{l}$ d'un solvant plus du CTAB 2%, ce qui permettait l'inactivation des nucléases cellulaires. Cette lyse cellulaire a été accentuée en mettant les broyats de moustiques 5 minutes dans un Bain-Marie à 65°C . Le solvant et le CTAB 2% qui ont été utilisés ici servaient à éliminer les contaminants d'acides nucléiques. Ensuite, $200\ \mu\text{l}$ de chloroforme étaient ajoutés à chaque

broyat et mélangés par inversion, puis centrifugés 5 minutes à 12 000 rotation par minute (rpm) afin de séparer l'acide nucléique recherché de débris cellulaires et des protéines. L'acide nucléique recherché se trouvait dans le surnageant. Ce surnageant était prélevé, puis mis dans un autre tube eppendorf de 1,5ml avec les mêmes références inscrites que sur le tube du broyat. Dans le tube contenant le surnageant, 200µl d'iso-propanol étaient ajoutés puis mélangés par inversion et centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm. Le rôle de l'iso-propanol était de concentrer l'acide nucléique par précipitation. Après centrifugation, le mélange surnageant- iso-propanol était vidé et le tube égoutté sur du papier essuie-tout. Ensuite, 200 µl d'éthanol 70% étaient ajoutés dans le tube pour centrifugation pendant 5 minutes à 12 000 rpm, afin de permettre la purification ou élution supplémentaire des sels résiduels. Après, l'éthanol 70% étaient vidés du tube et le culot séché 5 minutes maximum au speed-vac. Enfin, l'ADN était récupéré dans 20 µl d'eau ultra pure et laissé en suspension sur la paillasse toute la nuit avant d'être stocké à -20°C. La conservation de l'ADN à -20°C nous permettait de ne pas dégrader les structures et les propriétés chimiques de l'ADN. L'ADN obtenu nous a permis de quantifier la prévalence en sporozoïtes par l'utilisation de deux techniques de PCR: la PCR classique et la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR).

2.1.1 La PCR classique

La PCR classique utilisée pour déterminer la présence des sporozoïtes est caractérisée par deux amorces spécifiques Pf1:5'-GGAATGTTATTGCTAACAC-3', Pf2:5'-AATGAAGAGCTGTGTATC-3' (Morassin *et al.*, 2002). Le volume final pour un échantillon est de 15µL dont la composition est 2µL (1-5ng/µl) d'ADN purifié, 1X Plug Taq, 0.5mM de Chlorure de Magnésium (MgCl₂), 0.2mM dNTP désoxyribonucléotides, 5pmoles de chaque amorce et 0,5Taq de l'ADN polymérase. Le programme de PCR utilisé est : 94°C pour 3' suivi par 32 cycles (94°C pour 30'', 56°C pour 1'15'', 68°C pour 1') et enfin 68°C 5' pour l'élongation. Au cours de la révélation les bandes sont attendues à 501bp pour les échantillons positifs aux sporozoïtes. Enfin, la prévalence est calculée en divisant le nombre de spécimens de moustiques positifs sur le nombre total de moustiques passés en PCR pour chaque traitement.

2.1.2 La PCR en temps réel ou (qPCR)

La quantification des sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques infectés était réalisée par qPCR en utilisant le système standard d'un appareil nommé «Applied Biosystems

StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems». Pour la quantification des sporozoïtes, nous avons visé le gène mitochondrial qui code pour le cytochrome C d' Oxydase (Cox1). Les séquences reversent des amorces suivantes: qPCR-PfF 5'-TTACATCAGGAATGTTATTGC-3' et qPCR-PfR 5'-ATATTGGATCTCCTGCAAAT-3' étaient utilisées. La réaction d'un échantillon se produit dans un volume total de 10µL contenant 1µL d'ADN (~40ng/µL); 4,6µL d'eau; 2µL de 1x HOT Pol EvaGreen qPCR Mix Plus ROX et 1,2µL de chaque amorce à 5µM. L'amplification commence par une étape d'activation à une température de 95°C pendant 15min et 40 cycles de dénaturation à 95°C à 15s , renaturation / extension à 58°C pendant 30s. La détection était faite au cours de la dernière étape (Boissière *et al.*, 2013).



Figure 10: Photo du dispositif de l'appareil qPCR

3. Considération éthique

L'approbation éthique a été obtenue à partir du comité d'éthique institutionnel du Centre Muraz sous le contrat no. A003-2012 / CE-CM. Le protocole est conforme à la déclaration de Helsinki sur les principes éthiques pour la recherche médicale impliquant des sujets humains (version de 2002) et les consentements éclairés écrits ont été obtenus pour tous les bénévoles.

CHAPITRE 3: ACTIVITES DE RECHERCHES

ACTIVITE DE RECHERCHE 1:

Les sucres naturels consommés par les anophèles femelles influencent le développement et la transmission du paludisme ¹

1. Introduction

La capacité des moustiques anophèles à transmettre le *Plasmodium falciparum* est un trait phénotypique complexe, déterminé par les facteurs génétiques du moustique et du parasite, les facteurs environnementaux, et l'interaction entre ces facteurs (Li et al. 2013; Molina-Cruz et al. 2012; Lefèvre et al. 2013; Lambrechts et al. 2005; Redmond et al. 2015; Gendrin et al. 2015). Une variable environnementale clé dans les relations hôte-parasite, en général, est la disponibilité et la qualité des ressources alimentaires qui peuvent influencer la susceptibilité de l'hôte pour les parasites (Wolinska and King, 2009). L'influence du régime alimentaire sur les maladies infectieuses est, en effet, constatée dans les interactions tri-trophiques impliquant les insectes herbivores, leurs parasites et leurs plantes hôtes (Cory & Hoover 2006). Les effets induits par les plantes ont souvent été attribués soit à des effets toxiques directs des métabolites secondaires des plantes sur le développement du parasite (Lefèvre et al. 2010), ou, à des différences de la valeur nutritive qui, à leur tour, affectent l'immunocompétence de l'hôte (Lee et al., 2008).

Les moustiques, peuvent être assimilés à des insectes herbivores, car ils font également partie de systèmes multi-trophiques incluant les plantes et les parasites. Bien que les moustiques femelles soient connues pour se nourrir de sang, les sucres provenant du nectar floral et extra-floral, des fruits et du phloème composent également une partie importante de leur régime alimentaire et ont des implications biologiques importantes (Foster, 1995; Stone and Foster, 2013). Des études récentes indiquent que les femelles d'*An. gambiae*, le principal vecteur de *P. falciparum* dans plusieurs régions de l'Afrique, peuvent localiser et présenter des préférences pour les sources de sucre (Müller et al. 2010; Manda et al. 2007a). Ces sucres naturels peuvent jouer un rôle crucial sur la capacité vectorielle du paludisme (une mesure standard du potentiel de transmission du paludisme), par leurs effets sur la survie des moustiques (Gary and Foster, 2001; Zhu et al., 2015) ou le taux de gorgement

¹ Cette activité de recherche a fait l'objet d'une publication : **Hien DFdS**, Dabiré KR, Roche B, Diabaté A, Yerbanga SR, Cohuet A, Yameogo BK, Gouagna L-C, Hopkins RJ, Ouedraogo GA, Simard F, Ouedraogo J-B, Ignell R, Lefevre T. 2016. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. **PLoS Pathogens** **12** : e1005773. Le pdf de cet article est disponible en Annexe de ce document.

(Gary & Foster 2001; Stone et al. 2012; Zhu et al. 2015). Cependant, les sucres végétaux pourraient également influencer sur la capacité vectorielle d'une autre manière en améliorant ou en atténuant l'infection chez les moustiques vecteurs.

Comparés aux importants efforts consacrés à la compréhension des interactions entre les plantes, les insectes herbivores et leurs parasites (Cory & Hoover 2006), les études sur les effets nutritionnels au sein des interactions moustiques-*Plasmodium* ont accusé un retard en dépit de leur importance épidémiologique évidente. Les quelques études existant indiquent que le régime alimentaire des adultes peut, en effet, influencer l'immuno-compétence et la sensibilité des moustiques aux parasites du paludisme (Koella and Sørensen, 2002; Suwanchaichinda and Paskewitz, 1998). Toutefois, ces études se sont limitées à des changements quantitatifs, et non qualitatifs, dans le régime alimentaire, et ont utilisé des sources de nourriture non naturelles (par exemple, différentes concentrations de solutions de glucose) (Ferguson & Read 2002; Lambrechts et al. 2006). Ainsi, il reste à découvrir si la diversité végétale naturelle affecte la sensibilité des moustiques aux parasites du paludisme. La présente étude vise à répondre à cette question en utilisant l'interaction tri-trophique naturelle entre le parasite *P. falciparum*, responsable de la forme sévère de paludisme humain, le moustique *Anopheles coluzzii* (anciennement la forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s.*), un vecteur majeur de *P. falciparum* en Afrique de l'Ouest, et une gamme de dérivés sucrés de plantes et fruits péri-domestiques. Nous avons infecté des femelles d'*An. coluzzii* avec des isolats de *P. falciparum* sympatriques de terrain, en utilisant des infections expérimentales. Nous avons ensuite examiné les effets des sucres de plantes sur le développement du parasite et les traits d'histoire de vie des moustiques jouant un rôle clé dans l'intensité de la transmission du paludisme. Les paramètres ont été mesurés : (i) le début du développement du parasite dans les estomacs de moustiques (croissance des oocystes), (ii) la proportion de moustiques épidémiologiquement dangereux ayant les stades transmissibles du parasite, les sporozoïtes (i.e. l'index sporozoïtique), (iii) la Période d'Incubation Extrinsèque du parasite (PIE), (iv) la survie et la fécondité des moustiques infectés, et (v) les coûts et bénéfices des moustiques infectés et non infectés à se nourrir sur les sucres naturels de plantes. Enfin, ces résultats ont été combinés dans un modèle épidémiologique pour prédire la contribution relative des différentes espèces de plantes à la transmission globale du paludisme.

1.2 Méthodologie

1.2.1 Choix des sources de nectars de plantes

Les plantes et les fruits ont été sélectionnés après des tests de survie sur une large gamme de sources de nectars de fleurs, de sources de nectars de fruits et de sources de sève de plante (Figure 10). Le choix des plantes testées a été fait sur la base de leur large distribution aux abords des habitations humaines dans les villages et les villes de l'Ouest du Burkina Faso. Les femelles d'*An. coluzzii* se reposent, exploitent et se nourrissent sur ces différentes plantes. Les plantes qui ont été retenues fournissent aux moustiques une vie relativement longue qui permet le développement du *P. falciparum* jusqu'au stade transmissible (sporozoïtes).

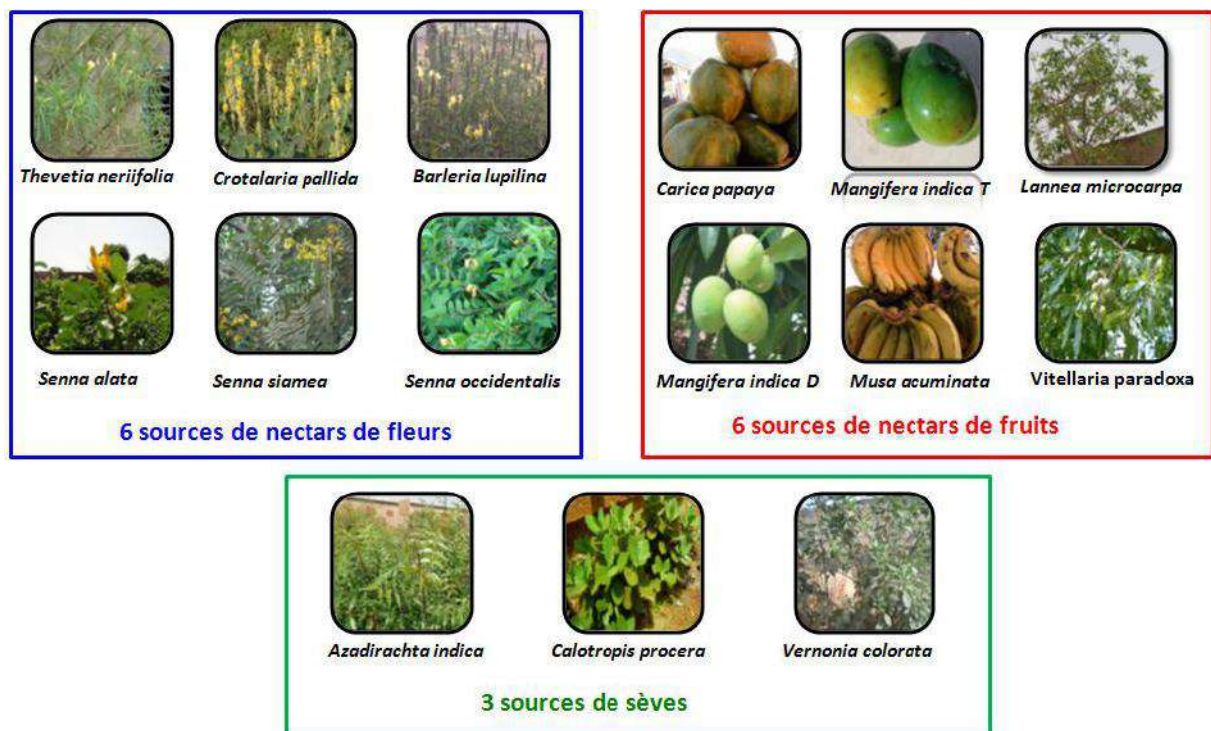


Figure 11 : Liste des différentes plantes testées au cours de notre première année de thèse.

1.2.2 Les différentes plantes utilisées

Deux plantes ornementales à fleur ont été choisies: *Thevetia neriiifolia* et *Barleria lupulina* collectées dans les jardins et les parcs de Bobo-dioulasso (Figure 12a,b) et deux fruits: mangue (*Mangifera indica* variété "demoiselle") et *Lannea microcarpa*, les deux sont produits localement et vendus sur les différents marchés de Bobo-dioulasso (Figure 12 c, d).

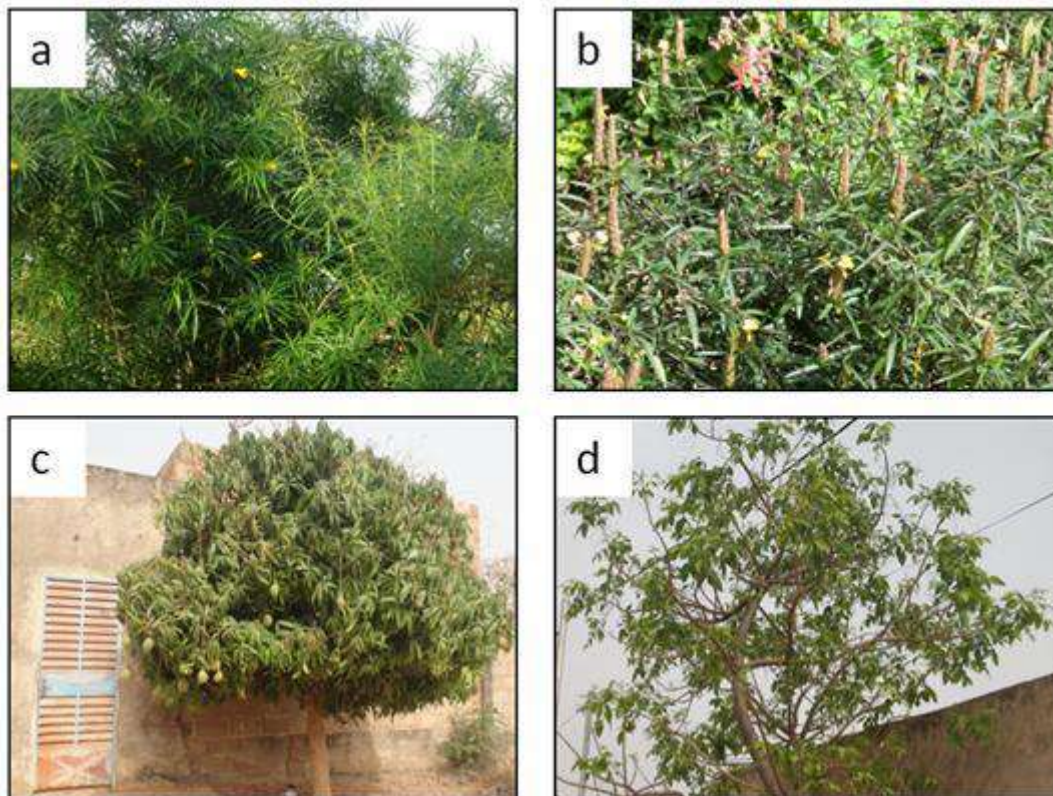


Figure 12: Les espèces de plantes naturelles utilisées dans ces expériences. **(a)** *Thevetia neriifolia* encore appelé Laurier jaune (synonyme: *Thevetia peruviana*, *Casacabela thevetia*; appartient à la Famille des *Apocynaceae*) c'est un arbuste tropical à feuilles persistantes pouvant atteindre 6 mètres de hauteur originaire du centre de l'Amérique du Sud. Les lauriers jaunes sont communs et répandus dans les villages et les villes de l'Afrique occidentale où il est surtout utilisé comme une haie de cour. **(b)** *Barleria lupulina* (synonyme: *Barleria macrostachys*; appartient à la Famille des *Acanthaceae*) est un arbuste ornemental d'environ 1.5 m commun dans les villes et les villages de l'Afrique occidentale, originaire de Madagascar. **(c)** *Mangifera indica* (nom commun: mangue; famille: *Anacardiaceae*) est un grand arbre fruitier pouvant atteindre jusqu'à 30 m de hauteur, il est originaire d'Inde et est largement distribué en Afrique occidentale pour la consommation de son fruit. Au Burkina Faso, les manguiers sont généralement trouvés dans les villages et les villes dans les concessions où ils fournissent ombre et fruits. **(d)** *Lannea microcarpa microcarpa* (synonyme: *L. microcarpa acida*, *L. microcarpa djalonica*; nom commun: Raisin Africain, appartient à la Famille des *Anacardiaceae*) c'est un arbre (d'environ 15 m de haut) indigène de l'Afrique de l'Ouest. C'est une espèce qui n'est pas cultivée, elle se propage naturellement dans la végétation de savane et peuvent se trouver dans des villages et les villes de l'Afrique de l'Ouest.

Les sources de sucres de plantes ont été offertes aux moustiques dans les cages de 30 cm x 30 cm x 30 cm recouvertes par une moustiquaire. Pour *T. neriifolia* et *B. lupulina*, entre cinq et dix tiges (bouquet) de fleurs fraîches ont été coupées et mises à l'intérieur de chaque cage. La base du bouquet était enroulée avec un essuie-tout humidifié et enveloppé par une feuille d'aluminium (Figure 13. a,b). Pour le traitement avec la mangue, les fruits mûrs ont été coupés de moitié, piqués sur deux bâtonnets de 20cm et placés dans un gobelet en plastique de 20 cl avant d'être introduits dans les cages à moustiques (Figure 13,c). Un total d'environ 40 fruits mûrs de *L. microcarpa* a été placé dans une boîte de pétri dans la cage à moustiques

(Figure12, d). Finalement, une solution de glucose 5% a été fournie dans du coton enroulé sur deux bâtonnets de 20 cm mis dans un gobelet en plastique (Figure13, e). Les bouquets de fleurs, fruits et glucose ont été remplacés chaque jour. Pour confirmer l'ingestion de sucre, un échantillon de moustiques issus de chaque traitement a été passé au test d'anthrone qui réagit spécifiquement à la présence du fructose dans le jabot ou l'estomac du moustique.

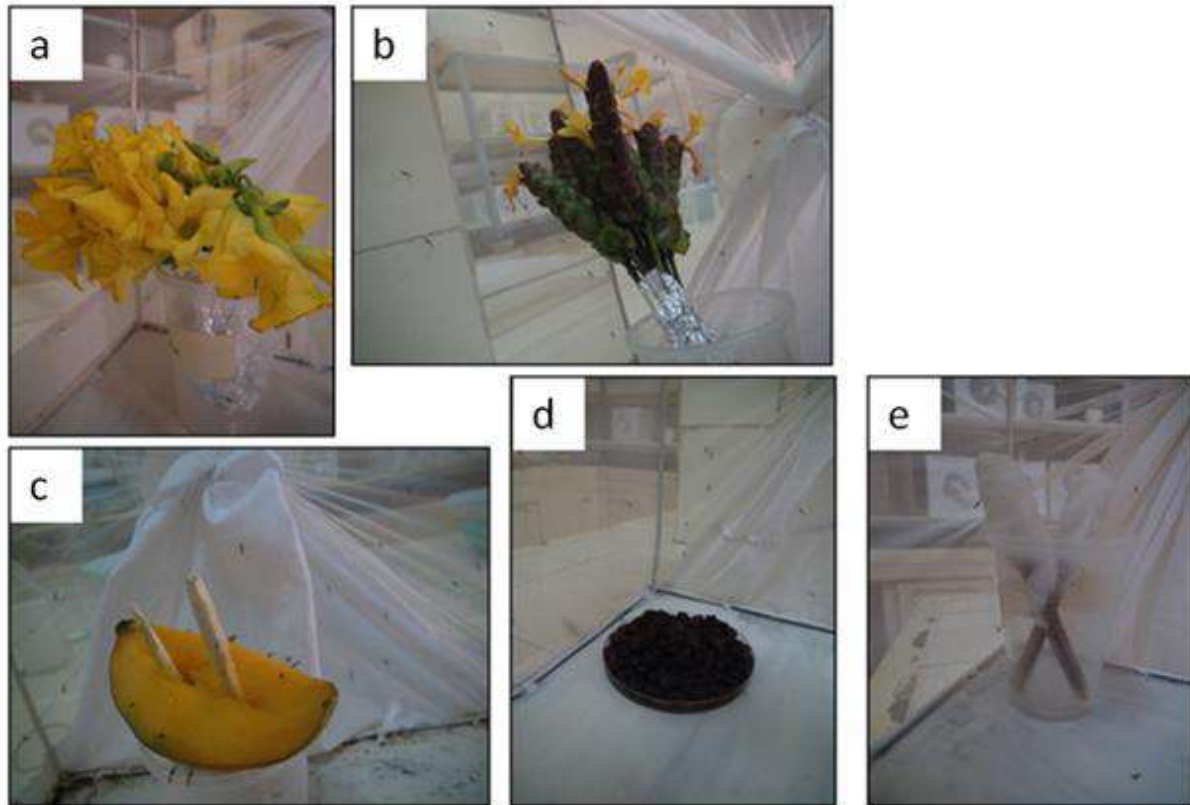


Figure 13:Disposition des sources de sucre dans les cages. (a) Bouquet de fleur de *Thevetia nerifolia*. (b) Bouquet de fleur de *Barleria lupulina*. (c) Fruit de *Mangifera indica*. (d) Les fruits de *Lannea microcarpa* (e) Solution de glucose 5% imbibée sur du coton

1.2.3 Le test d'anthrone

Le test d'anthrone a été utilisé pour mettre en évidence la présence du sucre végétal (fructose) chez les moustiques (Van-Handel 1972). Quand ce sucre est révélé dans l'estomac/ le jabot du moustique cela signifie que le moustique a ingéré des sources naturelles de sucre (Gary and Foster, 2004; Gu *et al.*, 2011). Pour confirmer l'ingestion de sucre, vingt cinq (25) moustiques provenant de traitement ont été sélectionnés au hasard pour le test d'anthrone. La solution d'anthrone a été préparée en dissolvant 150mg de la poudre d'anthrone dans 100ml d'acide sulfurique à 68,11% et gardée à +4°C au réfrigérateur. La solution d'anthrone de couleur jaune

citron à la base réagit avec le fructose pour donner les couleurs vert claire, bleu ou bleu foncé selon la quantité du fructose (Figure 14). Les moustiques ont été broyés individuellement dans les tubes à hémolyse dans 0,5ml de la solution d'anthrone préparée. Les broyats ont été incubés durant 60 minutes à la température ambiante pour la réaction avec 3 tubes contenant 0,5ml de solution d'anthrone seulement comme contrôle.

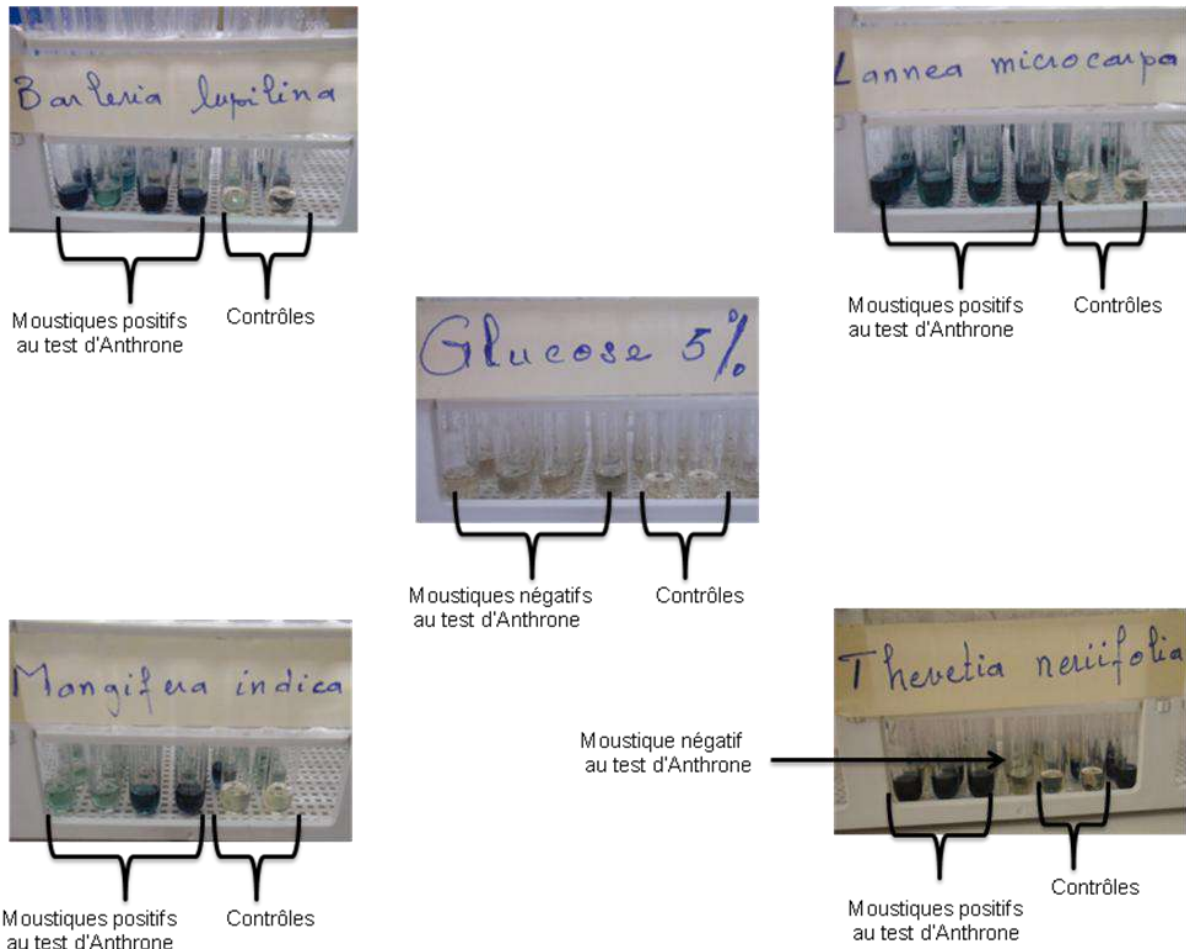


Figure 14: Photos montrant la prise de jus sucré par les moustiques sur les différents traitements

1.2.4 Effet des sucres de plantes sur la taille du repas de sang

Chez les moustiques, le repas de jus sucré ingéré est stocké temporairement dans le diverticule œsophagien, principalement le grand diverticule ventral (Jabot) qui s'étend jusqu'à l'intérieur de l'abdomen. Ensuite, ce jus sucré stocké dans le jabot est acheminé dans l'estomac du moustique graduellement pour être convertis selon les besoins physiologiques du moustique (Clements, 2011). Il est généralement admis qu'il existe une corrélation négative entre la prise d'un repas du jus sucré et la taille du repas de sang (Mostowj and Foster, 2004). Au cours de nos travaux, les moustiques ont été affamés pendant 24h avant leur repas de sang

et, seulement les femelles bien gorgées ont été gardées pour la suite des expériences. Ceci étant, nous ne pouvons pas exclure complètement la possibilité que les sources de nectar de plantes ont influencé la taille du repas de sang. Un tel effet pourrait avoir des conséquences sur l'infection puisque l'assimilation d'une grande quantité de sang infectieux peut entraîner l'ingestion d'une plus grande quantité de parasites dans l'estomac du moustique (Pichon *et al.*, 2000) et vraisemblablement une augmentation de l'infection. Pour tester cette hypothèse nous avons mesuré les effets de source de nectar de plante sur la taille du repas de sang chez le moustique. Brièvement, dès l'émergence, trente femelles adultes d'*An. coluzzii* ont été assignées au hasard à l'une des quatre sources de sucre: glucose 5%, *L. microcarpa*, *B. lupulina*, *M. indica* et *T. neriifolia*. Les moustiques ont été maintenus sur leur traitement pendant deux jours consécutifs et affamés pendant une période de 24h avant de recevoir un repas de sang à travers un parafilm. Après le repas de sang, les femelles gorgées étaient gardées individuellement dans des tubes à drosophile pendant quatre jours jusqu'à la digestion complète du sang. La taille du repas de sang a été mesurée indirectement comme la masse de l'hématine excrétée par les moustiques individuellement (Briegel, 1980). Le matériel excrété était dissout dans une solution de lithium de carbonate 1% ajoutée dans les tubes de drosophile. La quantité d'hématine, un sous-produit de la décomposition d'hémoglobine, a été évaluée en mesurant l'absorbance du mélange comparé avec une courbe standard faite à partir du sérum d'hématine porcine (Sigma–Aldrich).

1.2.5 Expérience 1: Déterminer l'effet de sucre naturel de plantes sur le développement des oocystes de *P. falciparum*, ainsi que sur la survie et la fécondité du moustique

Dès l'émergence, des sous-groupes de femelles de moustiques provenant d'une même cohorte ont été assignés au hasard à une des quatre sources de sucre: une solution de glucose 5%, *T. neriifolia*, *B. lupulina* ou *M. indica* pendant trois à quatre jours. Les moustiques ont ainsi eu un temps nécessaire pour se nourrir sur leur source de sucre. Pour assurer l'insémination des femelles, les moustiques mâles et femelles étaient maintenus ensemble. Les femelles âgées de 3 à 4 jours ont ensuite été transférées dans des gobelets en plastiques pour l'infection (voir chapitre 2, paragraphe 1.2.2). Après infection, les femelles bien gorgées ont été gardées dans des cages de 30 cm × 30 cm × 30 cm couvertes de tuile moustiquaire avec leur traitement de sources de sucre assignées avant l'infection (Figure 13). Les femelles ont donc reçu le même traitement avant et après l'infection. Sept jours après le repas de sang, les estomacs des

moustiques ont été disséqués dans du mercurochrome 2% et lus sous un microscope à objectif x10, puis x20 et quelques fois à l'objectif x40 pour vérifier la présence d'oocystes. Aussi, nous avons examiné si les ovaires contenaient des œufs matures (femelles gravides). La survie des moustiques a été relevée entre le premier et le septième jour post-infection deux fois par jour à 8h00 et 17h00. Au total, 4 répliquats ont été réalisés en utilisant 7 porteurs de gamétocytes différents entre Avril et Juin 2013. Pour éviter un phénomène d'effet cage les moustiques ayant pris le même traitement de sucre et nourris sur du sang de porteur de gamétocyte ont été répartis dans au moins deux cages différentes. En moyenne, 30 (de 10 à 50) moustiques par traitement de sucre et par porteur de gamétocyte ont été disséqués (excepter pour le traitement mangue où seulement 1 et 4 moustiques ont été disséqués avec succès respectivement pour le porteur 1 et 2 de gamétocyte due à un très faible taux de survie). Les tailles d'échantillonnage pour chaque traitement sont indiquées sur la Figure 14.

1.2.6 Expérience 2: Déterminer l'effet du sucre des plantes sur l'index sporozoïtique et de la période d'incubation extrinsèque (PIE).

La même procédure générale comme décrite dans l'expérience 1 a été utilisée. Parce que *P. falciparum* prend en moyenne 14 jours pour que les sporozoïtes atteignent les glandes salivaires et comme la survie des moustiques sur *M. indica* était relativement faible, nous avons choisi de remplacer celle-ci avec *L. microcarpa*. Comme dans la précédente expérience, les moustiques ont été assignés au même traitement avant et après l'infection. Les moustiques ont été collectés à partir du 9 et ce jusqu' au 13^{ème} jour post-infection. La tête et le thorax de 20 moustiques provenant de chaque traitement et par période de temps (9, 10, 11,12 et 13 jours post-infection) ont été disséqués pour estimer la période d'incubation extrinsèque du parasite. La tête et le thorax ont été individuellement gardés à -20°C. La PCR (Morassin *et al.*, 2002) a été faite sur les extraits de la tête et le thorax pour vérifier la dynamique d'apparition des sporozoïtes à ce niveau. La survie des moustiques a été estimée entre 1-14 jours post-infection. Deux fois par jour, la mortalité des moustiques a été relevée et comptée par cage à 8h00 et 17h00. Au total, deux répliquats ont été réalisés avec 4 porteurs de gamétocytes entre Avril et Juin 2013. En moyenne, 26 (8 à 50) moustiques par traitement de sucre et par porteur de gamétocyte ont été disséqués. Les tailles d'échantillonnages sont indiquées sur la figure 15.

1.2.7 Expérience 3: Déterminer comment l'infection parasitaire et les espèces d'hôte de plante interagissent pour influencer la longévité des moustiques.

La procédure générale a été indiquée dans les deux expériences précédentes sauf qu'un groupe de moustique contrôle non infecté a été ajouté, et que la survie a été mesurée jusqu'à la mort du dernier moustique. Les moustiques ont été assignés à une solution de glucose 5%, *M. indica*, *T. neriifolia* ou *B. lupulina*. Parce que *M. indica* a montré un effet sur la prévalence en oocyste et l'intensité d'infection (Figure.15a, c), tandis que *L. microcarpa* n'a pas montré d'effet sur l'infection (Figure.16a) nous avons utilisé dans cette expérience *M. indica* au détriment de *L. microcarpa*. Les moustiques contrôles non infectés ont reçu du sang inactivé ayant subi un traitement thermique (voir chapitre2 paragraphe 1.2.2).

1.2.8 Modèle mathématique

Pour explorer les résultats du potentiel épidémiologique des plantes, nous avons utilisé un modèle simple basé sur la théorie du SIR (*Susceptible-Infected-Recovered*, (Keeling and Rohani, 2008; Roux *et al.*, 2016):

$$\frac{dS_i}{dt} = p_i \mu_i N_i - (abI_H + \mu_i) S_i$$

$$\frac{dE_i}{dt} = abI_H S_i - (\varepsilon_i + \mu_i) E_i$$

$$\frac{dI_i}{dt} = \varepsilon_i E_i - (\sigma_i + \mu_i) I_i$$

$$\frac{dU_i}{dt} = \sigma_i I_i - \gamma_i U_i$$

$$\frac{dS_H}{dt} = -acS_H \sum_{i=1}^3 \tau_i I_i + \eta_i U_i$$

$$\frac{dI_H}{dt} = acS_H \sum_{i=1}^3 \tau_i I_i + \eta_i U_i$$

Où S_i et E_i représentent l'abondance des moustiques susceptibles et exposés (i.e infectés mais pas encore infectieux), respectivement, lorsqu'ils se nourrissent sur des plantes d'espèces i . Le modèle représente la variation de la compétence vectorielle et le potentiel infectieux (la période au cours de laquelle le moustique peut transmettre le pathogène) au cours de deux

phases: une première phase de niveau d'infection bas (quand les oocystes s'éclatent et les sporozoïtes commencent à envahir les glandes salivaires des moustiques, i.e 9 à 10-11 jours, voir figure 16.c), suivie par une seconde phase de haute infection (de 10 à 11 jours jusqu'à la mort du moustique). Pour l'infection, les moustiques exposés se déplacent de la classe I_i , laquelle représente le moustique infectieux pendant la première phase où une proportion τ_i est infectieuse. Finalement, les moustiques atteignent la seconde phase infectieuse (U_i) à la proportion σ_i où η_i % sont infectieux et meurent à la proportion γ_i . Les définitions des paramètres et des valeurs sont retranscrites dans le tableau I.

Dans le modèle, nous avons quantifié le nombre de personnes qui peuvent s'infecter au cours d'une saison (i.e. prévision de la fluctuation de l'incidence palustre) pour estimer l'influence de la diversité des plantes sur la transmission du pathogène. Pour des estimations robustes, nous avons appliqué un *Latin Hypercube Sampling* (LHS) (Iman *et al.*, 1981) pour explorer les comportements généraux possibles des différentes variables des paramètres à l'intérieur de la déviation standard en fonction de l'abondance des plantes. La simulation a commencé avec une seule infection individuelle (introduction d'un seul cas infecté dans la population humaine) et S_i est l'abondance totale N des vecteurs à une période bien précise de la proportion fixée par le paramètre p_i .

Après l'analyse de l'impact de chaque espèce de plante, nous avons exploré le rôle de la communauté de plante sur la transmission. Nous avons étudié deux situations différentes reflétant respectivement les zones urbaines et rurales. Dans les zones urbaines du Burkina Faso, l'abondance relative des espèces de plantes utilisées ici est comme suit: $T. neriifolia > B. lupulina > L. microcarpa$. Au contraire, dans les zones rurales du Burkina Faso, l'abondance relative est $L. microcarpa > T. neriifolia > B. lupulina$. Pour chaque situation, nous avons exploré quatre scénarios distincts d'abondance relative de plantes. Nous n'avons considéré aucune diversité premièrement, i.e. où une plante représente 100% de source d'alimentation des moustiques. La seconde et la troisième configuration ont consisté à explorer les situations où la dominance des plantes représente 60% des sources d'alimentation, ensuite, la situation où la seconde et la troisième plante représente respectivement 30% et 10% ou 20% et 20% des sources d'alimentation. La dernière configuration a considéré une éventualité où l'alimentation des moustiques se faisait sur les sources de nectar de plantes disponibles de manière égale.

Tableau I : Valeurs des paramètres du modèle

Paramètre	Definition	Valeur
p_i	Proportion de moustiques ayant pris un repas de jus sucré sur une espèce de plante i	Variable
A	Fréquence de piqûres des moustiques	Variables
τ_i	Compétence des moustiques au cours de la première phase d'infection pour chaque espèce de plante et du contrôle glucose 5%	Glucose 5%: 0,1 (0,093) <i>L. microcarpa</i> : 0,3 (0,116) <i>B. lupulina</i> : 0,15 (0,1107) <i>T. neriifolia</i> 0,025 (0,0484)
η_i	Compétence des moustiques au cours de la deuxième phase d'infection pour chaque espèce de plante et du contrôle glucose 5%	Glucose 5%: 0,4697 (0,1204) <i>L. microcarpa</i> : 0,6757 (0,0871) <i>B. lupulina</i> : 0,7154 (0,0776) <i>T. neriifolia</i> 0,4627 (0,0847)
ε_i	Durée de la phase exposée (infectés mais, pas infectieux) pour chaque source de jus sucré	8 jours
σ_i	Durée de la première phase d'infection pour chaque espèce de plante et du contrôle glucose 5%	Glucose 5%: 2 jours <i>L. microcarpa</i> : 3 jours <i>B. lupulina</i> : 2 jours <i>T. neriifolia</i> : 2 jours
γ_i	Durée de la seconde phase d'infection pour chaque espèce de plante et le contrôle glucose 5%	Glucose 5%: 4,54 jours (1) <i>L. microcarpa</i> : 4,97 jours (1) <i>B. lupulina</i> : 9,12 jours (1) <i>T. neriifolia</i> : 3,207 jours (1)

NB:Les numéros entre les parenthèses indiquent les déviations standards.

1.2.9 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec R (version 2.15.3). Des Modèles Mixtes Linéaires Généralisés (GLMM, binomial errors, logit link; lme4 package) ont été utilisés pour tester l'effet du traitement de sucre sur la proportion d'infection en oocyste (Expérience 1) et l'index sporozoïtique (Expérience 2). Un GLMM avec une distribution négative binomiale (glmmADMB package) a été utilisé pour tester l'effet du traitement du sucre sur l'intensité en oocyste (Expérience 1). Pour ces GLMMs, les modèles finaux ont inclus le traitement de sucre et la gamétocytémie et leur interaction comme des effets fixes. Le GLMM binomial a aussi été utilisé pour tester l'effet du traitement de sucre, de l'infection et de la gamétocytémie sur la gravité du moustique (présence/absence d'œufs matures dans les ovaires). Dans tous les GLMMs, le porteur de gamétocytes identifié a été inclus comme un effet aléatoire. L'effet du traitement de sucre sur la survie du moustique a été analysé en utilisant les modèles de régression Cox (fonction « coxph » dans le package « survival ») avec (expérience 1 et 2) ou sans (expérience 3) censure. Le traitement de sucre, la gamétocytémie, et l'infection (pour l'expérience 3 seulement) et leur interaction ont été considérés comme des variables explicatives. La simplification des modèles a utilisé la comparaison de modèle, suivie par des tests de ratio de probabilité (LRT). Les termes qui réduisaient significativement la puissance explicative ($p < 0.05$) ont été conservés dans les modèles minimaux adéquats (Crawley *et al.*, 2007).

1.3 Résultats

1.3.1 Les sucres végétaux influencent le développement précoce de *P. falciparum*, ainsi que la survie et la fécondité du vecteur

Un total de 324 sur 764 (42,4%) *An. coluzzii* ont été infectés avec succès. Le taux d'infection des moustiques variait considérablement avec les différents traitements de sucre (glucose 5%: $41 \pm 6\%$, *B. lupulina*: $52 \pm 8\%$, *M. indica*: $30 \pm 9\%$, *T. nerifolia*: $43 \pm 6\%$; LRT $X^2_3 = 13,2$, $p = 0,004$; Figure 14a). En particulier, les moustiques soumis au *M. indica* ont présenté un taux d'infection inférieur aux moustiques exposés aux autres traitements de sucre (figure 15a). La dose d'infection (c-à-d la gamétocytémie) a affecté de manière significative la prévalence d'infection au parasite lorsque la densité des gamétocytes était élevée dans le sang ce qui entraînait une augmentation du risque d'infection ($X^2_3 = 5,2$, $p = 0,04$). Enfin, il y avait

une interaction significative entre la gamétocytemie et le traitement de sucre (LRT $X^2_3 = 12.5$, $P = 0.006$)

Dans l'ensemble, le nombre moyen (\pm es) d'oocystes par estomac des femelles infectées (c.-à-d l'intensité des oocystes) était de $6,84 \pm 0,38$. L'intensité des oocystes variait considérablement entre les traitements de sucre (glucose 5%: $8,1 \pm 0,9$, *B. lupulina*: $6,25 \pm 0,65$, *M. indica*: $3,4 \pm 0,44$, *T. neriifolia*: $4,9 \pm 0,45$; LRT $X^2_3 = 19,8$, $P = 0,0002$), avec des intensités réduites chez les moustiques qui avaient été nourris avec *M. indica* et *T. neriifolia* par rapport aux individus nourris avec glucose 5% et *B. lupulina* (Figure 15b). La gamétocytemie avait un effet positif sur l'intensité (LRT $X^2_1 = 4,6$, $P = 0,03$), et il y avait une interaction significative entre la gamétocytemie et le traitement de sucre (LRT $X^2_3 = 12,5$, $P = 0,006$).

Le traitement de sucre avait également un effet significatif sur la probabilité de survie des moustiques jusqu'aux 7 jours post infection (JPI) (LRT $X^2_3 = 80$, $P < 0,001$; Figure 15c) avec un taux de survie de 92%, 90% et 89,5% pour le glucose 5%, *T. neriifolia* et *B. lupulina*, respectivement, et de 50% pour *M. indica*. La proportion de moustiques gravides était également réduite lorsque les moustiques se nourrissaient avec *M. indica* (LRT $X^2_3 = 27$, $P < 0,001$; Figure 15d). Aussi, les femelles infectées avaient plus de chance d'avoir des œufs dans leurs ovaires comparativement aux femelles exposées à un repas de sang infectieux mais qui étaient restées saines (ci-après dénommées "exposées non-infectées") (LRT $X^2_1 = 8$, $P = 0,005$; Figure 15d); et ce indépendamment du traitement du sucre (c.-à-d pas d'interaction significative entre le traitement du sucre et l'infection: LRT $X^2_3 = 3,5$, $P = 0,32$, Figure 14d). Enfin, il n'y avait aucun effet de la gamétocytemie sur la survie et la gravidité des moustiques (LRT $X^2_1 = 0,12$, $P = 0,72$ et LRT $X^2_1 = 1,3$, $P = 0,26$, respectivement).

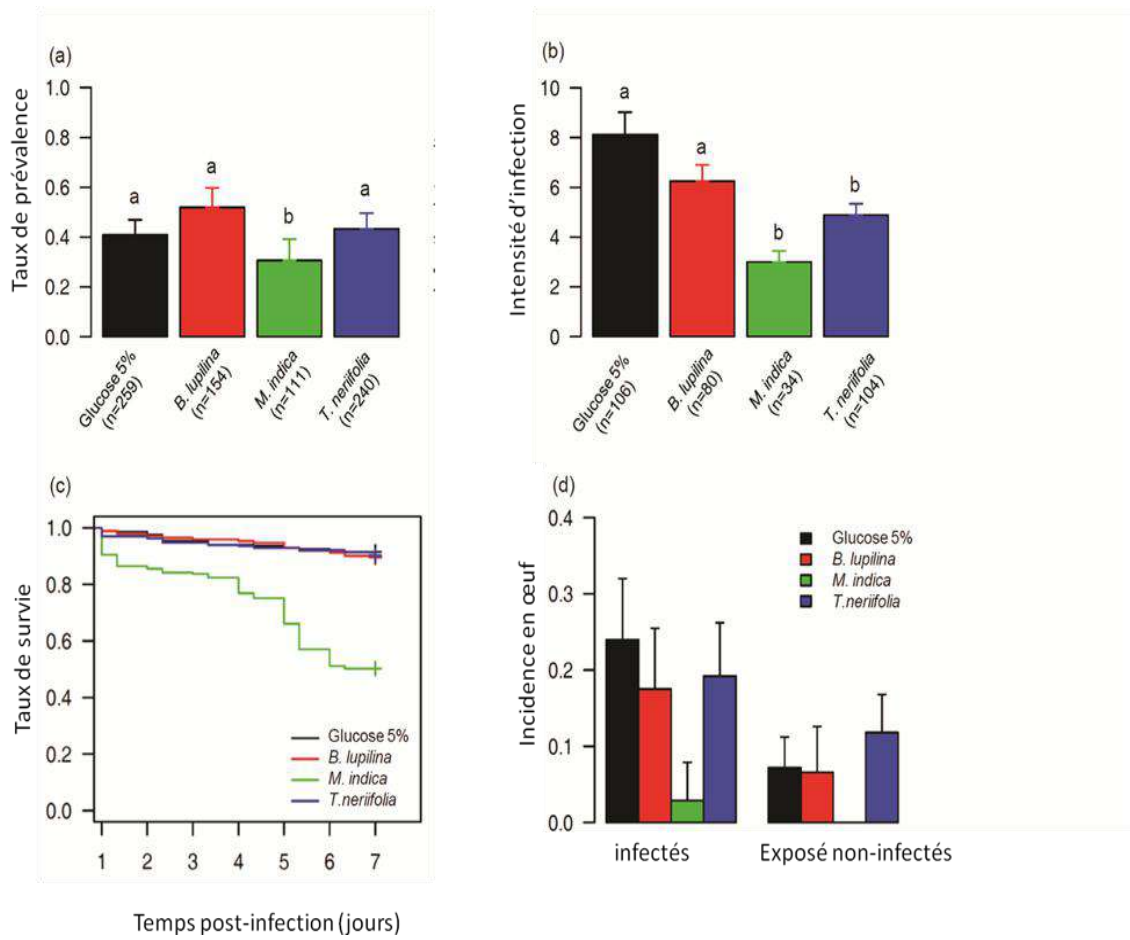


Figure 15: Effet des traitements de sucre sur le développement de la phase oocyste des moustiques, *Anopheles coluzzii* exposés au *P. falciparum*, et sur leur longévité et fécondité

1.3.2 Les sucres végétaux influencent l'indice sporozoïtique et le PIE

Un total de 235 sur 420 (56%) *An. coluzzii* hébergeaient des sporozoïtes à 14 JPI. Le traitement de sucre a eu un effet significatif sur l'index de sporozoïtes (5% de glucose: $42 \pm 17\%$, *L. microcarpa* $63 \pm 7\%$, *B. lupulina*: $60 \pm 8\%$, *T. nerifolia*: $40 \pm 10\%$; LRT $X^2_3 = 15$; $P = 0,002$; Figure 16a), avec les moustiques nourris sur *T. nerifolia* étant moins susceptibles d'abriter des sporozoïtes disséminés (Figure 16a). La gamétocytemie a eu une influence positive sur l'index de sporozoïtique (LRT $X^2_1 = 4$, $P = 0,046$), et il y avait une interaction non significative entre la gamétocytemie et le traitement du sucre ($X^2_3 = 7$, $p = 0,07$). Nous avons également constaté un effet du traitement du sucre sur la survie des moustiques (LRT $X^2_3 = 26$; $P < 0,001$, Figure 16b) avec les moustiques vivant plus longtemps lorsqu'ils sont nourris avec *B. lupulina* (51% moustiques survivant à 14 JPI) suivi par *L. microcarpa* (42%), 5% de glucose (39%) et *T. nerifolia* (34%).

Les moustiques ont été échantillonnés au cours du temps (entre 9 à 13 JPI) et, la présence de sporozoïtes dans la tête et le thorax a été diagnostiquée par la PCR. Les sporozoïtes ont été observés dès 9 JPI (indice sporozoïtique de 5, 10, 15 et 25% chez les moustiques nourris avec *T. neriifolia*, 5% de glucose, *L. microcarpa* et *B. lupulina*, respectivement, Figure 16c). Des différences significatives d'index sporozoïtique entre les traitements de sucre ont été observées à partir de 10 à 14 JPI, indiquant que la dynamique temporelle de la dissémination des sporozoïtes a été modifiée (Figure 16c, des différences statistiquement significatives sont notées avec * pour chaque jour d'échantillonnage). Comme attendu, il y a eu un effet significatif du temps, avec un index sporozoïtique qui augmente au fil du temps (LRT $X^2_3 = 19,8$, $P = 0,0002$).

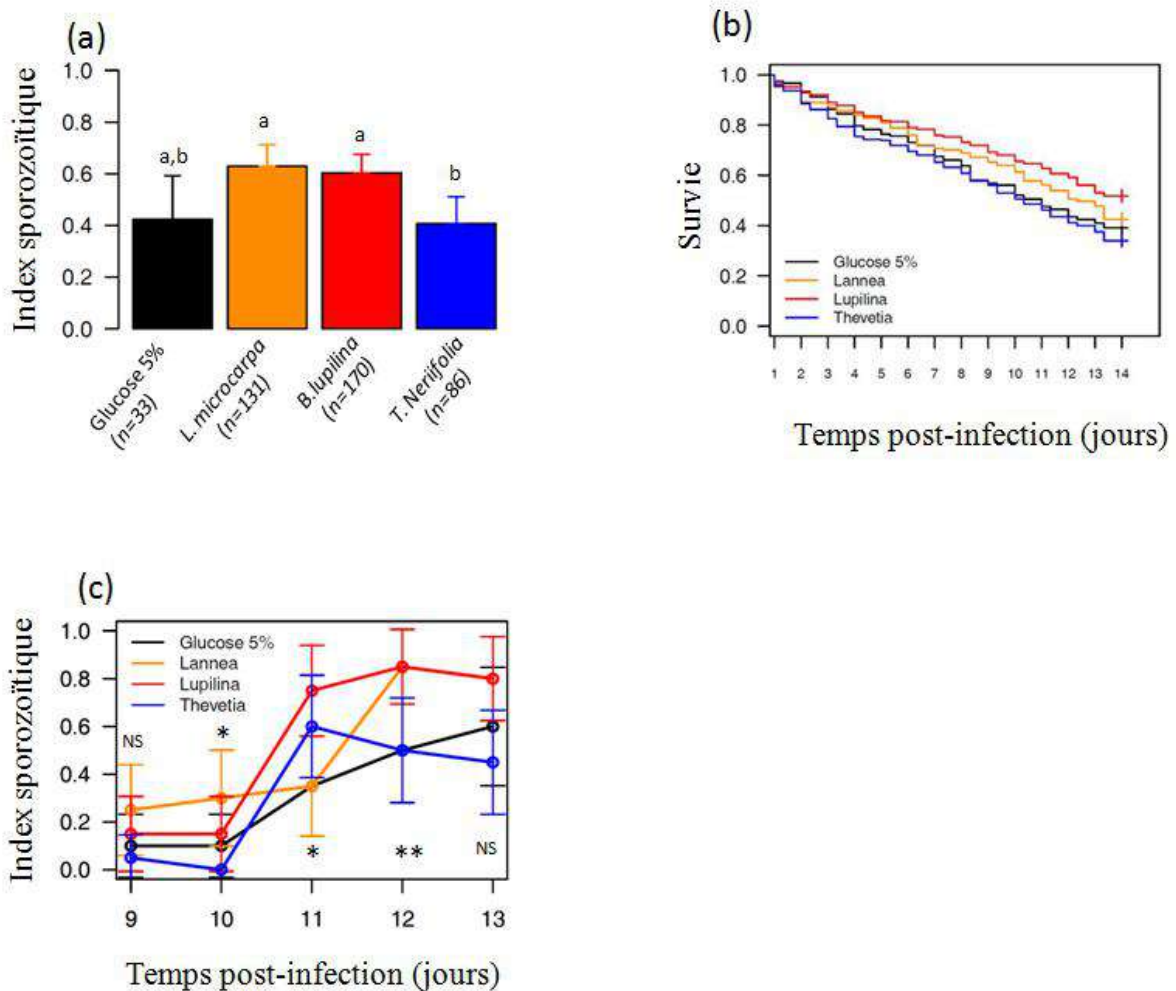


Figure 16: Effet des traitements de sucre sur l'index sporozoïtique, la survie des moustiques jusqu'en phase sporozoïte et la période d'incubation extrinsèque

1.3.3 Les sucres végétaux influencent de manière similaire la longévité des moustiques infectés et des moustiques non-infectés

L'expérience précédente a montré une réduction de l'index sporozoïtique lorsque les moustiques se nourrissent sur *T. neriifolia* (Figure 15a). Bien que cela puisse être un effet direct de la plante sur le développement du parasite et la dissémination des sporozoïtes, cette observation est également compatible avec une augmentation de la mortalité des individus infectés par rapport à leurs homologues exposés non infectés. En d'autres termes, il pourrait y avoir une interaction entre l'infection et le traitement de sucre, de telle sorte que les moustiques infectés souffrent d'une mortalité accrue lorsqu'ils sont élevés sur *T. neriifolia*, et donc présentent une réduction de l'index sporozoïtique à 14 JPI. Par conséquent, nous avons évalué la longévité des moustiques en utilisant un plan factoriel, en croisant chaque état d'infection (infectés au *P. falciparum* ou exposés non infectés ou témoin non infecté) avec chaque traitement de sucre. Les moustiques témoins, non infectés ont reçu un repas de sang traité thermiquement comme décrit dans le chapitre 2 paragraphe 1.2.2. Le statut de l'infection n'a eu aucun effet sur la durée de vie des moustiques (durée de vie moyenne \pm SE, témoin non infecté: $16,4 \pm 0,8$ jours, exposés non infectés: $16,94 \pm 1,3$ jours, infectés: $15,67 \pm 0,99$ jours; LRT $X^2_2 = 1$; $P = 0,6$, Figure 17). Surtout, bien que la longévité des moustiques a varié considérablement selon les traitements de sucre (LRT $X^2_3 = 160$; $P < 0,001$, Figure 17), il n'y a pas eu d'interaction entre le traitement de sucre et l'infection (LRT $X^2_6 = 4,8$; $P = 0,56$, Figure 17), ce qui démontre que le traitement de sucre a affecté la longévité des moustiques indépendamment de leur statut d'infection. De plus, nous avons analysé l'effet du statut d'infection sur la longévité, uniquement, sur les moustiques nourris sur *T. neriifolia* et nous n'avons trouvé aucune différence significative (LRT $X^2_2 = 1,6$; $P = 0,4$). Cela suggère que la réduction observée de l'indice de sporozoïtes de moustiques nourris sur *T. neriifolia* ne résulte pas d'une virulence accrue du parasite sur la durée de vie des moustiques.

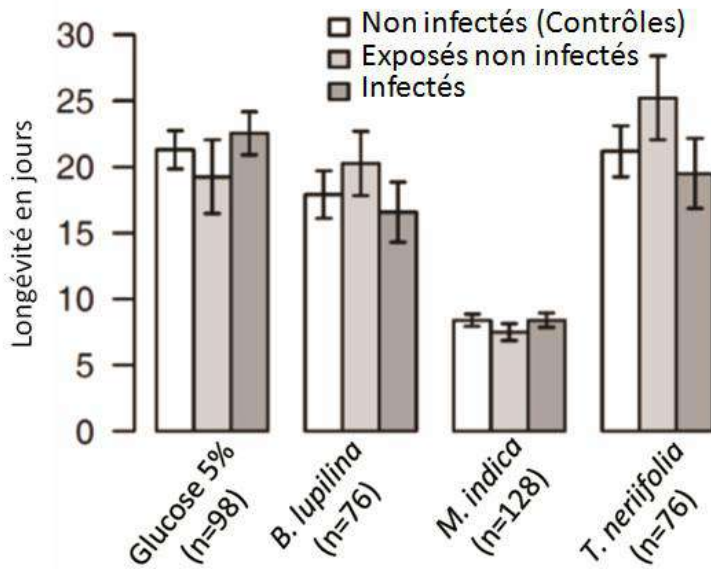


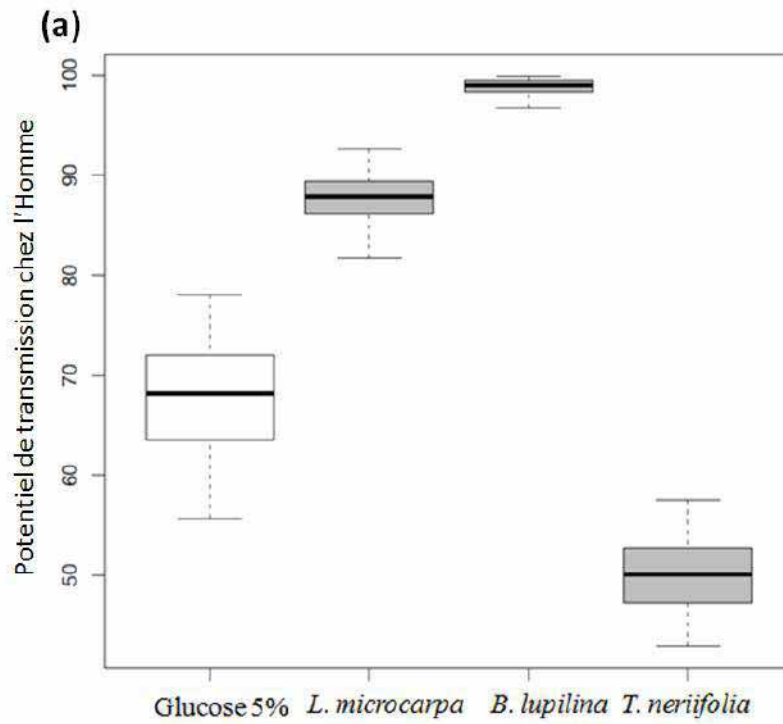
Figure 17: Effets des traitements de sucre et du statut d'infection sur la longévité des moustiques

1.3.4 Les sucres végétaux affectent l'intensité de la transmission du paludisme

Nous avons évalué l'impact de la diversité des plantes sur la transmission du paludisme en estimant les tailles épidémiques dans une population humaine (c-à-d le nombre d'infections secondaires causées par une personne infectée au cours d'une saison de transmission) en utilisant un modèle déterministe *Susceptible-Infectious-Recovered* (SIR), adapté à nos données expérimentales. Notre modèle a intégré des probabilités de distributions pour les principaux paramètres de l'infection et de la transmission, y compris la longévité des moustiques et le potentiel infectieux pour chaque espèce de plante.

Le résultat épidémiologique prédit par le modèle pour chacune des espèces de plantes considérées en isolation est conforme aux attentes intuitives (Figure 18a). Par rapport au scénario de base avec une solution de glucose 5%, *L. microcarpa* et *B. lupulina* ont causé un potentiel accru de transmission en raison d'une compétence vectorielle plus élevée ainsi que d'une plus longue période infectieuse (longévité). En revanche, *T. neriiifolia* provoque un potentiel de transmission plus faible, principalement en raison d'une compétence inférieure. Lorsque l'on considère ces effets individuels dans une perspective communautaire, avec des proportions variables de chaque espèce végétale, des résultats contrastés sont apparus (Figure 18b). Nous avons supposé que les moustiques ne présentent pas de préférence pour les espèces végétales et donc que le choix de l'alimentation était uniquement dépendant de

l'abondance relative des plantes. Tout d'abord, en considérant les communautés végétales des zones urbaines, le potentiel de transmission du paludisme a été largement influencé par l'abondance relative des plantes (Figure 18b). Dans ce contexte, une augmentation de la diversité végétale conduit à une diminution relative de l'abondance de *T. neriifolia* et résulte donc en des niveaux plus élevés de transmission.



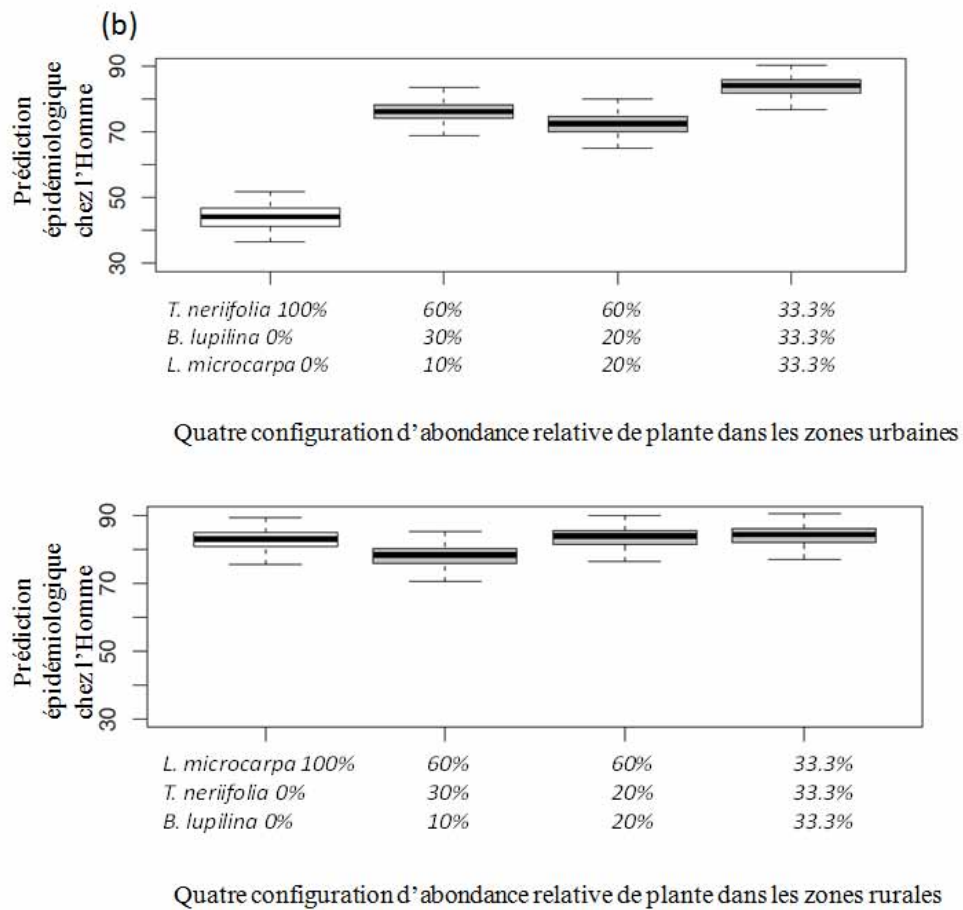


Figure 18: Différence théorique dans la distribution épidémiologique en fonction de l'abondance relative des plantes

1.3.5 Résultats du test d'antrone

Les analyses ont montré des effets significatifs du traitement sur le nombre de moustique ayant pris un repas de sucre de végétaux ($X^2_1 = 91,48$; $P < 0,0001$), voir proportion de moustiques positives au test d'antrone dans le tableau II).

Tableau II: Proportion de moustiques positifs au test d’anthrone ayant pris un repas de sucre de plantes après deux jours de contact.

Traitement	Total	Positive	Negative	Proportion positive
<i>Barleria lupulina</i>	25	23	2	0.92
<i>Lannea microcarpa</i>	25	25	0	1.00
<i>Mangifera indica</i>	25	22	3	0.88
<i>Thevetia neriiifolia</i>	25	23	2	0.92
5% glucose	25	0	25	0.00

1.3.6 Résultats des effets des sucres de plantes sur la taille du repas de sang

L’analyse de l’effet des sucres végétaux pris par les moustiques sur la concentration de l’hématine a été réalisée, en comparant la quantité de l’hématine en microgramme par millilitre issue des différents traitements. Une analyse statistique a été menée sur la base du test de Turkey HSD, et les différentes lettres sur les bars montrent les différences significatives (Figure 19). Aussi, un effet significatif global des traitements sur la concentration de l’hématine a été trouvé (ANOVA, $F_{3,85}=3.8$, $P=0.02$) (Figure 19).

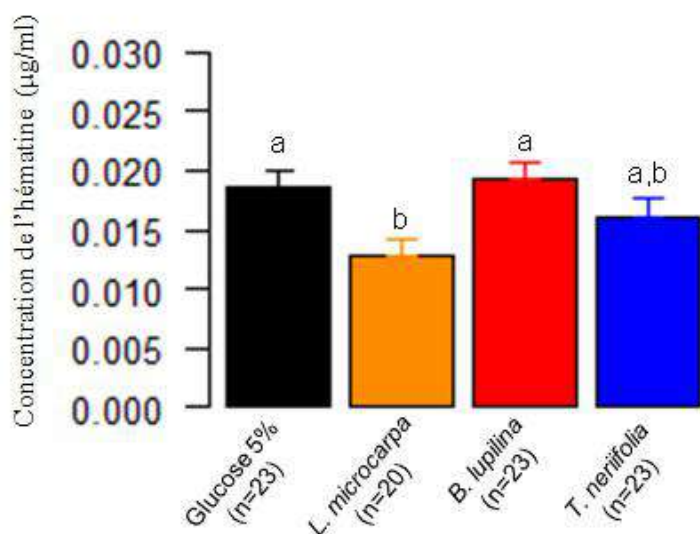


Figure 19: Concentration de l'hématine en fonction des traitements de plantes reçus

1.4 Discussion

Nos données montrent que les sucres végétaux peuvent influencer les traits clés qui affectent la capacité des moustiques à transmettre le paludisme, incluant la longévité des moustiques et la susceptibilité à *P. falciparum*. Intégrés dans un modèle épidémiologique, ces effets ont des conséquences importantes sur la transmission du paludisme. Comparés aux moustiques témoins nourris avec une solution de glucose 5%, les individus nourris avec *T. nerifolia* ont montré une diminution de 30% du potentiel de transmission du paludisme. En revanche, les moustiques nourris avec *L. microcarpa* et avec *B. lupulina* ont montré respectivement une augmentation de 30 et 40% du potentiel de transmission. À ce jour, plusieurs travaux ont révélé divers effets des sucres végétaux sur la physiologie et le comportement des moustiques : ils fournissent de l'énergie pour le vol, augmentent la fécondité et la survie des moustiques et peuvent diminuer le taux de piqûres sur les hôtes vertébrés (Stone and Foster, 2013; Zhu *et al.*, 2015). Nos résultats ajoutent un effet d'importance épidémiologique en montrant que les sucres d'origine végétale peuvent moduler les interactions moustiques-*Plasmodium*.

Les effets induits par les plantes sur l'infection n'étaient pas attribués à une variation de la taille du repas de sang (Figure 19). L'assimilation d'une grande quantité de sang infecté par le moustique peut induire l'ingestion dans son estomac d'un nombre plus élevé de gamétocytes (Pichon *et al.*, 2000) et donc une possibilité d'augmentation de l'infection. Nous

avons testé si les sources de sucres pouvaient influencer la taille du repas de sang chez les moustiques. Les moustiques qui s'étaient nourris sur *L. microcarpa* avant le repas de sang prenaient en général une petite quantité de sang par rapport aux moustiques qui s'étaient nourris sur le glucose 5% ou *B. lupulina* (Figure 19). Ainsi, l'infection des moustiques nourris sur *L. microcarpa* a été plus faible que ceux nourris sur le glucose 5% ou *B. lupulina* (Figure 16a).

Au moins trois mécanismes, non mutuellement exclusifs pourraient expliquer les effets des traitements de plantes sur la compétence de moustiques pour *P. falciparum*. Tout d'abord, il peut y avoir des effets négatifs directs des métabolites secondaires des plantes (par exemple, les alcaloïdes, les terpènes, les glycosides) sur le développement du parasite. Les composés secondaires jouent généralement un rôle dans la défense des plantes contre les herbivores et la plus part a tendance à être toxique et à réduire le taux de survie et la fécondité de l'hôte (Ode, 2006; Stam *et al.*, 2014). Ces substances chimiques ne sont pas seulement trouvés dans les feuilles, mais peuvent aussi être présents dans les nectars de fleurs et des fruits charnus (Adler 2001; Whitehead & Bowers 2013). Chez les bourdons par exemple, l'ingestion d'alcaloïdes, de terpénoïdes et de glycosides iridoïdes contenus dans les nectars floraux peuvent réduire l'infection par le protozoaire parasite, *Crithidia bombi* (Manson *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2015). Deuxièmement, les plantes peuvent augmenter ou réduire l'infection en modulant la condition énergétique de l'hôte (Cressler *et al.*, 2014). L'ingestion de ressources de mauvaise qualité peut procurer moins d'énergie pour le développement du parasite et donc limiter l'infection (Hall *et al.*, 2009). Troisièmement, les plantes peuvent exercer une influence indirecte sur l'infection par des effets sur la réponse immunitaire de l'hôte. Comme les défenses immunologiques sont énergétiquement coûteuses, les hôtes moustiques en mauvaise condition peuvent avoir une moindre résistance aux parasites (Sheldon and Verhulst, 1996). Dans nos expériences, les moustiques nourris avec des fruits de mangue ou avec des fleurs de *T. neriifolia* présentaient une survie et, une fécondité faible, et une susceptibilité réduite à l'infection, corroborant ainsi les deux premiers mécanismes. *T. neriifolia* contient des glycosides cardiaques toxiques et les mangues contiennent des composés phénoliques dont la mangiférine, deux métabolites secondaires soupçonnés d'avoir de fortes propriétés anti-protozoaires (Lefèvre *et al.* 2010; Gowler *et al.* 2015; Ibrahim & Mathew 2014). En plus, des études précédentes ont démontré que les parasites responsables du paludisme ont besoin des sucres provenant du vecteur pour un développement optimal (Liu *et al.*, 2013; Mack *et al.*, 1979). Les relations entre la nutrition, la condition générale de l'hôte,

les toxines chimiques et l'infection sont complexes (Mason and Singer, 2015; Ponton et al., 2011), et d'autres études sont nécessaires pour déterminer si *T. neriifolia* et *M. indica* ont des activités anti-*Plasmodium* ou ont une très faible valeur nutritive qui limite le développement du parasite et la valeur sélective de l'hôte. Le traitement des plantes a été continuellement fourni dans notre étude, ainsi il sera aussi important de déterminer si ces effets résultent de l'ingestion des sucres avant (effets prophylactiques) ou après (effets thérapeutiques) l'infection.

Dans les conditions naturelles, la fréquence de contact entre un moustique et une source naturelle de sucre dépendra de la préférence innée de l'insecte pour ces plantes et des facteurs exogènes comme la disponibilité et l'accessibilité de celles-ci. Notre plan expérimental n'a pas permis aux moustiques de choisir entre les différentes plantes. Avec le modèle épidémiologique, nous avons simulé différents scénarios d'abondance relative de plante soit en milieu urbain (où *T. neriifolia* est relativement dominante) soit en milieu rural (où *L. microcarpa* est relativement dominante). Nos résultats indiquent qu'il existe en effet des différences épidémiologiques dans les zones urbaines où une petite diminution dans l'abondance de *T. neriifolia* pourrait mener à une augmentation importante de la transmission du paludisme. Au contraire, dans les zones rurales, une diminution de l'abondance de *L. microcarpa* en faveur de *T. neriifolia* aurait seulement un petit impact négatif sur la transmission de la maladie (c'est-à-dire un effet de dilution faible (Ostfeld and Keesing, 2011)).

Bien que nous n'avons pas trouvé de réduction significative de la longévité du moustique ou de la fécondité chez les moustiques infectés, des études précédentes ont démontré que le parasite peut avoir un coût sur les moustiques, particulièrement dans des conditions stressantes (Sangare et al. 2014; Ahmed & Hurd 2006). En plus des défenses immunologiques, les insectes peuvent développer des défenses comportementales incluant l'automédication pour mieux résister ou tolérer leurs parasites (De-Roode & Lefèvre 2012; De-Roode et al. 2013). A l'inverse, les parasites responsables du paludisme pourraient manipuler la préférence du moustique pour les plantes de manière à favoriser leur propre développement et leur transmission (Lefèvre and Thomas, 2008; Lefèvre et al., 2013). Une étude récente a constaté que l'infection avec *P. falciparum* augmente l'attraction des *An. gambiae* pour les sources de nectar (Nyasembe et al. 2014). Alors, il serait intéressant de mieux examiner le coût sur la *fitness* et les avantages des moustiques à se nourrir sur ces sources naturelles de nectar et d'étudier la préférence des moustiques infectés versus non

infectés pour ces plantes. Cela nous permettra de déterminer si les moustiques vecteurs ou le parasite, *P. falciparum*, peuvent exploiter les sources naturelles de sucres respectivement pour l'automédication ou pour manipuler le comportement des moustiques vecteurs pour le choix des plantes.

L'interaction entre les parasites responsables du paludisme et les moustiques vecteurs a attiré l'attention pour des interventions possibles en vue d'empêcher la transmission de ce pathogène. Nos résultats ont plusieurs implications pour le contrôle de cette maladie. Au laboratoire, un certain nombre de stratégies de manipulations génétiques sont maintenant disponibles pour réduire la compétence vectorielle des moustiques (moustiques transgéniques réfractaire) (Isaacs *et al.*, 2011; Wang and Jacobs-Lorena, 2013). De plus, l'utilisation de vaccins bloquant la transmission du *P. falciparum* à différents stade de développement chez le moustique représente une stratégie prometteuse (Wu *et al.*, 2015). Cependant, avant le transfert de ces découvertes en conditions naturelles, il sera crucial de déterminer comment l'expression des transgènes ou l'efficacité des vaccins sont affectées par la diversité des sources naturelles de nectar. Finalement, quelques nouvelles perspectives pour le contrôle du paludisme à long terme peuvent inclure la culture des plantes anti-*Plasmodium*. Concrètement, favoriser la plantation d'espèces de plante comme le *T. neriifolia*, qui est généralement utilisée par les moustiques et qui affecte négativement la capacité vectorielle, peut réduire localement la transmission du paludisme.

1.5 Conclusion partielle

La présente étude a montré que les sources naturelles de nectar de plantes peuvent moduler l'issue de l'infection des moustiques femelles avec *P. falciparum* et affecter certains traits d'histoire de vie tels que la fécondité, la longévité et la quantité de repas de sang prise par les moustiques femelles. Même si nous n'avons pas pu trouver dans cette étude une plante «magique» qui pourrait bloquer totalement le développement du parasite chez le moustique, il sera important de continuer à investiguer sur une plus large gamme d'espèces de plantes. Enfin, la connaissance des propriétés de ces plantes sur la longévité, la compétence et la capacité vectorielle est une aubaine pour tester au laboratoire avec un protocole bien défini le choix des moustiques infectés avec le *P. falciparum* parmi ces plantes.

ACTIVITE DE RECHERCHE 2

Influence de l'infection du moustique, *Anopheles coluzzii* avec *Plasmodium falciparum* sur le choix des sources naturelles de nectar²

2.1 Introduction

Les espèces de *Plasmodium* sont reconnus pour modifier le comportement de leurs moustiques vecteurs (Heil, 2016). Par exemple, l'attraction des moustiques à l'hôte humain est réduite lorsqu'ils sont infectés par les stades oocystes du *Plasmodium* et augmente lorsqu'ils sont infectés par les stades sporozoïtes (Cator et al., 2013; Koella et al., 1998; Smallegange et al., 2013).

Pourtant en conditions naturelles, en plus du repas de sang, les femelles de moustiques prennent un repas de jus sucré sur les sources naturelles de nectar (Beier, 1996). Cependant, très peu d'informations existent sur l'influence de l'infection sur les interactions moustiques-plantes. Est-ce que les moustiques sains et infectés répondent de la même manière aux stimuli provenant des plantes? A notre connaissance une seule étude s'est intéressée à cette question. Nyasembe et al. 2014 ont montré que, comparés aux *An. gambiae* sains, les moustiques infectés par les stades oocystes et sporozoïtes de *P. falciparum* exprimaient une augmentation d'attraction pour les odeurs de plantes de 30 et 24% respectivement. Ces résultats indiquent un possible ajustement physiologique d'*An. gambiae* à l'infection par *P. falciparum* pour augmenter la transmission.

Cependant, cette étude n'a pas exploré la possibilité que les moustiques sains et infectés expriment des préférences variables pour différentes espèces de plantes. Nous avons montré précédemment que certaines plantes augmentent tandis que d'autres diminuent l'infection (activité de recherche 1, Hien et al. 2016). Dans ce contexte, il paraît important d'examiner dans quelle mesure l'hôte et le parasite sont capables d'exploiter les plantes dans leur propre intérêt (manipulation parasitaire ou automédication). En d'autres termes, les moustiques sont-ils capables de choisir les espèces de plantes qui leur permettront de mieux combattre l'infection (auto-médication) ou les parasites sont-ils capables d'influencer

² Cette activité de recherche fait l'objet d'une publication en préparation : Hien DFdS, Dabiré KR, Roche B, Diabaté A, Yerbanga SR, Cohuet A, Yameogo BK, Gouagna L-C, Hopkins RJ, Ouedraogo GA, Simard F, Ouedraogo J-B, Ignell R, Lefevre T. 2016. Influence of malaria infection on mosquito preference for natural nectar sources. In prep.

indirectement le choix des espèces de plantes qui leur permettront un développement optimal (manipulation parasitaire) ?

Pour vérifier cette hypothèse nous avons utilisé les plantes (*B. lupulina* et *T. neriifolia*) et un fruit (*L. microcarpa*) ayant des effets sur la compétence et la capacité vectorielle des moustiques *An. coluzzii* infectés avec *P. falciparum* (Hien *et al.*, 2016). Pour cela, nous avons infecté des femelles d'*An. coluzzii* avec des isolats naturels de *P. falciparum* et, mener une série d'expériences en fonction des jours de post-infection et les phases du développement parasitaire chez les moustiques. Des lâchers de moustiques infectés et non infectés ont été faits dans cinq grandes cages contenant chacune cinq pièges, assignés à une plante donnée afin d'évaluer le comportement d'automédication chez les moustiques.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Infection expérimentale

Les moustiques d'*An. coluzzii* ont été infectés expérimentalement comme décrit dans le chapitre 2 paragraphe 1.2.2. Pour cette étude, deux infections expérimentales ont été réalisées avec le sang de deux porteurs différents avec respectivement 216 et 136 gamétocytes par microlitre (μl) de sang. Les moustiques ont été répartis en deux groupes pour chaque porteur: un premier groupe qui recevait le sang infectieux (groupe exposé) et un autre recevant le sang infectieux inactivé (groupe contrôle). Après le repas de sang, 4 groupes ont donc été obtenus: les femelles de moustiques ayant pris (i) un repas de sang infectieux provenant du porteur 1 de gamétocytes (groupe 1 de moustiques exposés), (ii) un repas de sang non infectieux du porteur 1 (groupe 1 de moustiques contrôles), (iii) un sang infectieux issu du porteur 2 de gamétocytes (groupe 2 de moustiques exposés), (iv) un repas de sang non infectieux provenant du porteur 2 (groupe 2 de moustiques contrôles). Les moustiques non gorgés ou partiellement gorgés ont été écartés. Les différents groupes ont été gardés séparément dans des cages de 30 cm x 30cm x 30cm avec du coton imbibé d'une solution de glucose 5% et maintenus des conditions standards d'insectarium ($27 \pm 2^\circ\text{C}$ de température, $70 \pm 5\%$ d'humidité relative et, 12:12 NJ de photopériode).

2.2.2 Etude du comportement de choix des sucres végétaux

Pour déterminer l'impact de l'infection sur le comportement de choix des sucres, les réponses des moustiques aux différents traitements de sucre ont été étudiées, en utilisant des pièges.

Les expériences ont été conduites avec différents lots de moustiques (i) âgés de deux jours, (ii) âgés de sept jours et (iii) âgés de quatorze jours post-infection (PPI). Ces différentes périodes de test correspondaient aux différentes phases de développement du parasite, respectivement, la phase d'implantation des oocystes entre les cellules épithéliales et la lamina basal de l'estomac des moustiques (qui dure entre 24-72 heures post-infection), la phase de multiplication et de maturation des oocystes (3-10 JPI) et, la libération des sporozoïtes dans les glandes salivaires (10-14 JPI). Au cours de ces différentes périodes de tests, les moustiques ont été maintenus dans des cages de 30 cm x 30 cm x 30 cm avec une solution du glucose 5%. Le matin du jour de test, quelques moustiques ont été retirés des cages et colorés avec trois poudres de couleurs différentes (Luminous Powder Kit, BioQuip) correspondantes aux différents groupes (par exemple, jaune pour le groupe 1 de moustiques contrôles, bleu pour le groupe 1 de moustiques exposés, rouge pour le groupe 2 de moustiques contrôles, et aucune couleur pour le groupe 2 de moustiques exposés) et placés dans des gobelets en carton avec de l'eau seulement. La correspondance entre les groupes et les couleurs a été alternée entre chaque cage de libération ($n=5$) et chaque période de test (2, 7 et 14 jpi). A 18h, environ 80 moustiques ont été libérés dans une des 5 grandes cages de 1m^3 pour toute la nuit (Figure 20A): 20 moustiques exposés du groupe 1 + 20 moustiques contrôles du groupe 1 + 20 moustiques exposés du groupe 2 + 20 moustiques contrôles du groupe 2. A l'intérieur de chaque grande cage de libération, 5 pièges à odeurs de 15cm^3 ont été positionnés au sol (Figure 20B). Ces pièges contenaient un des cinq traitements suivants: (i) *Thévetia neriifolia*, (ii) *Barleria lupulina*, (iii) *Lansea microcarpa* (Figure 21a, b, c), (iv) une solution de glucose 5% (Figure 21d), et (v) de l'eau comme contrôle (Figure 21e). La moustiquaire des pièges a été relevée d'environ 3 cm du sol de telle sorte à permettre aux moustiques de rentrer. Pendant le test, les moustiques qui ont été attirés par les plantes sont rentrés dans le piège à travers l'espace de 3 cm. Bien que peu probable, on ne peut totalement exclure la possibilité que les moustiques qui entraient dans un piège donné ressortaient dans la grande cage ou dans un autre piège. Le lendemain autour de 6h du matin à la fin du test, les moustiques ont été collectés dans les pièges avec un aspirateur à bouche et comptés. La température dans la pièce de test était de $27,5 \pm 2,5$ °C et l'humidité relative de 70 ± 10 %. La position des pièges étaient alternés entre les grandes cages et entre les périodes de tests pour éviter un effet position.

Au cours de cette étude deux traits comportementaux ont été mesurés: le *taux d'activation*= le nombre de moustiques capturés dans tous les pièges sur le nombre total de

moustiques relâchés; et l'*attraction relative*= le nombre de moustiques capturés par piège sur le nombre total de moustiques capturés dans tous les pièges.

Les moustiques utilisés pour le test de comportement à 2 JPI ont été gardés dans des gobelets en carton avec une solution de glucose 5% jusqu'à 7 JPI. La présence et le nombre d'oocystes ont été vérifiés par dissection des estomacs des moustiques utilisés pour les tests de 2 et 7 JPI. Les moustiques de 14 JPI ont été disséqués comme précédemment (chapitre 2) pour vérifier la présence des oocystes et de sporozoïtes dans les têtes/thorax par qPCR (Boissière *et al.*, 2013)



Figure 20: Dispositif comportemental utilisé pour étudier la préférence des moustiques pour les plantes (A) une grande cage de 1m^3 couverte par une tuile moustiquaire dans laquelle les moustiques ont été libérés. Dans chaque grande cage, 5 petites cages de 15cm^3 ont été disposées en guise de pièges. (B) Une vue de côté d'une petite cage de 15cm^3 . La moustiquaire a été soulevée d'environ 3 cm à la base de telle sorte à permettre aux moustiques d'entrer dans le piège.

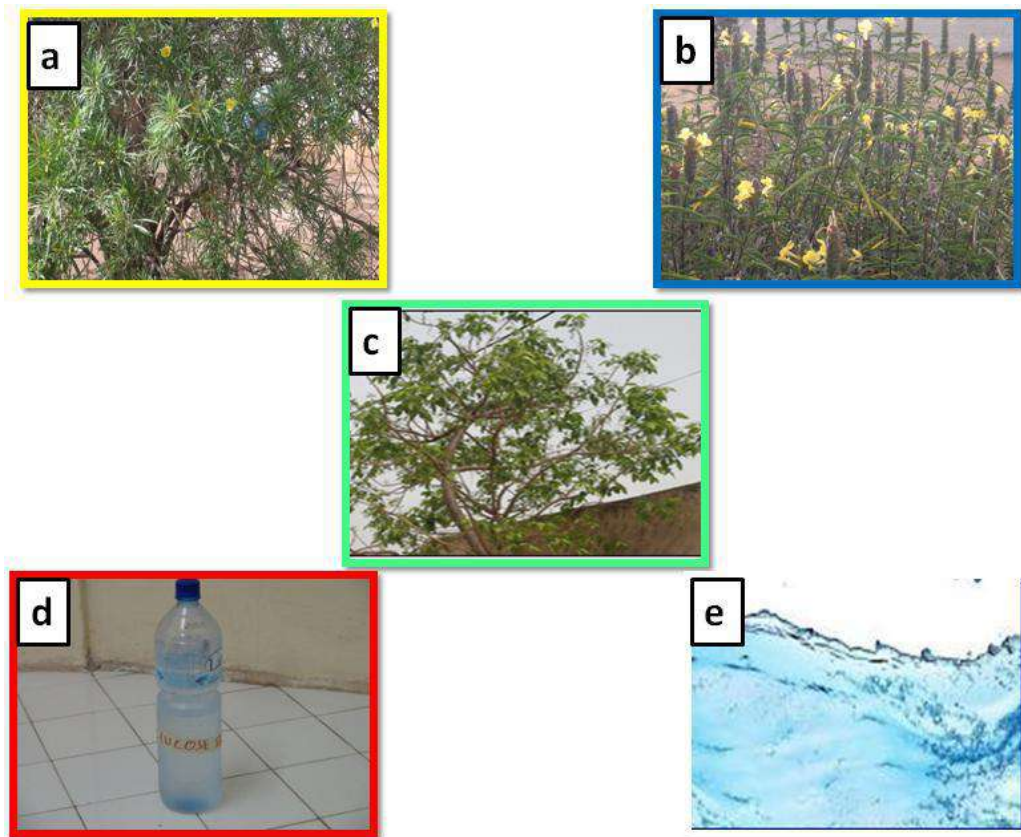


Figure 21 : Traitements utilisés au cours des expériences. *Thevetia nerifolia* (synonyme: *Thevetia peruviana*. *Casacabela thevetia*; nom commun: Laurier jaune appartient à la Famille des *Apocynaceae*) est un arbuste tropical à feuilles persistantes ou petit arbre (peut atteindre 6 mètres de long), originaire du centre de l'Amérique du Sud. Les lauriers jaunes sont communs et répandus dans les villages et les villes de l'Afrique occidentale où il est surtout utilisé comme une haie de cour. (b) *Barleria lupulina* (synonyme: *Barleria macrostachys*; nom commun: Herbe tac-tac appartient à la Famille des *Acanthaceae*) est un arbuste ornemental (Environ 1.5 m) commun dans des villes et les villages de l'Afrique occidentale, originaire de Madagascar. Ces feuilles sont utilisées pour traiter les morsures de serpents, elles sont pilées et appliquées sur la morsure. Elles sont utilisées aussi pour traiter les furoncles, les blessures (c) *Lannea microcarpa microcarpa* (synonyme: *L. microcarpa acida*. *L. microcarpa djalonica*; nom commun: Raisin Africain, appartient à la Famille des *Anacardiaceae*) c'est un arbre (d'environ 15 m de haut) indigène de l'Afrique de l'Ouest. C'est une espèce qui n'est pas cultivée, elles se propagent naturellement dans la végétation de savane et peuvent arriver dans des villages et les villes de l'Afrique de l'Ouest.

2.2.3 Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel R (version 2.15.3). La régression logistique par des Modèles Mixtes Linéaires Généralisés (en anglais, Generalized Linear Mixed Models: GLMM) (fonction `glmer` dans le répertoire `lme4`) a été utilisée pour explorer l'effet de la période de test (trois niveaux: aux jours 2, 7 et 14 post-infection) et le statut d'infection (deux niveaux : infectés versus non infectés) sur l'*activation*. Dans ce GLMM, le statut d'infection, la période de test et leur interaction ont été inclus comme effets fixes, tandis que la cage (1 à 5 cage) et le porteur de gamécyte (infection 1 et 2) étaient codés comme des effets aléatoires.

Un GLMM avec une distribution Gaussienne (fonction lmer dans le répertoire lme4) a été utilisé pour tester les effets de la période de test, du statut d'infection et du traitement de sucre sur l'*attraction relative* après transformation *arc sine*. Dans ce GLMM, le statut d'infection, la période de test, le traitement de sucre et leurs interactions ont été inclus comme des effets fixes, tandis que la cage et le porteur de gaméocyte ont été codés comme des effets aléatoires.

2.3 Résultats

2.3.1 Infection

Au total 316 moustiques ont été exposés au sang infectieux au cours de l'infection n°1, dont 277 ont été infectés avec succès (prévalence = $0,88 \pm 0,036$). La prévalence pour l'infection n°2 a été de $0,7 \pm 0,005$ (222/319 moustiques). Le nombre moyen d'oocystes était de $19,8 \pm 1,31$ et de $11 \pm 1,22$ respectivement pour l'infection n°1 et 2. Les moustiques exposés au sang infectieux mais qui sont restés non-infectés ont été exclus des analyses statistiques. Aucun oocyste n'était détecté dans les estomacs du groupe d'*An. coluzzii* non infecté contrôle.

2.3.2 Activation

Il n'y avait pas d'effet de l'infection sur l'activation des moustiques ($X^2_1 = 0.06$, $P = 0.8$, Figure. 22). Cependant, la période de test influençait significativement l'activation des moustiques (2 JPI: 0.333, 7 JPI: 0.329, 14 JPI: 0.405; $X^2_2 = 6.3$, $P = 0.04$), suggérant que les vieux moustiques tendent à s'activer plus que les jeunes moustiques. Il n'y avait pas d'effet du porteur de gaméocyte (infection 1 vs 2, $X^2_1 = 0.22$, $P = 0.6$, Figure.22) ni de l'interaction entre la période de test et le statut d'infection ($X^2_1 = 2.12$, $P = 0.35$). Enfin, il n'y avait pas d'effet significatif de l'intensité d'oocyste sur l'activation des moustiques ($X^2_1 = 1.6$, $P = 0.2$, Figure 23).

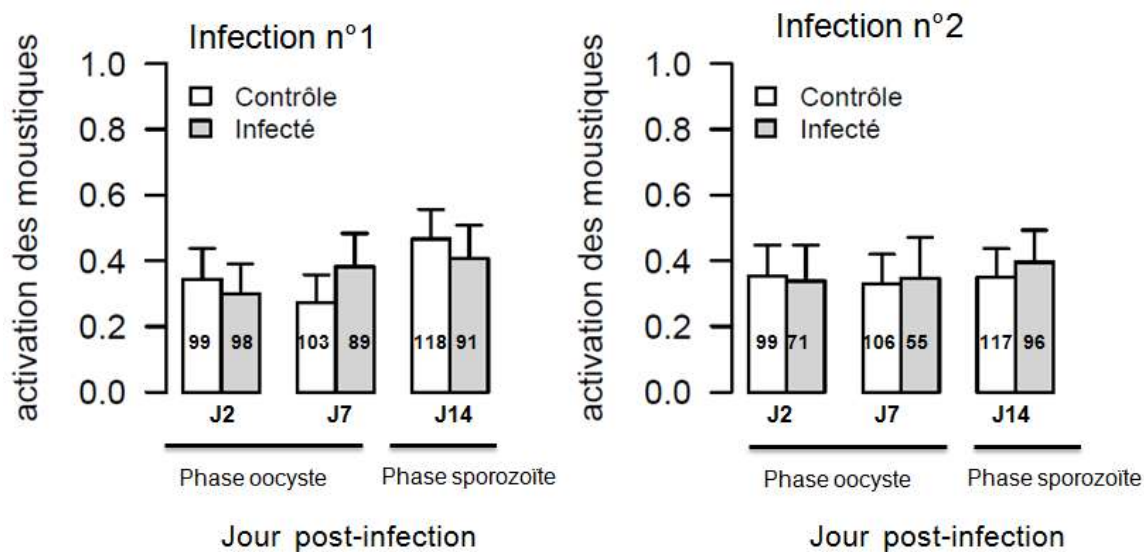


Figure 22: Activation des moustiques infectés et non infectés à trois périodes différentes pour l'infection n°1 et n°2. J2 et J7 correspondent à la phase de développement des oocystes et J14 à la phase transmissible (sporozoïtes dans les glandes salivaires) chez les individus infectés.

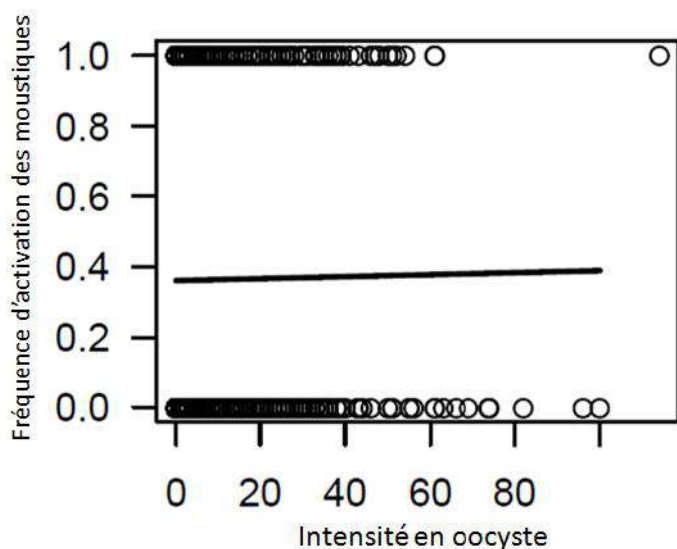


Figure 23: Relation entre l'activation des moustiques et l'intensité des oocystes

2.3.3 Attraction relative

Le traitement de sucre avait un effet significatif sur l'attraction relative ($X^2_4=30$, $P<0.0001$) indiquant que les moustiques exprimaient une préférence significative parmi les différents traitements (Figure.24). En particulier, *B. lupulina* attirait le plus de moustiques ($32 \pm 12\%$), suivi par *T. neriifolia* ($20 \pm 10\%$), glucose 5% ($19 \pm 9\%$), *L. microcarpa* ($16 \pm 9\%$) et le contrôle eau ($13 \pm 8\%$) (Figure 24). La préférence des moustiques pour ces différents

traitements n'était pas influencée par l'infection (i.e. pas d'interaction significative entre les traitements et l'infection, $X^2_4 = 3.9$, $P=0.41$), suggérant que les moustiques infectés et non infectés avaient les mêmes préférences parmi les traitements. Cependant, il y avait une interaction significative entre le traitement et la période de test ($X^2_8 = 19.7$, $P=0.012$), indiquant ainsi que la préférence des moustiques peut varier dans le temps (avec l'âge). Enfin, il n'y avait pas d'interaction entre l'infection et la période de test ($X^2_2 = 0.11$, $P=0.95$) et aucune interaction triple n'a été observée ($X^2_8 = 4.12$, $P=0.85$).

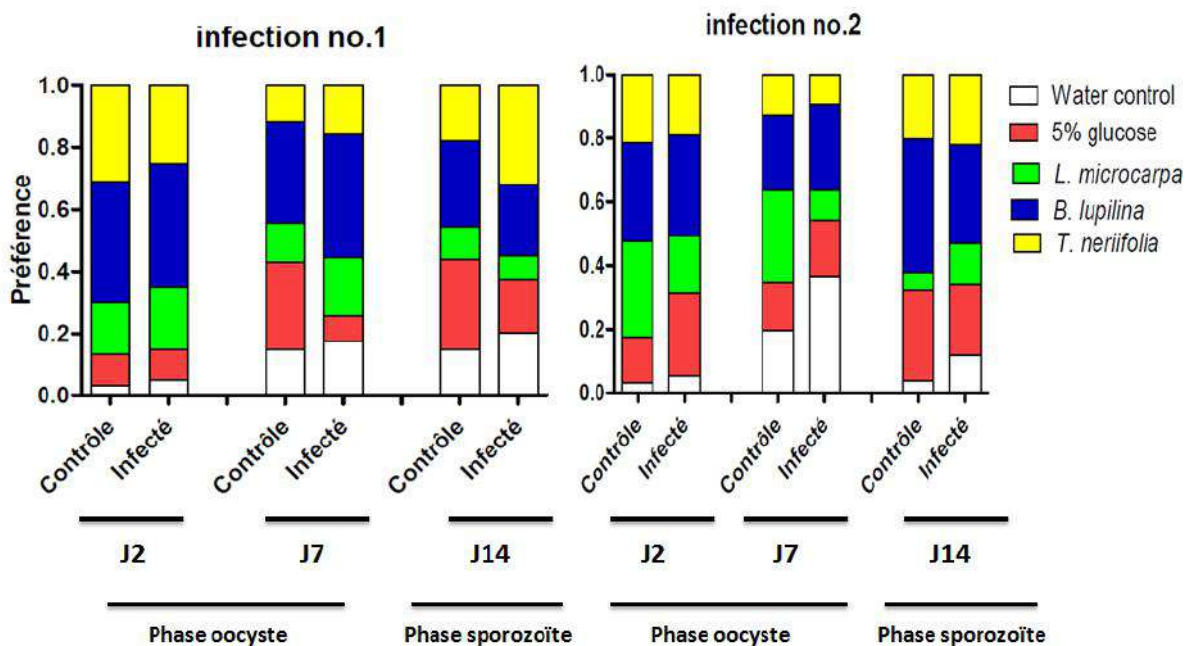


Figure 24: Attraction relative moyenne de chaque traitement de sucre pour les moustiques infectés et non infectés à trois périodes différentes pour l'infection n°1 et n°2

2.4 Discussion

Nos résultats montrent que l'âge peut être un facteur déterminant dans l'attraction des moustiques pour les plantes. Nous n'avons pas trouvé de différence dans le comportement entre les moustiques infectés et non infectés. Nos résultats ont été en contradiction avec une étude récente qui avait montré que les moustiques infectés avec *P. falciparum* étaient plus attirés par les plantes comparés aux moustiques non-infectés (Nyasembe et al. 2014). Alors, ces résultats pourraient suggérer que, la présence accrue des sources de nectar autour des habitations humaines pouvait avoir une part importante dans une lutte intégrée contre le paludisme. Par exemple, la pulvérisation de ces plantes avec des insecticides couplée à l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) en période de faible transmission pourraient avoir un impact considérable sur l'incidence palustre; du fait

que c'est la population de moustiques qui est épidémiologiquement dangereuse (i.e. la plus vieille) qui s'active le plus pour les sources de nectar.

Au moins trois hypothèses peuvent expliquer la motivation accrue des moustiques âgés à se nourrir sur les plantes: (i) les moustiques ont reçu au cours de l'infection expérimentale certains éléments nutritifs dans le sang qui ont diminué leur besoin en sucre entre J2 et J7 post-infection, (ii) les besoins nutritifs des moustiques pour les sources naturelles de sucre de nectar peuvent augmenter avec leur âge et cela pourraient se traduire par l'augmentation du budget énergétique global, (iii) enfin, les moustiques combattraient mieux les parasites au cours de la phase sporozoïte et auraient besoin d'un certain nombre d'éléments ou une certaine quantité en compensations. Par exemple, il a été montré que les *Culex pipiens* âgés de 17 jours s'infectaient moins que ceux âgés de 7 jours lorsqu'ils étaient exposés aux oiseaux (Canaries) infectés par *Plasmodium relictum* (Pigeault et al. 2015).

Le choix des sources naturelles de sucre de nectar pour cette étude avait pour objectif de vérifier l'automédication et la manipulation parasitaire des moustiques *An. coluzzii* infectés. Certaines de ces sources naturelles de sucre avaient démontré des propriétés anti-*Plasmodium* comme le *T. neriifolia* comparés à *B. lupulina* et *L. microcarpa* qui avaient tendance à augmenter l'infection (Hien et al. 2016, activité de recherche 1). Nos résultats indiquent que les moustiques infectés et non infectés avaient les mêmes préférences. Tous préféraient *B. lupulina* que *T. neriifolia* et *L. microcarpa*. Ainsi nos résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence le phénomène d'automédication ou de manipulation parasitaire chez les moustiques infectés.

Par contre, nous avons trouvé que les moustiques (infectés et sains) exprimaient une préférence pour certaines plantes. Cette discrimination des moustiques pour certaines plantes confirment plusieurs études précédentes (Manda et al. 2007a,b). En outre, *B. lupulina* pourrait être un bon candidat pour les pièges à attraction des moustiques dans la nature. L'utilisation des sources naturelles de sucre de nectar comme pièges à attraction a fait l'objet de plusieurs études (Müller et al. 2008; Müller et al. 2010 a, b, c, d;).

La faiblesse de cette étude se situe à deux niveaux, (i) les moustiques recevaient uniquement la solution de glucose 5% comme source d'énergie au cours de ces travaux, alors, un phénomène de mémorisation de la solution du glucose 5% comme seule source d'énergie par les moustiques pouvait être un biais dans le choix des moustiques pour les différentes sources de jus sucré avec le temps. Cela semblerait justifier la préférence des moustiques pour la solution du glucose 5% à J14 et la diminution de la préférence pour *L. microcarpa* à cette

même période (Figure 24), (ii) il était difficile pour nous d'affirmer que les moustiques une fois dans les cages pièces ne pouvaient ressortir et entrer dans un autre piège et/ou rester dans la grande cage de libération. Alors, il serait souhaitable pour les travaux à venir de fabriquer des pièges avec des ouvertures comme des chicanes de telle sorte qu'il n'y ait plus de doute sur les mouvements d'entrée et de sortie des moustiques au niveau des pièges ou de faire un suivi dans le temps.

2.5 Conclusion partielle

Un nombre croissant de travaux montrent la capacité des insectes à pratiquer l'automédication et les parasites à manipuler le comportement de leurs hôtes. Nos résultats indiquent que les moustiques ne semblent pas être en mesure d'utiliser les plantes anti-parasite pour lutter contre *P. falciparum*. En plus, le cycle de développement des parasites de *P. falciparum* chez les moustiques jusqu'à J14 post-infection, n'affecte pas la période et la préférence de ces moustiques pour les sources naturelles de sucre de nectar. Dans l'ensemble, notre étude sur le comportement de choix des sucres végétaux jusqu'à J14 post-infection nous permettent pas de confirmer ceux de Nyasembe et *al*, 2014. Mais, des études supplémentaires sur le comportement des moustiques infectés au-delà de J14 post-infection seront nécessaires pour mieux élucider ce domaine de recherche. Aussi, aux regards de ces résultats, il serait important d'approfondir ce volet en cherchant à étudier le comportement de recherche d'hôte des moustiques infectés avec *P. falciparum*.

ACTIVITE DE RECHERCHE 3:

Etude du comportement de recherche des hôtes vertébrés par des moustiques infectés expérimentalement avec des isolats naturels de *Plasmodium falciparum* ³

3.1 Introduction

Parmi les nombreuses stratégies de transmission des parasites, la manipulation du comportement de l'hôte par le parasite est sans doute la plus fascinante (Poulin, 2007). De nombreuses espèces de parasites sont en effet capables de modifier le comportement de leur hôte dans un sens qui favorise leur propre transmission. Par exemple, les fourmis infectées par les champignons *Ophiocordyceps* quittent la colonie, et montent dans les canopées, un micro-environnement idéal pour la sporulation et la dispersion du parasite (Hughes *et al.*, 2011). Les grillons infectés par des vers gordiens plongent dans l'eau, permettant ainsi au parasite de continuer leur cycle (Thomas *et al.*, 2002). Ceux-ci sont juste quelques exemples illustrant les impacts dramatiques que peuvent avoir les parasites sur le comportement de leur hôte (Moore, 2002). La manipulation parasitaire a été documentée dans de nombreuses associations hôte-parasites, et ces études indiquent que c'est un phénomène répandu dans la nature avec des implications écologiques et évolutives importantes (Thomas *et al.* 2005; Lefèvre *et al.* 2009a, b; Poulin 2010; Hughes *et al.* 2012)

En plus de sa pertinence écologique et évolutive, la manipulation de l'hôte par le parasite peut aussi avoir une importance profonde pour la santé humaine. Beaucoup de parasites manipulateurs sont responsables de maladies vectorielles dévastatrices comme la dengue, le paludisme, la leishmaniose ou la maladie du sommeil. En effet, ces parasites peuvent inciter des changements de comportement chez leurs insectes vecteurs qui affectent la fréquence de contact entre les hôtes et les vecteurs (Molyneux & Jefferies 1986; Moore 1993; Hurd 2003; Lefèvre *et al.* 2006; Lefèvre & Thomas 2008). En particulier, plusieurs parasites transmis par des vecteurs semblent capables de provoquer une augmentation de la fréquence de piqûre de leurs vecteurs en interférant avec le processus d'ingestion. *Leishmania* spp et

³ Cette activité de recherche a fait l'objet d'une publication : Vantaux A, Hien DFdS, Yameogo B, Dabiré RK, Thomas F, Cohuet A & Lefevre T. 2015. 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**. 3: 86

Yersinia pestis bloquent respectivement l'intestin antérieur des phlébotomes et des puces (Rebeil et al., 2013; Rogers, 2012). Les *Trypanosoma* spp empêchent le bon fonctionnement des phagorecepteurs (Jenni et al., 1980) et modifient aussi la composition salivaire des mouches tsé-tsé (Van-den-Abbeele et al., 2010). Les *Plasmodium* spp. et les *Trypanosoma* spp réduisent l'activité de la protéine salivaire apyrase (inhibiteur de l'agrégation des plaquettes) (Añez, 1984; Rossignol et al., 1984). Ces mécanismes semblent diminuer la capacité du vecteur à se gorger et les incitent donc à s'alimenter plusieurs fois sur des hôtes vertébrés.

La fréquence de piqûre est un paramètre clé de l'intensité de transmission des maladies vectorielles (MacDonald, 1957). Spécifiquement, la transmission potentielle de ces parasites est fortement déterminée par le nombre de piqûres sur les hôtes vertébrés: plus un grand nombre d'hôtes est piqué par les vecteurs infectieux, plus la transmission sera intense. Quelques études ont constaté une augmentation de la fréquence de piqûres chez les vecteurs infectés non seulement sur le même individu hôte, mais aussi sur différents individus, ce qui augmente la transmission du parasite (Jenni et al., 1980; Rogers and Bates, 2007; Van-den-Abbeele et al., 2010).

En outre, les changements comportementaux observés chez les vecteurs infectés semblent être synchronisés avec le développement du parasite. Quand le parasite n'est pas entièrement mature (c'est-à-dire au stade immature non-transmissible), il induit une diminution de la fréquence de contact avec les hôtes vertébrés. Puisque la piqûre est un événement risqué (par exemple, les comportements défensifs des hôtes peuvent tuer le vecteur et son parasite), cette réduction semble être avantageuse pour le parasite (Schwartz and Koella, 2001). Au contraire, quand le parasite est mature et prêt à être transmis, il modifie le comportement de son vecteur dans un sens qui augmente le contact avec l'hôte vertébré et par conséquent la transmission. Cette manipulation «stade de développement dépendante» semble être la règle dans l'ensemble des exemples cités ci-dessus (Lefèvre and Thomas, 2008; Rogers and Bates, 2007; Van-den-Abbeele et al., 2010).

Pendant les trois dernières décennies, une attention particulière a été consacrée aux changements comportementaux des moustiques vecteurs du paludisme (Cator et al., 2012; Hurd, 2003; Lefèvre and Thomas, 2008). Les traits comportementaux modifiés par les stades sporozoïte des *Plasmodium* sont multiples et incluent une augmentation des réponses du moustique aux odeurs de l'hôte vertébré (Rossignol et al. 1986; Cator et al. 2013), une augmentation de la durée, et du nombre de repas de sang (Anderson et al., 1999; Koella et al.,

2002, 1998; Rossignol et al., 1986, 1984; Smallegange et al., 2013; Wekesa et al., 1992), et une augmentation de la quantité de sang ingérée (Koella & Packer 1996; Koella et al. 1998, 2002). L'ensemble de ces études supportent fortement l'existence de la manipulation du comportement de moustique par le parasite. Cependant, elles ont été effectuées sur des systèmes artificiels (associations moustique-*Plasmodium* que l'on ne retrouve pas dans la nature) ou sur des moustiques de terrain, et ceci peut être problématique. Premièrement, l'utilisation de combinaisons hôte-parasites non-naturelles exclut les processus coévolutifs. Aussi, les stimuli utilisés dans ces études proviennent d'hôtes vertébrés inappropriés (par exemple des odeurs humaines pour étudier le comportement de moustiques infectés avec des parasites de rongeurs). Deuxièmement, l'échantillonnage de spécimens sauvages peut mener à quelques interprétations erronées en raison de possibles effets confondants. Cela a une pertinence particulière dans le domaine de la parasitologie puisque l'infection peut être une conséquence plutôt qu'une cause des modifications comportementales observées. Par exemple, l'augmentation des fréquences de piqûre chez les moustiques infectés par les stades sporozoïtes plutôt que d'être le résultat de l'infection, pourrait être une simple caractéristique intrinsèque du moustique. En d'autres termes, les moustiques infectés pourraient exprimer une augmentation du taux de piqûre non pas parce qu'ils sont infectés, mais juste à cause d'une agressivité innée, augmentant ainsi les chances qu'ils deviennent bons vecteurs comparés aux moustiques moins agressifs. Un autre facteur confondant possible dans ces études de terrain est l'âge du moustique qui est associé à l'infection (i.e. les moustiques les plus vieux sont aussi ceux qui ont le plus de chances d'avoir des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires, Koella & Packer 1996; Koella et al. 1998; mais voir Wekesa et al. 1992).

En conséquence, il existe un manque crucial de données sur les effets de l'infection de *Plasmodium* sur le comportement des vecteurs en utilisant des combinaisons naturelles moustique-*Plasmodium* dans des conditions contrôlées au laboratoire. Cette étude a pour but de combler ce vide en utilisant le parasite *P. falciparum*, responsable de la forme la plus sévère du paludisme humain et le moustique *Anopheles coluzzii* (anciennement forme moléculaire M d'*Anopheles gambiae* s.s.) son vecteur principal en Afrique. Nous avons infecté expérimentalement *An. coluzzii* avec des isolats naturels de *P. falciparum* par alimentation directe sur membrane et, au travers une série d'expériences, nous avons examiné l'effet des stades immatures (oocystes) et matures (sporozoïtes) sur le comportement trophique du moustique. Premièrement, nous avons étudié l'attraction à longue distance des

moustiques pour les odeurs humaines en utilisant un olfactomètre. Deuxièmement, nous avons étudié l'attraction à courte distance en utilisant un système de quantification d'activité de vol.

3.2 Matériels et méthodes

Pour évaluer le comportement de manipulation parasitaire nous avons infecté expérimentalement les moustiques, *An. coluzzii* comme décrit dans le chapitre 2 (**paragraphe 1.2.2**) avec des isolats naturels de parasite de *Plasmodium*. En effet, cette étude de comportement a été menée à longue et courte distance en tenant compte des interactions coévolutives moustique-*Plasmodium* dans les conditions naturelles. Cela, afin de comprendre réellement le comportement de recherche de l'hôte humain par *An. coluzzii* dans les conditions naturelles.

3.2.1 Etude du comportement du moustique à longue distance

Nous avons étudié les réponses olfactives des moustiques exposés aux odeurs humaines (stimulus test) et à de l'air extérieur (stimulus contrôle) en utilisant un olfactomètre à double entrée (Figure 25). L'olfactomètre à double entrée est fait de verre. Le dispositif est composé de deux pièges de formes cubiques ($L \times l \times h = 40 \times 20 \times 20$ cm) connectés à une cage de libération des moustiques ($L \times l \times h = 60 \times 40 \times 40$ cm) par deux tubes ($L = 60$ cm, $\emptyset = 10$ cm). Les odeurs provenaient de deux tentes ($L \times l \times h = 250 \times 150 \times 150$ cm) reliées aux deux pièges de l'olfactomètre par un tuyau d'évacuation d'air en plastique (Scanpart R, $D \times L = 10 \times 300$ cm). Des ventilateurs, placés à la jonction des tentes et de tuyaux d'évacuation, propulsaient l'air depuis les tentes vers l'olfactomètre, et fournissaient ainsi un courant d'air chargé d'odeurs contre lequel les moustiques étaient amenés à voler. Une moustiquaire était placée à la jonction des tuyaux d'évacuation d'air et des pièges pour empêcher les moustiques de voler dans les tuyaux et d'atteindre les tentes. Les tentes étaient situées dehors et l'olfactomètre à l'intérieur d'une pièce expérimentale. La vitesse de l'air dans la cage de libération était réglée à $15 \text{ cm} / \text{s}$ ($\pm 2 \text{ cm} / \text{s}$) à l'aide d'un anémomètre thermique CompactTesto 425 (Testo, Forbach, France) équipée d'une sonde à fil chaud (Plage: 0 à + 20 m / s, précision: $\pm (0.03 \text{ m} / \text{s} + 5\% \text{ vm})$). La pièce expérimentale était à température ambiante ($27,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$) et à une humidité relative de $80 \pm 10\%$.

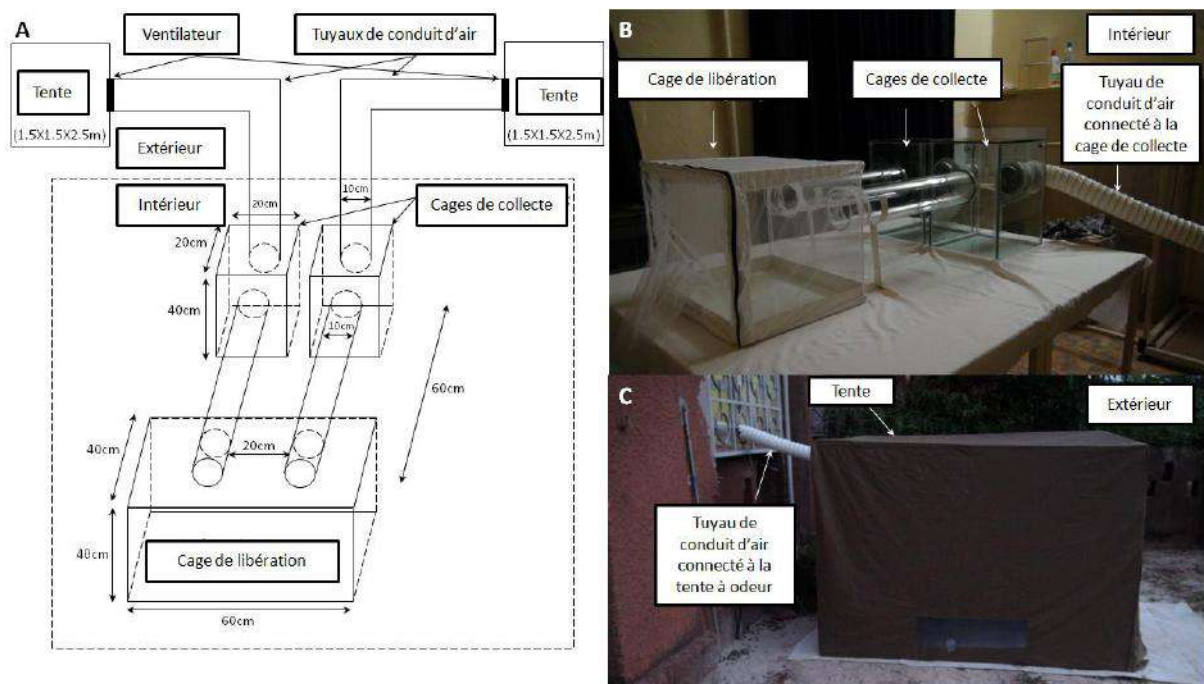


Figure 25: (A) représentation schématique de l'olfactomètre à double entrées, (B) photo de la partie intérieure de l'olfactomètre, (C) photo de la partie intérieure de l'olfactomètre

Les tests comportementaux ont été effectués à deux périodes clés du développement du parasite: d'abord entre les 6^{ème} et 8^{ème} jours post-infection (période correspondante au stade oocyste chez le moustique), et entre le 13^{ème} et 17^{ème} jour post-infection (période correspondante au stade sporozoïte chez le moustique).

Les moustiques qui ont reçu un repas de sang infectieux (exposés à l'infection) et les moustiques qui ont reçu un repas de sang inactivé (Non-exposés) ont été colorés dans la matinée du test. Les moustiques ont été colorés avec deux poudres de couleurs différentes (poudre lumineuse Kit, BioQuip), correspondant à leur statut d'exposition (exposé vs. non exposé). La correspondance entre le statut d'exposition et les couleurs a été permutée entre chaque test. Dans la soirée, environ 20 moustiques exposés et 20 non exposées ont été simultanément relâchés dans la cage de libération et laissé pendant 30 minutes. Pendant ce délai, les moustiques qui ont été activés par les stimuli ont quitté la cage de libération et ont volé dans les tubes puis ont été récupérés dans l'un des deux pièges. Deux tests ont été effectués par soirée entre 19h et 23h avec les stimuli d'odeurs (odeur humaine par rapport à l'air extérieur) et en alternance entre le bras droit et le bras gauche pour éviter un «effet côté». Un total de 15 volontaires humains a été utilisé. Tous les volontaires qui ont servi comme source d'odeur étaient des hommes Burkinabé, habitant Bobo-Dioulasso, et dont l'âge variât de 20 à 44 ans et qui pesaient de 50 à 80 kg. Avant l'essai, les volontaires ont été priés de ne

pas prendre de douche (dans les deux heures précédents le test), de ne pas utiliser de parfum ou de répulsif à insectes, de ne pas fumer ou de manger de l'ail ou de l'oignon (Lefèvre et al. 2009, 2010). Les volontaires agissant comme sources d'odeurs étaient assis sur une chaise à l'intérieur de la tente. Pour comparer les réponses comportementales des moustiques entre les deux phases d'infection immature (oocystes) et mature (sporozoïtes), nous avons utilisé les mêmes volontaires au cours des deux périodes pour réduire la disparité de nos résultats qui pourrait être dû à la haute variabilité de la réponse due moustique à différents hôtes humains (Mukabana et al. 2002, 2004; Qiu et al. 2006, 2011).

Chaque lot de moustiques a été testé une seule fois, de sorte qu'un nouveau lot de moustiques naïfs a été utilisé pour chaque test. Un total de 755 moustiques non exposés et de 682 moustiques exposés ont été libérés.

A la fin de l'essai, les moustiques à l'intérieur de chacun des deux pièges et de la cage de libération ont été récupérés à l'aide d'un aspirateur à bouche puis comptés. Après chaque test, l'olfactomètre a été lavé avec de l'alcool 70% pour éliminer les contaminants d'odeur provenant du test précédent. De même, des gants en latex ont été portés par l'expérimentateur pour éviter la contamination de l'équipement. Ce dispositif permet d'étudier le comportement des moustiques à longue distance basé essentiellement sur des stimuli olfactifs (les stimuli visuels et sonores étant absents). Deux réponses comportementales ont été mesurées: (i) l'activation (proportion de moustiques capturés dans les deux pièges sur le nombre total de moustiques libérés, c'est la proportion de moustiques s'engageant dans l'un des deux tuyaux de vols) et, (ii) l'attraction (proportion de moustiques capturés dans le piège homme sur le nombre total de moustiques capturés dans les deux pièges). La prévalence en oocystes (proportion de moustiques femelles infectés par *P. falciparum*) et l'intensité (nombre moyen d'oocystes dans l'intestin des femelles infectées) ont été évaluées en disséquant les estomacs des moustiques le matin après les tests comportementaux. Les têtes-thorax ont été utilisés pour déterminer la prévalence en sporozoïtes (proportion de femelles infectées) par PCR (Morassin et al., 2002). Trois groupes de moustiques ont ainsi été obtenus:

- (i) les femelles qui ont reçu du sang contenant des gamétocytes et ont été infectées avec succès ("exposées-infectées");
- (ii) les femelles qui ont reçu du sang contenant des gamétocytes et qui sont restées non infectées ("exposées-non infectées");
- (iii) les femelles qui ont reçu du sang dont les gamétocytes ont été inactivés thermiquement («Non exposée»).

Trois répliques avec des porteurs de gamétocytes différents à chaque fois ont été effectuées.

3.2.2 Etude du comportement du moustique à courte distance: expérience 1

Le comportement à courte distance des femelles d'*An. coluzzii* a été étudié à l'aide d'un système de quantification d'activité de vol (TriKinetics, Waltham, MA) en suivant le mode opératoire décrit précédemment (Lima-Camara et al. 2011; Rund et al. 2012; cf figures 26A, B).

Brièvement, les moustiques ont été placés individuellement dans des tubes en verre (2,5 cm x 15 cm) avec un faisceau infrarouge de détection de mouvement bissectant chaque tube. Lorsqu'un moustique traverse le tube interrompant le faisceau infrarouge, le passage est enregistré par un ordinateur relié au détecteur. Dans la matinée du troisième jour du repas de sang infectieux, les femelles ont été placées dans les tubes fermés avec un tissu moustiquaire. Elles ont été nourries avec une solution de glucose à 5%. Contrairement au test comportemental à longue distance pour lequel nous avons utilisé les émanations corporelles totales, l'essai à courte distance utilise des chaussettes propres ou ayant été portées comme source de stimuli. Le faisceau infrarouge est placé à côté de la chaussette pour permettre le contact avec le moustique. Les tests ont été effectués tous les soirs entre 19h10 et 19h45 à partir du troisième jour après le repas de sang infectieux jusqu'au quinzième jour post-infection (sauf le quatorzième jour au cours de laquelle une coupure de courant a empêché l'exécution quotidienne) (Figure 26C). La chambre était sombre, et la température et l'humidité relative étaient similaires aux conditions standards d'insectarium ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, humidité relative de $70 \pm 5\%$, 12h12 NJ). Le glucose était retiré à 18 heures et les tissus moustiquaires ont été remplacés par d'autres tissus propres. Les gants en latex ont été portés par l'expérimentateur pour éviter la contamination de l'équipement. Les chaussettes ont été mises en place et les moustiques ont été laissés pendant 20 min pour acclimatation. Les chaussettes ont été portées pendant 8 h le même jour de l'essai comportemental. Deux paires de chaussettes par volontaire ont été utilisées, de telle sorte qu'elles ont été nettoyées avant d'être réutilisées le jour suivant. Toutes les chaussettes ont été nettoyées avec le même savon et de l'eau ainsi que séchées dans les mêmes conditions. Au total l'enregistrement simultané de 96 moustiques individuels a été réalisé (Figures 26 A, B).

Les stimuli (chaussettes portées ou non portées) ainsi que le statut d'infection du moustique (exposé contre non exposé) ont été distribués de manière aléatoire sur chaque moniteur. Les mêmes individus de moustiques ont été suivis quotidiennement; à moins qu'ils soient morts.

Dans ce cas, ils ont été remplacés par des individus naïfs conservés dans des cages de 30 x 30 cm x 30 cm. Quatre volontaires humains ont porté les chaussettes et un total de 265 moustiques ont été utilisés. Deux réponses comportementales ont été mesurées:

- Activation à courte distance (proportion des moustiques qui ont traversé au moins une fois le faisceau infrarouge);
- et l'activité (nombre de ruptures du faisceau infrarouge chez les individus actifs).

La prévalence des oocystes (nombre de femelles infectées par au moins un oocyste de *P. falciparum*) et l'intensité (nombre moyen d'oocystes dans l'intestin des femelles infectées) ont été évaluées en disséquant l'estomac des moustiques sur un sous-ensemble de femelles supplémentaires (qui ne sont pas utilisées dans le test comportemental) (N = 109), 6 jours après le repas de sang infectieux. Deux porteurs de gamétocytes différents ont été utilisés dans une réplique.

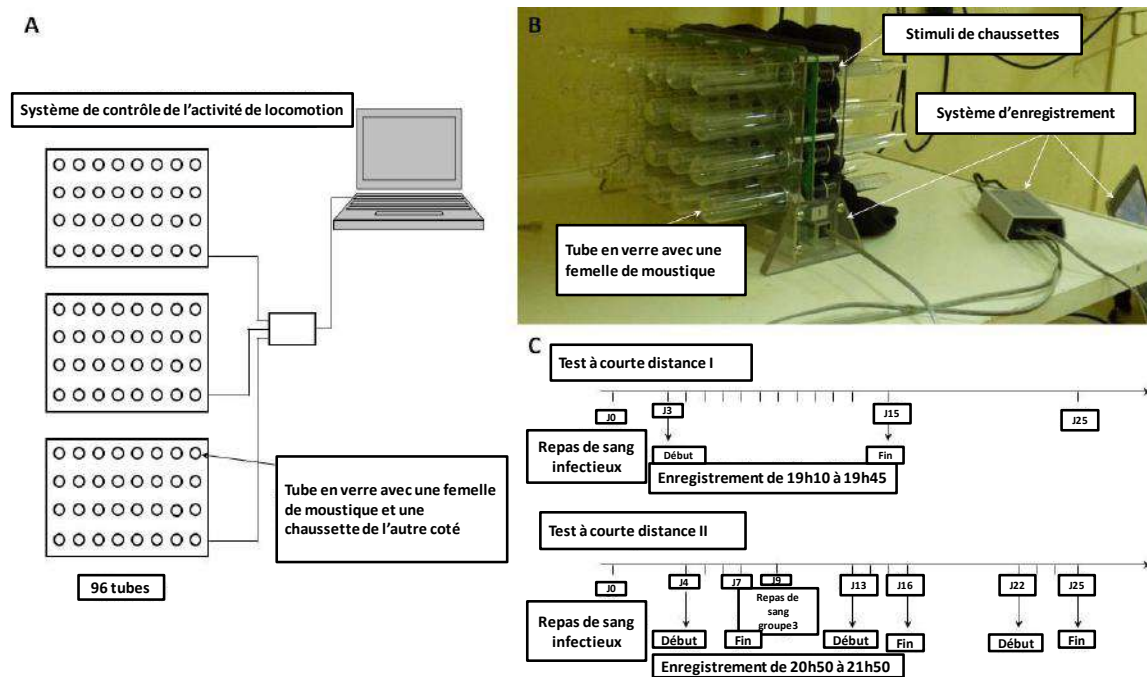


Figure 26: (A) représentation schématique du système d'enregistrement des activités de locomotion, (B) Photo du dispositif (C) représentation schématique des périodes de tests

3.2.3 Etude du comportement du moustique à courte distance: expérience 2

Cette expérience utilise la même installation que décrit ci-dessus avec certaines modifications légères. L'activité du moustique a été enregistrée au cours de trois périodes post-infection:

- du quatrième jour au septième jour,
- du treizième jour au seizième jour

(iii) du vingt deuxième jours au vingt cinquième jours (Figure 26C).

Un nouveau lot de moustiques a été utilisé pour chaque période. Les essais ont été effectués entre 20h50 et 21h50 et les chaussettes ont été positionnées à 20h25. Les femelles d'*Anopheles coluzzii* présentent des rythmes nocturnes quotidien (rythmes circadiens) d'activité de vol avec un pic au crépuscule (Jones and Gubbins, 1978; Rund *et al.*, 2012). Les enregistrements des tests de la première expérience (3.2.1) ont été pris rapidement après ce pic pouvant gommer de possibles différences de comportements entre individus sains et infectés. Nous avons donc mené une seconde expérience visant à étudier les mêmes comportements mais plus tard dans la soirée après le pic d'activités crépusculaires. Aussi, afin d'évaluer l'effet possible des gamétocytes inactivés sur le comportement les moustiques, les moustiques ont, pour cette expérience, été nourris sur trois types de sang différents: sang infecté par *P. falciparum*, le même sang mais avec les gamétocytes de *P. falciparum* inactivés par la chaleur et le sang d'un individu sain (pas d'infection à *P. falciparum*). Cette expérience utilise donc deux donneurs de sang (un porteur de gamétocytes et un volontaire non infecté) et trois groupes de moustiques:

- (i) les femelles qui ont reçu du sang avec des gamétocytes («exposés»),
- (ii) les femelles qui ont reçu un sang dont les gamétocytes ont été inactivés («non exposées»),
- (iii) les femelles qui ont reçu un sang non infectieux ("donneur sain").

Enfin, le lot de moustiques étudiés du vingt deuxième jour au vingt cinquième jour a reçu un second repas de sang non infectieux sur lapin, au neuvième jour après le repas de sang infectieux (Smallegange *et al.*, 2013).

Quant aux stimuli d'odeur, nous avons utilisé trois chaussettes-portées par des volontaires et un total de 305 moustiques. La prévalence des oocystes (proportion de femelles infectées par *P. falciparum*) et l'intensité (nombre moyen d'oocystes dans l'intestin des femelles infectées) ont été évaluées en disséquant les estomacs de ces moustiques sur un sous-ensemble de femelles supplémentaires (n = 50), 7 jours après le repas de sang infectieux. L'essai a été effectué sur une réplique à l'aide d'un porteur de gamétocytes et d'un porteur sain et les mêmes réponses comportementales ont été mesurées, à savoir, l'activation des moustiques à courte distance et l'activité.

3.3 Analyses statistiques

3.3.1 Comportement du moustique à longue distance

Des modèles linéaires généralisés mixtes (GLMM) avec une distribution binomiale (fonction "glmer" dans le répertoire "lme4") ont été ajustés pour analyser l'activation à longue distance (proportion de moustiques capturés dans les deux pièges de l'olfactomètre sur le nombre total de moustiques libérés) et l'attraction (proportion de moustiques capturés dans le piège homme sur le nombre total de moustiques récupérés dans les deux pièges). Dans ces modèles, l'infection (trois niveaux: non-exposés, exposés infectés, exposés-non infectés), le temps post-infection (deux niveaux: phase oocyste 6-8 jour après le repas de sang infectieux et phase sporozoïte 13 à 17 jours après le repas de sang infectieux), le volontaire placé dans la tente et l'interaction entre l'infection et le temps post-infection ont été codés en facteurs fixes, tandis que la date et la réplique ont été codées en facteurs aléatoires. Un GLM binomial a été utilisé pour évaluer l'effet de l'intensité des oocystes sur l'activation des moustiques à longue distance et sur l'attraction.

3.3.2 Comportement du moustique à courte distance

Un GLMM binomial (fonction "glmer" dans le répertoire "lme4") a été utilisé pour étudier l'activation à courte distance (proportion de femelles qui ont traversé le faisceau infrarouge au moins une fois) et un GLMM avec une distribution négative binomial (fonction "glmmadmb" dans le répertoire «glmmADMB») a été utilisé pour analyser l'activité (nombre de ruptures de faisceau infrarouge).

Dans ces modèles, les stimuli d'odeur (chaussette usée contre chaussette propre), l'exposition au parasite (deux et trois niveaux respectivement pour l'expérience I et II), et leur interaction ont été codées comme facteurs fixes et les moustiques individuels ont été codés comme un facteur aléatoire pour tenir compte de la répétition des mesures sur le même individu. Toutes les analyses ont été effectuées dans R version 3.0.3 (R Development Core Team 2013).

3.4 Résultats

3.4.1 Comportement du moustique à longue distance

Nous avons testé un total de 1437 femelles (755 femelles non exposées et 682 femelles exposées à un repas de sang infectieux). Parmi les 682 femelles exposées à un repas de sang

infectieux, 172 sur 352 femelles ($48,9 \pm 5\%$) hébergeaient des parasites au stade oocyste et tandiste que 122 sur 330 ($36,9 \pm 5\%$), abritaient le parasite au stade sporozoïte ($X^2_1 = 8,6$, $P = 0,003$; Figure 27A). L'intensité moyenne des oocystes était $15,26 \pm 2,06$ (Figure 27B). Dans l'ensemble 495 sur 1437 *An. coluzzii* ont quitté la cage de libération pour voler contre le courant d'air jusqu'à l'un des deux pièges à odeurs (activation à longue distance de $34,45 \pm 2,5\%$).

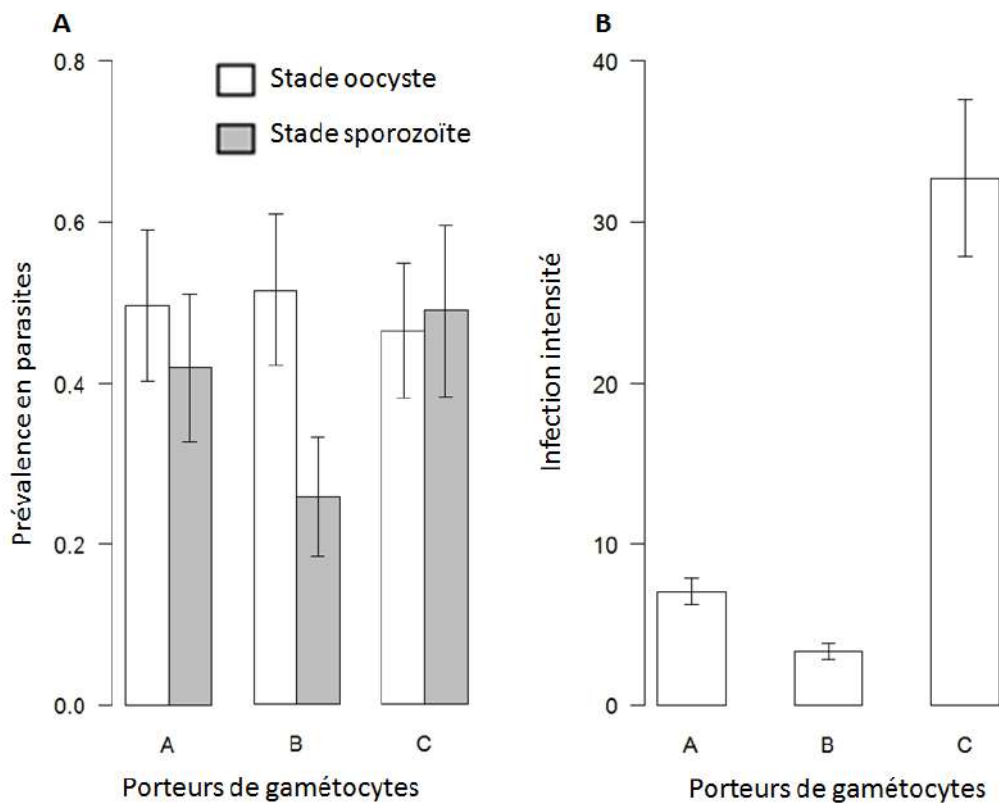


Figure 27 : Moustiques infectés avec succès dans le test comportemental à longue distance

Nous n'avons trouvé aucun effet significatif de l'infection des moustiques ($X^2_2 = 0,15$, $P = 0,93$, Figure 29A) ni du temps après le repas de sang (6-8 jours ou 13-17 jours; $X^2_1 = 1,1$, $P = 0,29$; Figure 29A) sur l'activation. De même, il n'y avait aucun effet significatif de l'intensité des oocystes sur l'activation des moustiques ($X^2_1 = 0,9$, $P = 0,34$). Enfin, il n'y avait pas d'interaction entre l'infection et le temps après le repas de sang ($X^2_2 = 0,13$, $P = 0,94$, Figure 29A), indiquant que le parasite n'a eu aucun effet sur l'activation des moustiques quel que soit son stade de développement. L'activation à longue distance était cependant influencée de façon significative par le volontaire impliqué ($X^2_1 = 30.52$, $P = 0,007$; Figure 27).

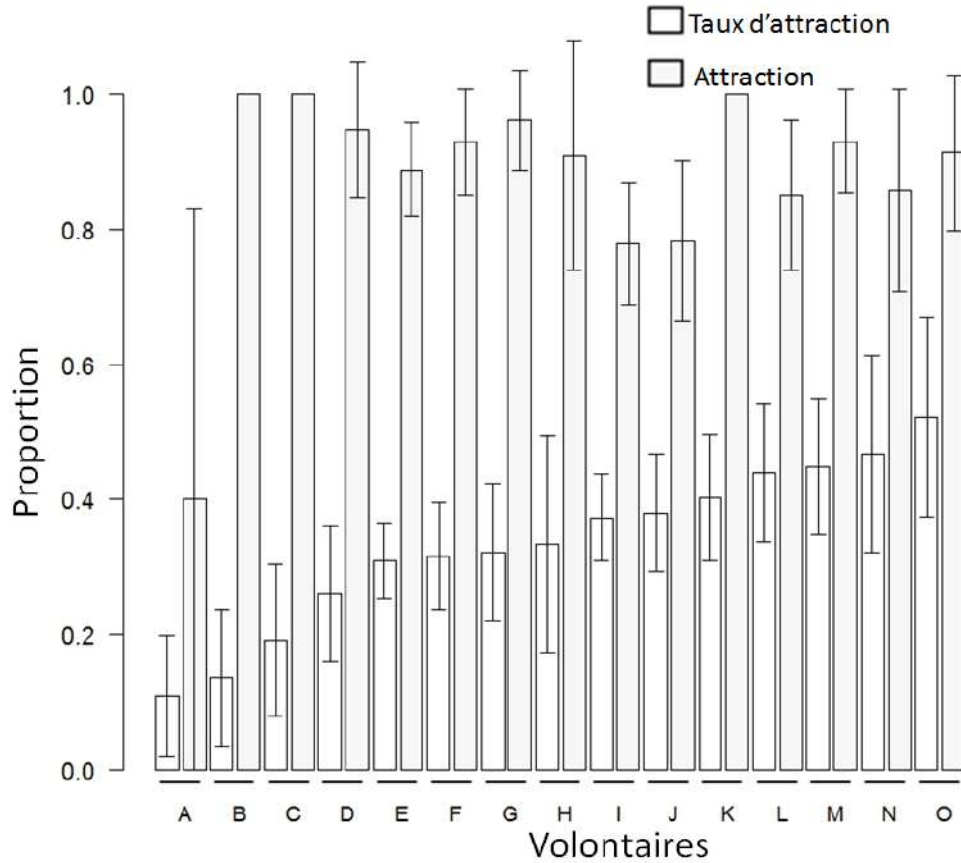


Figure 28: Activation des moustiques à longue distance

Dans l'ensemble 435 des 495 moustiques activés ont choisi le port émettant l'odeur humaine ($87.88 \pm 3\%$, écart significatif par rapport à une répartition aléatoire de 50-50, $z = 14,38$, $p < 0,0001$; Figure 29B). Il n'y avait pas d'effet significatif de l'infection ($X^2_2 = 1,2$, $P = 0,55$) ni du temps après le repas de sang ($X^2_1 = 0,11$, $P = 0,74$) sur l'attraction (Figure 28B). De même, l'intensité des oocystes n'a pas influencé l'attraction ($X^2_1 = 0,03$, $P = 0,87$). Enfin, il n'y avait pas d'interaction entre le statut d'infection et le temps après le repas de sang ($X^2_2 = 1,01$, $p = 0,6$; Figure 29B), indiquant que le parasite n'a eu aucun effet sur l'attraction de l'odeur humaine pour les moustiques quel que soit son stade de développement. L'attraction a cependant été significativement affectée par le volontaire impliqué ($X^2_1 = 36,73$, $p < 0,001$; Figure 28).

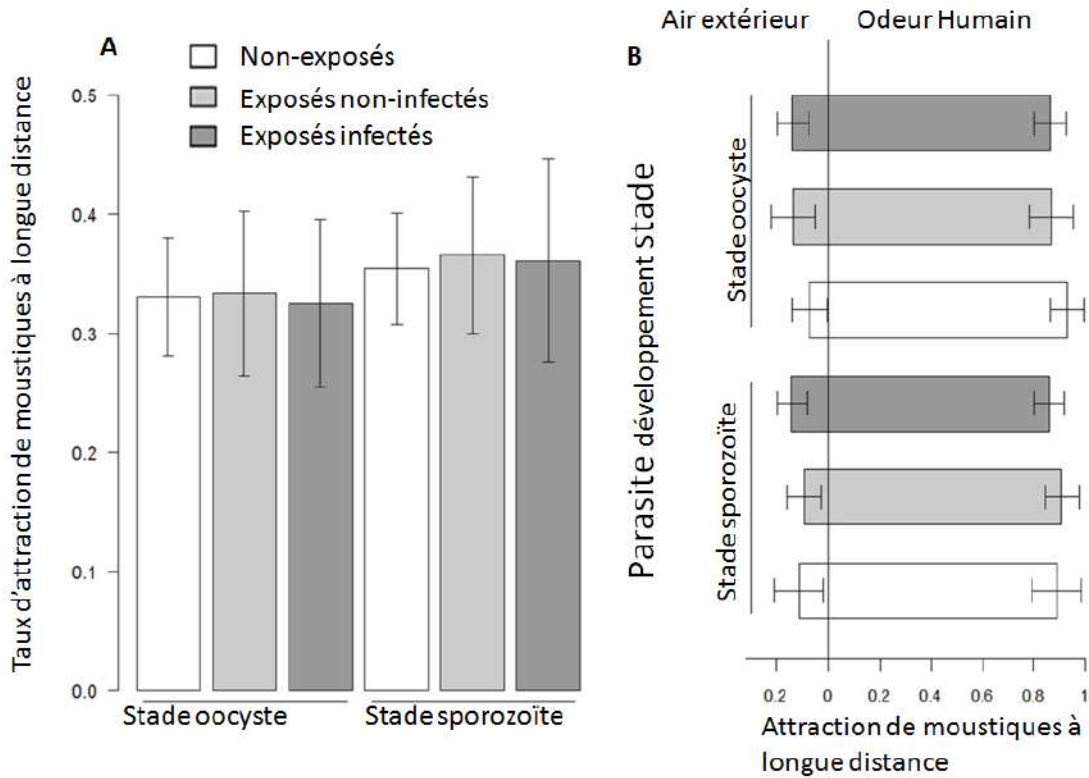


Figure 29: Réponse comportementale des moustiques à longue distance

3.4.2 Comportement du moustique à courte distance: expérience 1

Parmi les 109 femelles supplémentaires exposées à un repas de sang infectieux, mais non utilisées pour les tests de comportement, 54 femelles ($49,5 \pm 12\%$) hébergeaient le parasite au stade oocyste (Figure 30A). L'intensité en oocystes était $8,87 \pm 1,16$ (Figure 30B). Nous avons testé un total de 265 moustiques lors de 12 soirées. Parmi les 1149 enregistrements, 346 (30,1%) étaient actifs (à savoir, les moustiques avaient traversé au moins une fois le faisceau infrarouge).

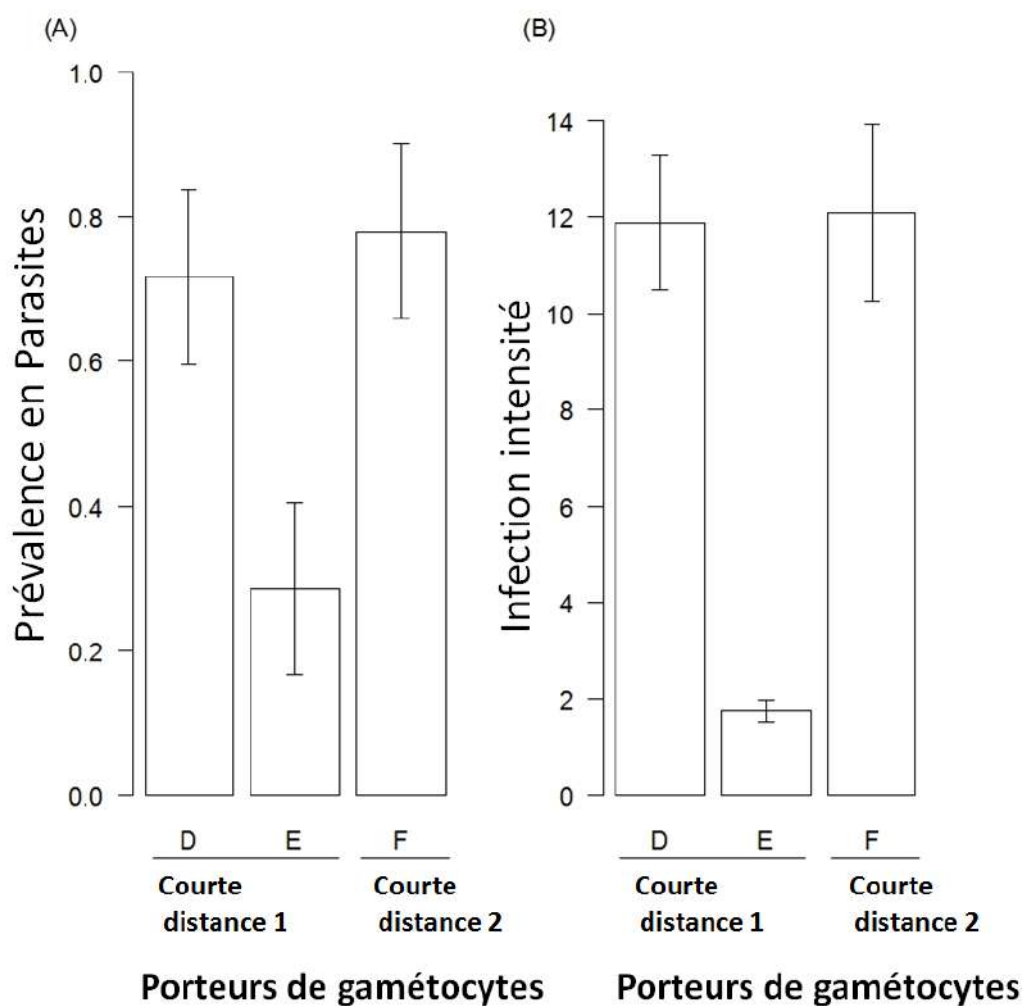


Figure 30: Moustiques infectés avec succès dans les tests comportementaux à courte distance. Nous n'avons pas trouvé d'effet significatif de l'exposition au parasite ($X^2_1 = 0,03$, $P = 0,87$), ni des stimuli d'odeurs (chaussettes portées versus chaussettes non-portées; $X^2_1 = 1,61$, $P = 0,2$) sur l'activation des moustiques à courte distance. L'activation a cependant été affectée par le temps après le repas de sang ($X^2_1 = 19,56$, $p < 0,0001$; Figure 31A). Il n'y avait pas d'interaction entre l'exposition au parasite et le temps après le repas de sang ($X^2_1 = 2,29$, $p = 0,13$). Nous avons trouvé une activité moyenne à courte distance de $35,4 \pm 4,12$ ruptures du faisceau infrarouge/35min. L'activité des moustiques n'a pas été significativement influencée par l'exposition au parasite ($X^2_1 = 1,62$, $P = 0,2$) ni par les stimuli olfactifs (chaussettes portées versus chaussettes non-portées, $X^2_1 = 0,12$, $P = 0,73$). Le temps écoulé depuis le repas de sang n'a eu aucun effet sur l'activité des moustiques ($X^2_1 = 0,96$, $P = 0,33$). L'interaction entre l'infection et le temps après le repas de sang n'a pas affecté de façon significative l'activité ($X^2_1 = 0,5$, $p = 0,48$)

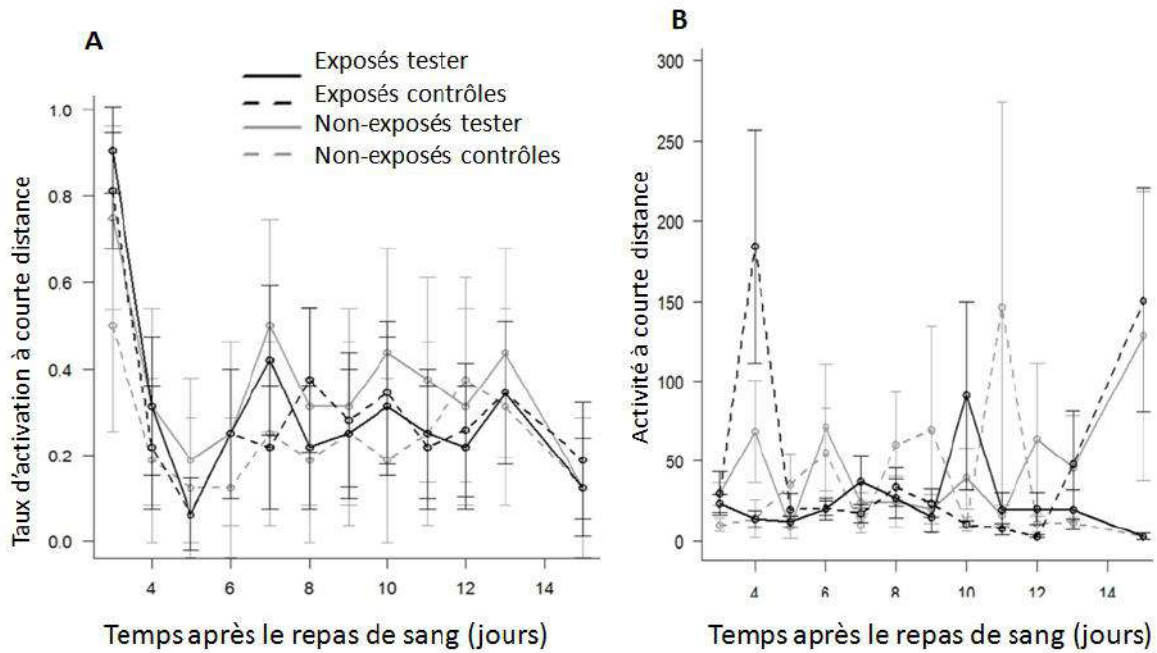


Figure 31: Réponse comportementale des moustiques à courte distance (expérience 1)

3.4.3 Comportement du moustique à courte distance: expérience 2

Parmi les 50 femelles exposées à un repas de sang infectieux, mais qui n'ont pas été utilisées dans les tests comportementaux et disséquées 7 jours plus tard, 39 avaient des parasites au stade oocystes ($78 \pm 11\%$, Figure 30A). L'intensité moyenne en oocystes était de $12,08 \pm 1,83$ (Figure 29B). Nous avons testé un total de 305 moustiques sur 12 soirées. Parmi les 875 enregistrements, 368 (42,06%) étaient actifs (à savoir, les moustiques avaient traversé le faisceau infrarouge au moins une fois). Nous n'avons pas trouvé d'effet significatif du type de repas (infectieux, gamétocytes inactivés ou sains) sur l'activation des moustiques ($X^2_2 = 2,26$, $P = 0,32$, Figure 32A). Aussi, l'activation n'a pas été significativement affectée par le temps après le repas de sang ($X^2_1 = 1,38$, $P = 0,2$) ou par le stimulus d'odeur ($X^2_1 = 0,03$, $P = 0,85$). Il n'y avait pas d'interaction entre le type de sang et le temps après le repas de sang ($X^2_2 = 1,27$, $P = 0,53$). L'activité moyenne à courte distance était de $34,7 \pm 4,3$ ruptures de faisceau/heure. Nous n'avons pas trouvé d'effet significatif du type de sang sur l'activité des moustiques à courte distance ($X^2_2 = 0,1$, $P = 0,95$; Figure 32B). L'activité des moustiques n'a pas été significativement affectée par les stimuli olfactifs ($X^2_1 = 0,56$, $p = 0,45$), ni par le temps après le repas de sang ($X^2_1 = 0,42$, $P = 0,52$). L'interaction entre le type de repas de sang et le temps après le repas de sang n'a pas été significatif ($X^2_2 = 0,38$, $p = 0,83$).

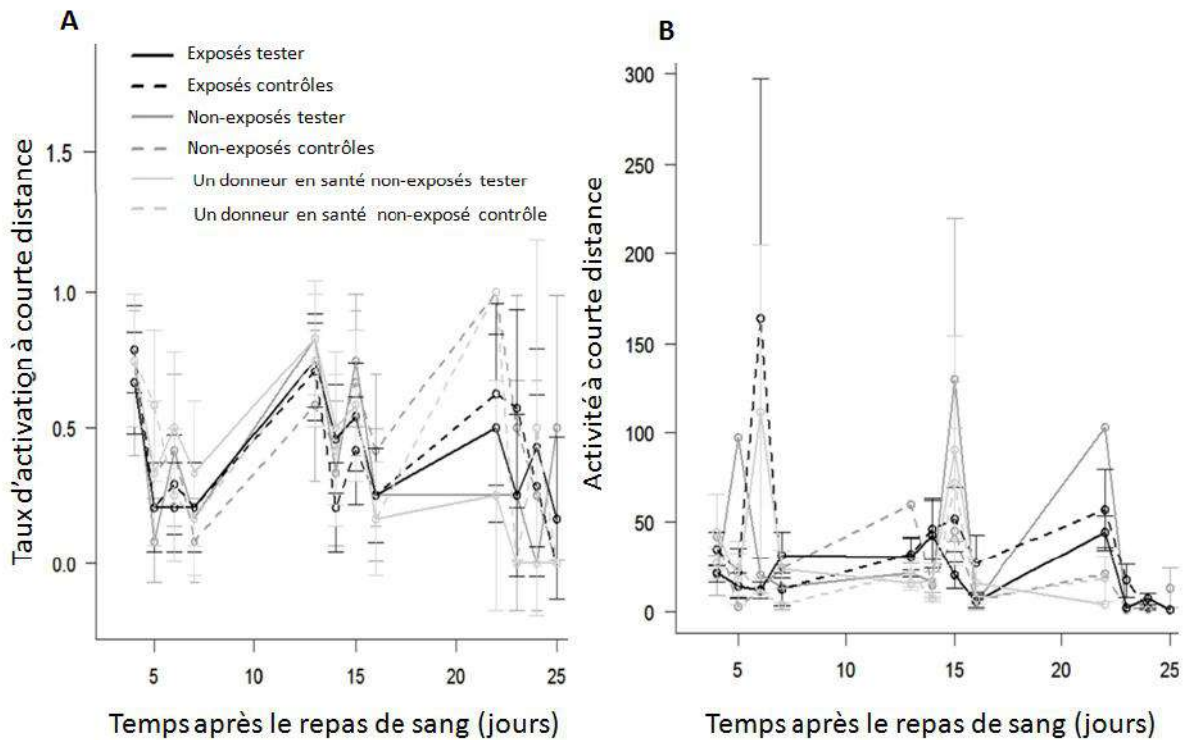


Figure 32 : Réponse comportementale des moustiques à courte distance (expérience2)

3.5 Discussion

Plusieurs études au laboratoire et sur le terrain ont démontré des modifications dans le comportement des moustiques infectés par les *Plasmodium* tels que la motivation et l'avidité à se nourrir sur des hôtes vertébrés, de manière à augmenter le contact avec les hôtes vertébrés et donc à augmenter la probabilité de transmission du parasite (Anderson et al., 1999; Cator et al., 2013; Koella and Packer, 1996; Rossignol et al., 1986, 1984; Smallegange et al., 2013; Wekesa et al., 1992). Les recherches sur les combinaisons sympatriques hôte-parasite sont essentielles pour intégrer les phénomènes de co-adaptations locales (Baeshen et al., 2014; Harris et al., 2012; Joy et al., 2008; Munstermann, 1994; Norris et al., 2001), ainsi que de valider les résultats trouvés sur des associations hôte-parasites non-naturels (Boëte 2005; Cohuet et al. 2006; Tripet et al. 2008). Cette étude s'est attachée à cela pour la première fois en examinant en conditions contrôlées au laboratoire si les isolats naturels de *P. falciparum* sont capables de manipuler le comportement de leur vecteur *An. coluzzii*. Nous avons utilisé d'abord un olfactomètre à double entrée pour étudier l'activation et l'attraction des femelles non infectées et infectées en réponse aux odeurs soit de l'air extérieur ou de l'humain. L'infection à *P. falciparum* n'a eu aucun effet significatif sur les comportements des moustiques, et ce indépendamment des stades de développement du parasite (oocystes et

sporozoïtes). Ce dispositif a permis l'étude des comportements de recherche d'hôtes basés sur les odeurs en s'affranchissant des autres stimuli exprimés à plus courte distance tels que des signaux visuels, les courants convectifs chauds et humides et le mouvement des hôtes. La majorité des preuves en faveur de l'existence de la manipulation parasitaire du comportement des moustiques provient d'études ayant utilisé des dispositifs à courte distance. Par conséquent, il est possible que les *An. coluzzii* infectés par les sporozoïtes présentent des réponses comportementales similaires à leurs homologues non infectés au cours des premières étapes du processus de recherche d'hôtes, c'est-à-dire à longue distance, puis affichent des différences comportementales à plus courte distance lorsque d'autres indices interviennent (chaleur, signaux visuels etc...). Pour tester cette possibilité, nous avons utilisé un système de mesure d'activité de vol (tests comportementaux à courte distance). Là encore, nous n'avons trouvé aucun effet de l'infection sur le comportement des moustiques, ni au cours de la phase d'infection non transmissible précoce, ni au cours de la phase d'infection transmissible.

En résumé, nos résultats ne permettent pas de confirmer l'existence d'une manipulation parasitaire du comportement des moustiques. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats contradictoires.

Tout d'abord, il est possible que la sélection naturelle n'ait pas favorisé l'évolution de la manipulation dans cette population parce que les femelles d'*An. coluzzii* sauvages non infectées prennent déjà plusieurs repas de sang au cours de chaque cycle gonotrophique (Scott and Takken, 2012) assurant ainsi déjà très bien la transmission du parasite. Comme les repas de sang sont risqués (comportement défensif de l'hôte), il est possible que, dans ce système, de nouvelles tentatives d'augmentations de la fréquence des repas sanguins ne sauraient évoluer de manière significative la valeur sélective du parasite (comme l'a suggéré Putnam et Scott, 1995 pour les moustiques *Aedes aegypti* infectés par les virus de la dengue.). D'autres travaux concernant les coûts et les bénéfices d'une fréquence élevée de repas sanguin au sein de cette population d'*An. coluzzii* sera nécessaire pour tester cette hypothèse.

Deuxièmement, puisque la manipulation comportementale peut être coûteuse pour le moustique (par exemple, le risque de mortalité plus élevé; Anderson et al. 2000; Schwartz & Koella 2001), il est possible qu'au cours de leur longue histoire coévolutive, nos moustiques aient développé une résistance à la manipulation (Daoust et al., 2015). Selon ce scénario, nos moustiques sont adaptés localement à leurs parasites et sont en avance dans la course aux armements de telle sorte que la manipulation ne s'exprime pas. En revanche, lorsque le

parasite est artificiellement associé à un vecteur allopatrique ou non naturel, avec lequel il n'a pas coévolué, sa capacité à manipuler le comportement des moustiques pourrait être exprimée.

En particulier, la manipulation parasitaire peut dépendre de l'intensité de l'infection de telle sorte que la manipulation comportementale peut être exprimée uniquement au-dessus d'un certain seuil. Les combinaisons moustiques-*Plasmodium* non-naturelles présentent souvent une plus grande intensité de l'infection par rapport aux combinaisons naturelles (Cohuet *et al.* 2006), et des intensités plus élevées ont également été observées au sein d'infections allopatriques vs sympatriques avec les isolats de *P. falciparum* (Harris *et al.*, 2012). Ainsi, des expériences futures, augmentant les niveaux d'infection en utilisant, par exemple, le sang avec une quantité exceptionnelle de gamétocytes, sont nécessaires pour tester cette hypothèse. Enfin, il est aussi possible que la manipulation n'ait pas été exprimée ici simplement en raison de nos protocoles. Par exemple, nos expériences ont été réalisées entre 19h00 et 23h00, tandis que l'activité des moustiques couvre la période s'étalant du crépuscule à l'aube avec un pic aux alentours de minuit. Ce pic d'activité est corrélé au repos des hôtes vertébrés. Des expériences futures examinant le comportement de recherche des hôtes par des moustiques infectés et non infectés autour de ce pic sont nécessaires.

3.6 Conclusion partielle

Cette étude en utilisant une association moustiques-*Plasmodium* naturelle suggère que la manipulation du comportement du vecteur n'est pas un phénomène général. Nous pensons que les phénotypes contrastés observés entre les systèmes naturels et les modèles non-naturels de laboratoire pourraient résulter de la co-évolution du parasite humain et de son vecteur naturel. De manière plus générale, nos résultats soulignent l'importance du suivi des découvertes utilisant des modèles de laboratoire avec des études utilisant des interactions moustiques-*Plasmodium* naturels pour prédire avec précision les conséquences épidémiologiques, écologiques et évolutives de la manipulation parasitaire du comportement des vecteurs.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Les différentes activités de recherche entreprises au cours de cette thèse, visent à apporter des connaissances sur l'influence des facteurs biotiques sur l'interaction moustique-*Plasmodium*, afin de contribuer au développement des méthodes innovatrices et promotrices supplémentaires dans la lutte contre cette endémie qui est le paludisme. Il s'agissait pour cela, de déterminer tout d'abord les effets de différentes sources naturelles de nectar sur l'intensité, la prévalence des oocystes et des sporozoïtes et d'évaluer leurs impacts sur les traits d'histoires de vie des moustiques infectés versus moustiques sains (activité de recherche 1), ensuite de vérifier le comportement d'automédication chez les moustiques infectés en fonction des développements de la phase oocystique et de la phase sporozoïtique (activité de recherche 2), et enfin à évaluer le comportement de recherche de l'hôte humain par les moustiques infectés par *P. falciparum* en fonction de la phase oocyste et la phase sporozoïte à travers l'olfactomètre et un système de locomotion pour mesurer leurs activités à courte distance (activité de recherche 3).

Les travaux menés dans l'activité de recherche 1 étaient plus proches des conditions naturelles et ont révélé que différentes sources naturelles de nectar influencent différemment l'issue d'une infection des moustiques femelles avec *P. falciparum* et affectent différemment les traits d'histoire de vie de ces femelles de moustiques tels que: la longévité, la fécondité et la quantité de sang ingérée. En effet, des 4 sources naturelles de nectar testées seulement *Thevetia nerifolia* et *Mangifera indica* présentaient des propriétés anti-protozoaires. Aussi, nous avons observé la réduction de la survie et la longévité des femelles de moustiques qui avaient reçu *Thevetia nerifolia* et *Mangifera indica*. En plus, nous avons observé que les femelles nourries sur *L. microcarpa* avant le repas de sang prenaient en général une petite quantité que celles nourries sur le glucose 5% ou *B. lupulina*. Cependant, l'infection du groupe de moustiques femelles nourris sur *L. microcarpa* était plus faible que ceux nourris sur le glucose 5% ou *B. lupulina*. Les métabolites secondaires dans la composition des différentes sources naturelles de nectar pourraient expliquer les effets de ces nectars de plantes. Ces résultats sont les premiers du genre et étaient à la fois innovateurs, encourageants.

La vérification d'une éventuelle automédication des moustiques infectés et la manipulation de leur comportement par le parasite en fonction des phases oocyste et sporozoïte était faite dans 5 grandes cages de 1m³ avec *T. nérifolia*, *B. lupulina*, *L. microcarpa*, le glucose 5% et le contrôle eau. Cette étude a révélé que l'activation était fonction de l'âge, aussi aucune

différence d'activation et de préférence étaient observées au cours de ces deux phases de développement du parasite entre moustiques infectés et sains jusqu'à J14 post-infection. Par contre une discrimination de choix entre les sources naturelles de nectar a été notifiée chez les moustiques *An. coluzzii* avec l'âge. Ces résultats étaient aussi bien encourageants et décevants car la vérification de l'automédication et la manipulation parasitaire devait être salvatrices dans la lutte contre le paludisme.

Après une investigation de manipulation parasitaire chez *An. coluzzii* infectés avec des isolats naturels de *P. falciparum* versus sains, notre étude a montré aucune évidence de manipulation parasitaire en utilisant respectivement un système à longue distance, l'olfactomètre et à un système de locomotion à courte distance. Par ailleurs, cette étude est la première à infecter expérimentalement *An. coluzzii* avec des sympatries isolats naturels et à étudier les effets de cette infection du parasite, *Plasmodium* sur son comportement vectoriel dans les conditions naturelles contrôlées l'association parasite-hôte. Ces résultats soulèvent les questions épineuses de quand et comment appréciés en général les interactions hôte-parasite et en particulier moustique-*Plasmodium*.

Dans cette thèse nous avons traité l'influence de certains facteurs biotiques (sources naturelles de nectar et d'hôtes vertébrés) sur l'interaction *An. culuzzii*-*P.falciparum* dans les conditions contrôlées de laboratoire.

Cependant d'autres perspectives s'ouvrent à nous à savoir:

- continuer à rechercher les plantes pouvant avoir un impact drastique sur le développement de *P. falciparum* chez *An. coluzzii*. Il serait nécessaire d'étendre cette étude dans les pays côtiers frontaliers du Burkina Faso où les plantes à fleurs sont quasi permanentes toute l'année.
- tester l'impact des extraits de plante tels que *Mangifera indica* et *Thévetia neriifolia* qui sembleraient des propriétés anti-protozoaires dans l'interaction *An. culuzzii*-*P.falciparum* afin de mettre en évidence le ou les composés secondaires responsable (s) de ces propriétés.
- vérifier sur le terrain si les moustiques infectés et non infectés prennent leur repas de jus sur les mêmes types de plantes afin de mieux orienter nos recherches sur l'impact des sources naturelles de nectar dans l'interaction moustique-*Plasmodium*.
- vérifier l'impact des sources naturelles de nectar des plantes génétiquement modifiées sur l'issue de l'infection d'*An. coluzzii* avec *P. falciparum*.

- développer une méthode permettant de vérifier quels types de protéines ou d'enzymes sont sécrétés par les moustiques infectés versus non infectés en fonction des propriétés des plantes sur lesquelles ils prennent leur repas de jus sucré.
- approfondir l'automédication des moustiques femelles d'*An. coluzzii* et la manipulation de leur comportement par le *P. falciparum* en ajoutant le traitement *Mangifera indica* aux sources naturelles de nectar et en les vérifiant à des périodes de tests supérieures à J14 post-infection.
- développer une méthode permettant d'évaluer l'impact de la quinine sur l'interaction *An. culuzzii-P.falciparum* et de l'utiliser pour vérifier les hypothèses d'automédication et manipulation parasitaire.
- tester la préférence des moustiques infectés et non infectés avec le système d'olfactomètre à deux entrées en leur donnant le choix entre les odeurs humaines et d'une plante en fonction des stades du développement du parasite afin de vérifier les hypothèses d'automédication et manipulation parasitaire
- approfondir et affiner un protocole sur le comportement de recherche de l'hôte par les moustiques infectés versus sains pour les périodes de tests allant au-delà de 00h, car une relation a été établie entre le pic d'agressivité des moustiques et le comportement de repos des êtres humains.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographie

- Adler, L.S., 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 3, 409–420.
- Ahmed, A.M., Hurd, H., 2006. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes Infect.* 8, 308–315.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6, 562–5.
- Aliota, M.T., Chen, C.-C., Dagoro, H., Fuchs, J.F., Christensen, B.M., 2011. Filarial worms reduce *Plasmodium* infectivity in mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e963.
- Alonso, P.L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., Binka, F., Chitnis, C., Collins, F., Doumbo, O.K., Greenwood, B., Hall, B.F., Levine, M.M., Mendis, K., Newman, R.D., Plowe, C. V, Rodriguez, M.H., Sinden, R., Slutsker, L., Tanner, M., 2011. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* 8, e1000406.
- Anderson, R.A., Knols, B.G., Koella, J.C., 2000. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitology* 120, 329–333.
- Anderson, R.A., Koella, J.C., Hurd, H., 1999. The effect of *Plasmodium yoelii* nigeriensis infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266, 1729–1733.
- Añez, N., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII--Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 249–255.
- Baeshen, R., Ekechukwu, N.E., Toure, M., Paton, D., Coulibaly, M., Traoré, S.F., Tripet, F., 2014. Differential effects of inbreeding and selection on male reproductive phenotype associated with the colonization and laboratory maintenance of *Anopheles gambiae* . *Malar. J.* 13, 19.
- Baker, H., Baker, I., 1973. Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241, 543 – 545.
- Baldini, F., Gabrieli, P., Rogers, D.W., Catteruccia, F., 2012. Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae* : a comparison with other insect vectors of infectious diseases. *Pathog. Glob. Health* 106, 82–93.
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Robert Shaw, W., Dabiré, R.K., Diabaté, A., Levashina, E.A., Catteruccia, F., 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae* . *Nat. Commun.* 5, 3985.
- Bargielowski, I., Koella, J.C., 2009. A possible mechanism for the suppression of *Plasmodium berghei* development in the mosquito *Anopheles gambiae* by the microsporidian *Vavraia culicis*. *PLoS One* 4, e4676.

- Baton, L.A., Ranford-cartwright, L.C., 2012. Ookinete destruction within the mosquito midgut lumen explains *Anopheles albimanus* refractoriness to *Plasmodium falciparum* (3D7A) oocyst infection. *Int. J. Parasitol.* 42, 249–258.
- Beier, J.C., 1996. Frequent blood-feeding and restrictive sugar-feeding behavior enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae* s.l. and *An. funestus* (Diptera:Culicidae) in western Kenya. *J Med Entomol* 33, 613–618.
- Bize, P., Jeanneret, C., Klopfenstein, A., Roulin, A., 2008. What Makes a Host Profitable ? Parasites Balance Host Nutritive Resources against Immunity. *Am. Nat.* 171, 107–118.
- Blandin, S., Levashina, E. a., 2004. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 16–20.
- Blandin, S., Marois, E., Levashina, E., 2008. Antimalarial responses in *Anopheles gambiae* : from a complement-like protein to a complement-like pathway. *Cell Host Microbe* 3, 364–74.
- Blanford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M.B., 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 308, 1638–1641.
- Blanford, S., Read, A.F., Thomas, M.B., 2009. Thermal behaviour of *Anopheles stephensi* in response to infection with malaria and fungal entomopathogens. *Malar. J.* 8, 72.
- Boëte, C., 2005. Malaria parasites in mosquitoes: Laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol.*
- Boissière, A., Gimonneau, G., Tchioffo, M.T., Abate, L., Bayibeki, A., Awono-Ambéné, P.H., Nsango, S.E., Morlais, I., 2013. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae* s.s. in Cameroon. *PLoS One* 8, e54820.
- Bousema, T., Sutherland, C.J., Churcher, T.S., Mulder, B., Gouagna, L.C., Riley, E.M., Targett, G.A.T., Drakeley, C.J., 2011. Human immune responses that reduce the transmission of *Plasmodium falciparum* in African populations. *Int. J. Parasitol.* 41, 293–300.
- Boyd, 1949. Epidemiology: factors related to the definitive host, in: *Malariology*. pp. 608–697.
- Boyd, 1932. Studies on *Plasmodium vivax* . II. The influence of temperature on the duration of the extrinsic incubation period. *J Hyg* 16, 851.
- Breman, J.G., Brandling-Bennett, A.D., 2011. The challenge of malaria eradication in the twenty-first century: Research linked to operations is the key. *Vaccine* 29, Supp4 D97–103.
- Bregues, 1973. Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (sp A) et d'*An. funestus* Giles en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. *Cah. Orstom, sér. Ent. Méd. Parasitol.* 11, 107–126.
- Briegel, H., 1980. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia* 36.

- Carius, H.J., Little, T.J., Ebert, D., 2001. Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution* 55, 1136–1145.
- Carter, R., 2001. Transmission blocking malaria vaccines, in: *Vaccine*. pp. 2309–2314.
- Cator, L.J., George, J., Blanford, S., Murdock, C.C., Baker, T.C., Read, A.F., Thomas, M.B., 2013. “Manipulation” without the parasite: altered feeding behaviour of mosquitoes is not dependent on infection with malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20130711.
- Cator, L.J., Lynch, P.A., Read, A.F., Thomas, M.B., 2012. Do malaria parasites manipulate mosquitoes? *Trends Parasitol.*
- Charlwood, J.D., Pinto, J., Sousa, C.A., Madsen, H., Ferreira, C., do Rosario, V.E., 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J Vector Ecol* 27, 178–183.
- Chun, J., Riehle, M., Paskewitz, S., 1995. Effect of mosquito age and reproductive status on melanization of sephadex beads in *Plasmodium* -refractory and -susceptible strains of *Anopheles gambiae* *J Invertebr Pathol* 66, 11–17.
- Cirimotich, C.M., Dong, Y., Garver, L.S., Sim, S., Dimopoulos, G., 2010. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 387–395.
- Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* 10, 307–310.
- Clayton, D., Moore, j, 1997. *Host-parasite Evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press.
- Clements, A.N., 2011. *The biology of mosquitoes, The Biology of Mosquitoes*.
- Clements, A.N., 1999. *The Biology of Mosquitoes*. CABI Publ. New York, NY.
- Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Torre, A. Della, Coulibaly, M.B., Besansky, N.J., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus* , new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619, 246–274.
- Cohuet, A., Osta, M.A., Morlais, I., Awono-Ambene, P.H., Michel, K., Simard, F., Christophides, G.K., Fontenille, D., Kafatos, F.C., 2006. *Anopheles* and *Plasmodium* : from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285–1289.
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vernick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C., Gwadz, R.W., 1986. Genetic selection of a *Plasmodium* -refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae* *Science* (80-.). 234, 607–610.
- Coluzzi, M., Petrarca, V., di Deco, M. a., Deco, M. a, 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae* *Bolletino di Zool.* 52, 45–63.
- Combes, C., 2001. *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions, Parasitism The ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press.

- Cory, J., Hoover, K., 2006. Plant-mediated effects in insect–pathogen interactions. *Trends Ecol. Evol.* 21, 278–286.
- Costantini, C., Li, S.-G., Della Torre, A., Sagnon, N., Coluzzi, M., Taylor, C.E., 1996. Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a west African Sudan savanna village. *Med. Vet. Entomol.* 10, 203–219.
- Crawley, K.R., Hyndes, G.A., Vanderklift, M.A., 2007. Variation among diets in discrimination of ^{13}C and ^{15}N in the amphipod *Allorchestes compressa*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 349, 370–377.
- Cressler, C.E., Nelson, W.A., Day, T., Mccauley, E., 2014. Disentangling the interaction among host resources, the immune system and pathogens. *Ecol. Lett.*
- Da, D.F., Dixit, S., Sattabonkot, J., Mu, J., Abate, L., Ramineni, B., Ouedraogo, J.B., Macdonald, N.J., Fay, M.P., Su, X.-Z., Cohuet, A., Wu, Y., 2013. Anti-Pfs25 Human Plasma Reduces Transmission of Diverse *Plasmodium falciparum* Isolates by Direct Membrane Feeding Assays. *Infect. Immun.* IAI.00016–13–.
- Dabiré, K.R., Baldet, T., Diabaté, A., Dia, I., Costantini, C., Cohuet, A., Guiguemdé, T.R., Fontenille, A., 2007. *Anopheles funestus* (Diptera : Culicidae) in a Humid Savannah Area of Western Burkina Faso : Bionomics , Insecticide Resistance Status , 990–997.
- Dabire, K.R., Sawadodgo, S., Diabate, A., Toe, K.H., Kengne, P., Ouari, A., Costantini, C., Gouagna, C., Simard, F., Baldet, T., Lehmann, T., Gibson, G., 2013. Assortative mating in mixed swarms of the mosquito *Anopheles gambiae* s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 27, 298–312.
- Dabiré, K.R., Sawadogo, P.S., Hien, D.F., Bimbilé-Somda, N.S., Soma, D.D., Millogo, A., Baldet, T., Gouagna, L.-C., Simard, F., Lefèvre, T., Diabaté, A., Lees, R.S., Gilles, J.R.L., 2014. Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso City, Burkina Faso, West Africa. *Acta Trop.* 132 Suppl, S35–41.
- Daoust, S., King, K., Brodeur, J., Roitberg, B., Roche, B., Thomas, F., 2015. Making the best of a bad situation: Host partial resistance and bypass of behavioral manipulation by parasites? *Trends Parasitol.*
- Daszak, P., Cunningham, A., and Hyatt, A., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* (80-.). 287, 443–449.
- Dawes, E.J., Zhuang, S., Sinden, R.E., Basáñez, M.-G., 2009. The temporal dynamics of *Plasmodium* density through the sporogonic cycle within *Anopheles* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1197–1198.
- Decaestecker, E., De Meester, L., Ebert, D., 2002. In deep trouble: habitat selection constrained by multiple enemies in zooplankton. *PNAS* 99, 5481–5485.
- De-Meeûs, T., Renaud, F., 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol.*
- De-Roode, J.C., Lefèvre, T., 2012. Behavioral Immunity in Insects. *Insects* 3, 789–820.

- De-Roode, J.C., Lefèvre, T., Hunter, M.D., 2013. Ecology. Self-medication in animals. *Science* 340, 150–1.
- Despommier, D., Gwadz, R., Hotez, P., Knirsch, C., 2005. *Parasitic Diseases* (Apple Trees Productions, New York),. Apple Trees Production, New York.
- Detinova, T.S., 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monogr. Ser. World Health Organ.* 47, 13–191.
- Diabate, A., Baldet, T., Brengues, C., Kengne, P., Dabire, K.R., Simard, F., Chandre, F., Hougard, J.M., Hemingway, J., Ouedraogo, J.B., Fontenille, D., 2003. Natural swarming behaviour of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 713–716.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kengne, P., Brengues, C., Baldet, T., Ouari, A., Simard, F., Lehmann, T., 2006. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entomol.* 43, 480–483.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Millogo, N., Lehmann, T., 2007. Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44, 60–64.
- Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G., 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5, e1000423.
- Fane, M., Cissé, O., Traore, C., Sabatier, P., 2012. *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroid-treated nets in cotton versus rice areas in Mali. *Acta Trop.*
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, S.I. and L.C., 2001. Molecular characterization of ribosomal polymorphisms among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Mol. Biol* 1.
- Feachem, R.G. a, Phillips, A. a., Hwang, J., Cotter, C., Wielgosz, B., Greenwood, B.M., Sabot, O., Rodriguez, M.H., Abeyasinghe, R.R., Ghebreyesus, T.A., Snow, R.W., 2010. Shrinking the malaria map: Progress and prospects. *Lancet* 376, 1566–1578.
- Fellous, S., Lazzaro, B.P., 2010. Larval food quality affects adult (but not larval) immune gene expression independent of effects on general condition. *Mol. Ecol.* 19, 1462–8.
- Ferguson, H.M., Read, a F., 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc. Biol. Sci.* 269, 1217–24.
- Foster, W.A., 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 443–474.
- Fred-Aboagye, A., Guindo, A., Traoré, A.S., Hurd, H., Coulibaly, M., Traoré, S., Tripet, F., 2010. Hydric stress-dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild-caught *Anopheles gambiae* female mosquitoes. *Malar. J.* 9, 243.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen,

- J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., Barrell, B., 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498–511.
- Garrett-Jones, C., Shidrawi, G.R., 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bull. World Health Organ.* 40, 531–545.
- Garver, L.S., Dong, Y., Dimopoulos, G., 2009. Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse *Anopheline* Species. *PLoS Pathog.* 5, e1000335.
- Gary, R., Foster, W., 2001. Effects of Available Sugar on the Reproductive Fitness and Vectorial Capacity of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38, 22–28.
- Gary, R.E., Foster, W.A., 2004. *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants. *Med. Vet. Entomol.* 18, 102–107.
- Gendrin, M., Rodgers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouédraogo, J.B., Basáñez, M.-G., Cohuet, A., Christophides, G.K., 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat. Commun.* 6, 5921.
- Gowler, C.D., Leon, K.E., Hunter, M.D., De Roode, J.C., 2015. Secondary defense chemicals in milkweed reduce parasite infection in monarch butterflies, *Danaus plexippus*. *J. Chem. Ecol.* 41, 520–523.
- Grassi, B., 1901. No Title Studi di uno zoologo sulla malaria. *Atti dei Lincei Mem* 3, 229–505.
- Grieco, J., Achee, N., Roberts, D., Andre, R., 2005. Comparative susceptibility of three species of anopheles from belize, central america, to *Plasmodium falciparum* (NF-54). *JAm Mosq Control Assoc* 21.
- Gu, W., Müller, G., Schlein, Y., Novak, R.J., Beier, J.C., 2011. Natural plant sugar sources of *Anopheles* mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. *PLoS One* 6, e15996.
- Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R.E., Barillas-Mury, C., 2009. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell host microbe* 5, 498–507.
- Hall, S.R., Simonis, J.L., Nisbet, R.M., Tessier, A.J., Cáceres, C.E., 2009. Resource Ecology of Virulence in a Planktonic Host-Parasite System: An Explanation Using Dynamic Energy Budgets. *Am. Nat.* 174, 149–162.
- Hamilton, W.D., 1980. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* 35, 282–290.
- Hamilton, W.D., Zuk, M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218, 384–387.

- Harris, C., Lambrechts, L., Rousset, F., Abate, L., Nsango, S.E., Fontenille, D., Morlais, I., Cohuet, A., 2010. Polymorphisms in *Anopheles gambiae* immune genes associated with natural resistance to *Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog. 6, e1001112.
- Harris, C., Morlais, I., Churcher, T.S., Awono-Ambene, P., Gouagna, L.C., Dabire, R.K., Fontenille, D., Cohuet, A., 2012. *Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations. PLoS One 7, e30849.
- Hart, B.L., 2005. The evolution of herbal medicine: Behavioural perspectives. Anim. Behav.
- Hasselquist, D., Nilsson, J.-A., 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 51–60.
- Heil, M., 2016. Host Manipulation by Parasites: Cases, Patterns, and Remaining Doubts. Front. Ecol. Evol. 4.
- Hien, D.F.S., Dabiré, K.R., Roche, B., Diabaté, A., 1, 1, 3, 1, Gouagna, L.-C., 3, 4, 5, Simard, F., 3, 1, 6, 1, 3, *, 2016. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria 1–17.
- Hillyer, J., Schmidt, S., Fuchs, J., Boyle, J., Christensen, B., 2005. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. Cell. Microbiol. 7, 39–51.
- Hogg, J.C., Hurd, H., 1997. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. Parasitology 114, 325–31.
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nuskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.M.C., Wides, R., Salzberg, S.L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.H., Rusch, D.B., Lai, Z., Kraft, C.L., Abril, J.F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Baden, H., De Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G.K., Chrystal, M.A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C.A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M.E., Hladun, S.L., Hogan, J.R., Hong, Y.S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J.-J., Lobo, N.F., Lopez, J.R., Malek, J.A., McIntosh, T.C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S.D., O’Brochta, D.A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M.A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V, Sitter, C.D., Shetty, J., Smith, T.J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L.Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M.F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K.J., Wortman, J.R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E.M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu, S.C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., Della Torre, A., Roth, C.W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R.J., Myers, E.W., Adams, M.D., Smith, H.O., Broder, S., Gardner, M.J., Fraser, C.M., Birney, E., Bork, P., Brey, P.T., Venter, J.C., Weissenbach, J., Kafatos, F.C., Collins, F.H., Hoffman, S.L., 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science (80-.). 298, 129–149.
- Hughes, G.L., Ren, X., Ramirez, J.L., Sakamoto, J.M., Bailey, J.A., Jedlicka, A.E., Rasgon, J.L., 2011. *Wolbachia* infections in *Anopheles gambiae* cells: transcriptomic characterization of a novel host-symbiont interaction. PLoS Pathog. 7, e1001296.
- Hughes, D. P., Brodeur, J., and Thomas, F., 2012. Host Manipulation by Parasites. Oxford Univ. Press.

- Hurd, H., 2003. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 141–161.
- Ibrahim, N., Mathew, L., 2014. Comparative analysis of cardiac glycosides and quantification of peruvoside from *Thevetia neriiifolia*, Juss fruit rind extracts through HPLC fingerprinting. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*
- Iman, R., Helton, J., Campbell, J., 1981. An approach to sensitivity analysis of computer models, Part 1. Introduction, input variable selection and preliminary variable assessment. *J. Qual. Technol.* 13, 174–183.
- Imwong, M., Nakeesathit, S., Day, N.P., White, N.J., 2011. A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. *Malar. J.* 10, 253.
- Isaacs, A.T., Li, F., Jasinskiene, N., Chen, X., Nirmala, X., Marinotti, O., Vinetz, J.M., James, A.A., 2011. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi* PLoS Pathog. 7.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L. a, Wimmer, E. a, Jacobs-Lorena, M., 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417, 452–455.
- Jacobson, R., Schlein, Y., 1999. Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sand γ and in culture 93, 351–356.
- Jenni, L., Molyneux, D.H., Livesey, J.L., Galun, R., 1980. Feeding behaviour of tsetse flies infected with salivarian trypanosomes. *Nature* 283, 383–385.
- Jones, M.D.R., Gubbins, S.J., 1978. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiol. Entomol.*
- Joy, D.A., Gonzalez-Ceron, L., Carlton, J.M., Gueye, A., Fay, M., McCutchan, T.F., Su, X., 2008. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *MBE* 25, 1245–52.
- Jr, R.E.G., Foster, W.A., 2004. *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants 102–107.
- Kamareddine, L., 2012. The biological control of the malaria vector. *Toxins (Basel)*. 4, 748–767.
- Kaslow, D.C., 1997. Transmission-blocking vaccines: Uses and current status of development, in: *International Journal for Parasitology*. pp. 183–189.
- Keeling, M., Rohani, P., 2008. Modeling infectious diseases in humans and animals. Princet. Univ. Press. p.
- Kitthawee, S., Edman, J.D., Sattabongkot, J., 1990. Evaluation of survival potential and malaria susceptibility among different size classes of laboratory-reared *Anopheles dirus* Am. J. Trop. Med. Hyg. 43, 328–332.

- Koella, J.C., Packer, M.J., 1996. Malaria parasites enhance blood-feeding of their naturally infected vector *Anopheles punctulatus*. *Parasitology* 113 (Pt 2, 105–9.
- Koella, J.C., Rieu, L., Paul, R.E.L., 2002. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* *Behav. Ecol.* 13, 816–820.
- Koella, J.C., Sørensen, F.L., 2002. Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi* *Med. Vet. Entomol.* 16, 316–320.
- Koella, J.C., Sørensen, F.L., Anderson, R.A., 1998. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc. Biol. Sci.* 265, 763–8.
- Lambrechts, L., Chavatte, J.-M., Snounou, G., Koella, J.C., 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 273, 1501–6.
- Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L.C., Koella, J.C., 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 4, 3.
- Lee, K.P., Simpson, S.J., Wilson, K., 2008. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.* 22, 1052–1061.
- Lefèvre, T., Adamo, S. a, Biron, D.G., Missé, D., Hughes, D., Thomas, F., 2009a. Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Adv. Parasitol.* 68, 45–83.
- Lefèvre, T., Gouagna, L., Dabiré, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., Costantini, C., Thomas, F., 2010a. Beer consumption increases human attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One* 5.
- Lefèvre, T., Gouagna, L.C., Dabire, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Costantini, C., Thomas, F., 2009b. Evolutionary lability of odour-mediated host preference by the malaria vector *Anopheles gambiae* *Trop. Med. Int. Heal.* 14, 228–236.
- Lefèvre, T., Koella, J., Renaud, F., Hurd, H., Biron, D., Thomas, F., 2006. New prospects for research on manipulation of insect vectors by pathogens. *PLoS Pathog.* 2, e72.
- Lefèvre, T., Lebarbençon, C., Gauthier-Clerc, M., Miss, D., Poulin, R., Thomas, F., 2009. The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol. Evol.*
- Lefèvre, T., Oliver, L., Hunter, M., De-Roode, J., 2010b. Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecol. Lett.* 13, 1485–93.
- Lefèvre, T., Thomas, F., 2008. Behind the scene, something else is pulling the strings: Emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect. Genet. Evol.* 8, 504–519.
- Lefèvre, T., Vantoux, A., Dabiré, K.R., Mouline, K., Cohuet, A., 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9, e1003365.

- Lefèvre, T., Williams, A.J., De Roode, J.C., 2011. Genetic variation in resistance, but not tolerance, to a protozoan parasite in the monarch butterfly. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 751–759.
- Le-Goff, G., Boundy, S., Daborn, P.J., Yen, J.L., Sofer, L., Lind, R., Sabourault, C., Madi-Ravazzi, L., Ffrench-Constant, R.H., 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 701–708.
- Li, J., Collins, W.E., Wirtz, R.A., Rathore, D., Lal, A., McCutchan, T.F., 2001. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg. Infect. Dis.*
- Li, J., Wang, X., Zhang, G., Githure, J.I., Yan, G., James, A. a, 2013. Genome-block expression-assisted association studies discover malaria resistance genes in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20675–80.
- Lima-Camara, T.N., Bruno, R. V, Luz, P.M., Castro, M., Lourenzo-de-Oliveira, R., Sorgine, M.F., Peixoto, A., 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One* 6.
- Liu, K., Dong, Y., Huang, Y., Rasgon, J.L., Agre, P., 2013. Impact of trehalose transporter knockdown on *Anopheles gambiae* stress adaptation and susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17504–9.
- Lorenz, L.M., Koella, J.C., 2011. The microsporidian parasite *Vavraia culicis* as a potential late life-acting control agent of malaria. *Evol. Appl.* 4, 783–790.
- Lozano, G.A., 1998. Parasitic Stress and Self-Medication in Wild Animals 27, 291–317.
- Lyimo, E.O., Koella, J.C., 1992. Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s.l. and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 104 (Pt 2, 233–237.
- Lyons, C.L., Coetzee, M., Terblanche, J.S., Chown, S.L., 2012. Thermal limits of wild and laboratory strains of two African malaria vector species, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Malar. J.* 11, 226.
- MacDonald, G., 1957. *The Epidemiology and Control of Malaria*. London Oxford Univ. Press.
- MacDonald, G., 1956. Epidemiological basis of malaria control. *Bull. World Health Organ.* 15, 613–626.
- Mack, S., Samuels, S., Vandenberg, J., 1979. Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei* -infected mosquitoes. 3. Carbohydrates. *J Parasitol.* 65, 217–21.
- Manda, H., Gouagna, L., Foster, W., Jackson, R., Beier, J., Githure, J., Hassanali, A., 2007a. Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6, 113.
- Manda, H., Gouagna, L., Nyandat, E., Kabiru, E., Jackson, R., Foster, W., Githure, J., Beier, J., Hassanali, A., 2007b. Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. on endemic plants in western Kenya. *Med. Vet. Entomol.* 21, 103–111.

- Manson, J.S., Otterstatter, M.C., Thomson, J.D., 2010. Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia* 162, 81–9.
- Mason, P.A., Singer, M.S., 2015. Defensive mixology: combining acquired chemicals towards defence. *Funct. Ecol.* 29, 441–450.
- Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F.C., Christophides, G.K., 2009. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5, e1000542.
- Michalakis, Y., 2009. Parasitism and the evolution of life-history traits, in: Thomas, F., Guégan, J.-F., Renaud, F. (Eds.), *Ecology and Evolution of Parasitism*. Oxford University Press, London, pp. 19–30.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Mpingwa, M.W., Lwetoijera, D.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Koenraadt, C.J.M., Russell, T.L., 2011. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: Effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol. Res.* 108, 317–322.
- Molina-Cruz, A., Canepa, G.E., Kamath, N., Pavlovic, N. V, Mu, J., Ramphul, U.N., Ramirez, J.L., Barillas-Mury, C., 2015. *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15178–83.
- Molina-Cruz, A., DeJong, R., Ortega, C., Haile, A., Abban, E., Rodrigues, J., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C., 2012. Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1957–62.
- Molina-Cruz, A., Garver, L.S., Alabaster, A., Bangiolo, L., Haile, A., Winikor, J., Ortega, C., van Schaijk, B.C.L., Sauerwein, R.W., Taylor-Salmon, E., Barillas-Mury, C., 2013. The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science* 340, 984–7.
- Molyneux, D.H., Jefferies, D., 1986. Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitology* 92(3), 721–736.
- Moore, J., 2002. *Parasites and the Behavior of Animals*. Univ. Press.
- Moore, J., 1993. Parasites and the behavior of biting flies. *J. Parasitol.* 79, 1–16.
- Morand, S., Deter, J., 2007. Parasitisme et régulation des populations hôtes., in: Thomas, F., Guégan, J., Renaud, F. (Eds.), *Ecologie et Evolution Des Système Parasités*. p. 13–56.
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, a, Magnaval, J.F., 2002. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 503–508.
- Mostowy, W.M., Foster, W. a, 2004. Antagonistic effects of energy status on meal size and egg-batch size of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. vector Ecol.* 29, 84–93.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Coe, R., Knols, B.G.J., 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 1, 17.

- Mukabana, W.R., Takken, W., Killeen, G.F., Knols, B.G.J., 2004. Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 3, 1.
- Müller, G., Beier, J., Traore, S., Toure, B., Traore, M., Bah, S., 2010a. Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the *Anopheles gambiae* complex in Mali , West Africa 3–9.
- Müller, G., Beier, J., Traore, S., Toure, M., Traore, M., Bah, S., Doumbia, S., Schlein, Y., 2010b. Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits / seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods 1–11.
- Müller, G., Junnila, A., Qualls, W., Revay, E., Kline, D.L., Allan, S., Schlein, Y., Xue, R., 2010c. Control of *Culex quinquefasciatus* in a storm drain system in Florida using attractive toxic sugar baits. *Med. Vet. Entomol.* 24, 346–351.
- Müller, G., Junnila, A., Schlein, Y., 2010d. Effective Control of Adult *Culex pipiens* by Spraying an Attractive Toxic Sugar Bait Solution in the Vegetation Near Larval Habitats Effective Control of Adult *Culex pipiens* by Spraying an Attractive Toxic Sugar Bait Solution in the Vegetation Near 47, 63–66.
- Müller, G.C., Kravchenko, V.D., Schlein, Y., 2008. Decline Of *Anopheles sergentii* and *Aedes caspius* Populations Following Presentation Of Attractive Toxic (Spinosad) Sugar Bait Stations In An Oasis 24, 147–149.
- Munstermann, L.E., 1994. Unexpected Genetic Consequences of Colonization and Inbreeding: Allozyme Tracking in Culicidae (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 158–164.
- Murdock, C., Paaijmans, K., Foster, D., Thomas, Read, A., B., & M., 2012. Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 869–876.
- Nachtigall, 1974. *Insects in flight*. New York, Mc Graw-Hill.
- Namountougou, M., Diabaté, A., Etang, J., Bass, C., Sawadogo, S.P., Gnankinié, O., Baldet, T., Martin, T., Chandre, F., Simard, F., Dabiré, R.K., 2013. First report of the L1014S kdr mutation in wild populations of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 125, 123–7.
- Norris, D.E., Shurtleff, A.C., Toure, Y.T., Lanzaro, G.C., 2001. Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera : <i>Culicidae</i>). *J. Med. Entomol.* 38, 336–340.
- Nyaseembe, V., Teal, P.E.A., Sawa, P., Tumlinson, J., Borgemeister, C., Torto, B., 2014. *Plasmodium falciparum* infection increases *Anopheles gambiae* attraction to nectar sources and sugar uptake. *Curr. Biol.* 24, 217–221.
- Ode, P.J., 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 163–185. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151110

- Okech, B.A., Gouagna, L., Killeen, G., Knols, B.J., Kabiru, E.W., Beier, J., Yan, G., Githure, J.I., 2003. Influence of sugar availability and indoor microclimate on survival of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under semifield conditions in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 40, 657–663.
- Okech, B.A., Gouagna, L.C., Kabiru, E.W., Beier, J.C., Yan, G., Githure, J.I., 2004. Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *Plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers. *J Insect Sci* 4, 33.
- OMS, 2016. OMS. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205422/1/WHO_HTM_GMP_2016.2_fre.pdf
- OMS, 2015. World Malaria Report. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/wmr2015-profiles.pdf>
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2011. Effects of host diversity on infectious disease. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 157–182.
- Ouédraogo, L.T., Drabo, K.M., Zongo, P.S., 2012. Évaluation de l'application du protocole national de traitement des cas de paludisme simple en milieu rural au Burkina Faso. *Sante Publique (Paris)*. 24, 353–363.
- Paaijmans, K.P., Blanford, S., Bell, A.S., Blanford, J.I., Read, A.F., Thomas, M.B., 2010. Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15135–9.
- Paaijmans, K.P., Blanford, S., Chan, B.H.K., Thomas, M.B., 2012. Warmer temperatures reduce the vectorial capacity of malaria mosquitoes. *Biol. Lett.* 8, 465–8.
- Paaijmans, K.P., Thomas, M.B., 2011. The influence of mosquito resting behaviour and associated microclimate for malaria risk. *Malar. J.* 10, 183.
- Paul, R.E.L., Ariey, F., Robert, V., 2003. The evolutionary ecology of *Plasmodium*. *Ecol. Lett.* 6, 866–880.
- Paul, R.E.L., Nu, V.A.T., Krettli, A.U., Brey, P.T., 2002. Interspecific competition during transmission of two sympatric malaria parasite species to the mosquito vector. *Proc. Biol. Sci.* 269, 2551–2557.
- Pennetier, C., Warren, B., Dabiré, K.R., Russell, I.J., Gibson, G., 2010. “Singing on the Wing” as a Mechanism for Species Recognition in the Malarial Mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr. Biol.* 20, 131–136.
- Petrarca, V., Petrangeli, G., Rossi, P., Sabatinelli, G., 1986. [Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages]. *Parassitologia* 28, 41–61.
- Pichon, G., Awono-Ambene, H.P., Robert, V., 2000. High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology* 121 (Pt 2, 115–120.

- Pigeault, R., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2015. Mosquito age and avian malaria infection. *Malar. J.* 1–11.
- PNLP, 2014. Programme national de lutte contre le Paludisme. <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS19/MIS19.pdf>
- Pollitt, L.C., Bram, J.T., Blanford, S., Jones, M.J., Read, A.F., 2015. Existing Infection Facilitates Establishment and Density of Malaria Parasites in Their Mosquito Vector. *PLoS Pathog.* 11, e1005003.
- Ponton, F., Wilson, K., Cotter, S.C., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2011. Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathog.* 7, e1002223.
- Poulin, R., 2014. Parasite biodiversity revisited: Frontiers and constraints. *Int. J. Parasitol.*
- Poulin, R., 2010. Parasite Manipulation of Host Behavior: an update and frequently asked questions, *Advances in the Study of Behavior.*
- Poulin, R., 2007. Evolutionary ecology of parasites: (Second edition). *Evol. Ecol. Parasites* 1–332.
- Poulin, R., Morand, S., 2000. The diversity of parasites. *Q. Rev. Biol.*
- Prugnolle, F., Manica, A., Charpentier, M., Guégan, J.F., Guernier, V., Balloux, F., 2005. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol.* 15, 1022–1027.
- Qiu, Y.T., Smallegange, R.C., Van Loon, J.J.A., Ter Braak, C.J.F., Takken, W., 2006. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s. s. *Med. Vet. Entomol.* 20, 280–287.
- Qiu, Y. T., Smallegange, R. C., Van Loon, J. J. A., and Takken, W., 2011. Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Med. Vet. Entomol.* 25, 247–255.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing, Development.
- Ravoahangimalala, R., Rakotoarivony, H., Le Goff, G., Fontenille, D., 2003. Ecoéthologie des vecteurs et transmission du paludisme dans la région rizicole de basse altitude de Mandritsara, Madagascar. *Bull. la Société Pathol. Exot.* 96, 323–328.
- Rebeil, R., Jarrett, C.O., Driver, J.D., Ernst, R.K., Oyston, P.C.F., Hinnebusch, B.J., 2013. Induction of the *Yersinia pestis* PhoP-PhoQ regulatory system in the flea and its role in producing a transmissible infection. *J. Bacteriol.* 195, 1920–1930.
- Redmond, S.N., Eiglmeier, K., Mitri, C., Markianos, K., Guelbeogo, W.M., Gneme, A., Isaacs, A.T., Coulibaly, B., Brito-Fravallo, E., Maslen, G., Mead, D., Niare, O., Traore, S.F., Sagnon, N., Kwiatkowski, D., Riehle, M.M., Vernick, K.D., 2015. Association mapping by pooled sequencing identifies TOLL 11 as a protective factor against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* . *BMC Genomics* 16, 779.

- Richardson, L.L., Adler, L.S., Leonard, A.S., Andicoechea, J., Regan, K.H., Anthony, W.E., Manson, J.S., Irwin, R.E., 2015. Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees. *Proc. R. Soc. B* 282, 20142471.
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A.F., Gandon, S., 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog.* 6, 5–6.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, O.V. et C.P., 1985. La transmission de paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo Dioulasso (Burkina Faso). *Ann Soc belge Med trop.* 1985; 65: 201 - 214.
- Robert, V., Boudin, C., 2003. Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* 96, 6–20.
- Rodhain, F., Perez, C., 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.*, Editeur Pa. ed.
- Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves, L.C., Dixit, R., Barillas-Mury, C., 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329, 1353–5.
- Rogers, D.W., Baldini, F., Battaglia, F., Panico, M., Dell, A., Morris, H.R., Catteruccia, F., 2009. Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. *PLoS Biol.* 7.
- Rogers, M.E., 2012. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Front. Microbiol.* 3, 223.
- Rogers, M.E., Bates, P.A., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 3, 0818–0825.
- Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M.C., Spielman, A., 1986. Increased biting rate and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 277–279.
- Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M.C., Spielman, A., 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 17–20.
- Rothschild, 1972. some observation on the relationship between plants, toxic insects and bird. pp. 1–12.
- Roux, O., Vantaux, A., Roche, B., Yameogo, B., Dabiré, K.R., Diabaté, A., Simard, F., Lefèvre, T., 2016. Evidence for carry-over effects of predator exposure on pathogen transmission potential. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* In press.
- Rund, S.S.C., Lee, S.J., Bush, B.R., Duffield, G.E., 2012. Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 58, 1609–1619.
- Sangare, I., Dabire, R., Yameogo, B., Da, D.F., Michalakakis, Y., Cohuet, A., 2014. Stress dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. *Infect. Genet. Evol.* 25, 57–65.

- Sangare, I., Michalakis, Y., Yameogo, B., Dabire, R., Morlais, I., Cohuet, A., 2013. Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J* 12, 2.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z., della Torre, A., 2008. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar. J.* 7, 163.
- Sawadogo, P.S., Namountougou, M., Toé, K.H., Rouamba, J., Maïga, H., Ouédraogo, K.R., Baldet, T., Gouagna, L.C., Kengne, P., Simard, F., Costantini, C., Gibson, G., Diabaté, A., Lees, R.S., Gilles, J., Dabiré, K.R., 2014. Publisher's note. *Acta Trop.* 130, 24–34.
- Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y., Siva-Jothy, M.T., 2009. Introduction. *Ecological immunology. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 3–14.
- Schwartz, A., Koella, J.C., 2001. Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in *Plasmodium* - mosquito interactions. *Trends Parasitol.*
- Scott, T.W., Takken, W., 2012. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol.*
- Shaw, W.R., Marcenac, P., Childs, L.M., Buckee, C.O., Baldini, F., Sawadogo, S.P., Dabiré, R.K., Diabaté, A., Catteruccia, F., 2016. Wolbachia infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nat. Commun.* 7, 11772.
- Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.*
- Sinden, R.E., 2009. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology* 136, 1427–34.
- Sinden, R.E., 1998. Gametocytes and sexual development. *Malar. Parasite Biol. Pathog. Prot.* 25–48.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors 1–11.
- Sinka, M.E., Rubio-palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Boeckel, T. Van, Kabaria, C.W., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas : occurrence data , distribution maps and bionomic précis 1–26.
- Smallegange, R.C., van Gemert, G.J., van de Vegte-Bolmer, M., Gezan, S., Takken, W., Sauerwein, R.W., Logan, J.G., 2013. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. *PLoS One* 8.
- Smith, T.A., Chitnis, N., Bri??t, O.J.T., Tanner, M., 2011. Uses of mosquito-stage transmission-blocking vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.*

- Stam, J.M., Kroes, A., Li, Y., Gols, R., van Loon, J.J.A. a, Poelman, E.H., Dicke, M., 2014. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 689–713.
- Stanley, D., 2012. Aging and immunosenescence in invertebrates. *Isj* 9, 102–109.
- Stone, C.M., Foster, W.A., 2013. Plant-sugar feeding and vectorial capacity, in: *Ecology of Parasite-Vector Interactions*, Volume 3. pp. 35–79.
- Stone, C.M., Jackson, B.T., Foster, W.A., 2012. Effects of plant-community composition on the vectorial capacity and fitness of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 727–36.
- Suwanchaichinda, C., Paskewitz, S.M., 1998. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (*Diptera: Culicidae*) to melanize sephadex beads. *J Med Entomol* 35, 157–161.
- Thomas, F., Adamo, S., Moore, J., 2005. Parasitic manipulation: Where are we and where should we go? *Behav. Processes*.
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P., Renaud, F., 2002. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *J. Evol. Biol.* 15, 356–361.
- Thompson, J.N., Burdon, J.J., 1992. Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* 360, 121–125.
- Tidbury, H.J., Pedersen, A.B., Boots, M., 2011. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proc. Biol. Sci.* 278, 871–6.
- Tripet, F., Aboagye-Antwi, F., Hurd, H., 2008. Ecological immunology of mosquito–malaria interactions. *Trends Parasitol.* 24, 219–227.
- Tripet, F., Toure, A., Dolo, G., and Lanzaro GC, 2003. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by dna analysis of transferred sperm 68, 1–5.
- Van-den-Abbeele, J., Caljon, G., de Ridder, K., de Baetselier, P., Coosemans, M., 2010. *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. *PLoS Pathog.* 6.
- Vanderberg, J.P., Yoeli, M., 1966. Effects of temperature on sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *J. Parasitol.* 52, 559–564.
- Van-Handel, E., 1972. The detection of nectar in mosquitoes. *Mosq. News* 32, 458.
- Vantaux, A., Dabiré, K.R., Cohuet, A., Lefèvre, T., 2014. A heavy legacy: offspring of malaria-infected mosquitoes show reduced disease resistance. *Malar. J.* 13, 442.
- Van-Tol, S., Dimopoulos, G., 2016. Influences of the Mosquito Microbiota on Vector Competence. *Adv. Insect Physiol.* Elsevier.

- Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2012. *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc. Biol. Sci.* 279, 4033–41.
- Wang, S., Jacobs-Lorena, M., 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol.*
- Wekesa, J.W., Copeland, R.S., Mwangi, R.W., 1992. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 47, 484–488.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O. a, Dondorp, A.M., 2014. Malaria. *Lancet* 383, 723–35.
- Whitehead, S.R., Bowers, M.D., 2013. Evidence for the adaptive significance of secondary compounds in vertebrate-dispersed fruits. *Am. Nat.* 182, 563–77.
- Windsor, D.A., 1998. Most of the species on Earth are parasites. *Int. J. Parasitol.* 28, 1939–1941.
- Wolinska, J., King, K., 2009. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 25, 236–44.
- Wondji, C., Simard, F., Petrarca, V., Etang, J., Santolamazza, F., Torre, A.D., Fontenille, D., 2005. Species and Populations of the *Anopheles gambiae* Complex in Cameroon with Special Emphasis on Chromosomal and Molecular Forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J. Med. Entomol.* 42, 998–1005.
- Wood, C.L., Byers, J.E., Cottingham, K.L., Altman, I., Donahue, M.J., Blakeslee, A.M.H., 2007. Parasites alter community structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9335–9339.
- Wu, Y., Sinden, R.E., Churcher, T.S., Tsuboi, T., Yusibov, V., 2015. Development of Malaria Transmission-Blocking Vaccines: From Concept to Product. *Adv. Parasitol.* 89, 109–152.
- Yin, M., Laforsch, C., Lohr, J.N., Wolinska, J., 2011. Predator-induced defense makes daphnia more vulnerable to parasites. *Evolution (N. Y.)* 65, 1482–1488.
- Yuval, B., Holliday-Hanson, M.L., Washing, R.K., 1994. Energy budget of swarming male mosquitoes. *Ecol. Entomol.* 19, 74–78.
- Zhu, L., Qualls, W. a, Marshall, J.M., Arheart, K.L., DeAngelis, D.L., McManus, J.W., Traore, S.F., Doumbia, S., Schlein, Y., Müller, G.C., Beier, J.C., 2015. A spatial individual-based model predicting a great impact of copious sugar sources and resting sites on survival of *Anopheles gambiae* and malaria parasite transmission. *Malar. J.* 14, 59.

ANNEXES

PUBLICATIONS ET CONFÉRENCES

Publications

Domonbabele F.d. S. Hien, Kounbobr R. Dabiré, Benjamin Roche, Abdoulaye Diabaté, Rakiswende S. Yerbanga, Anna Cohuet, Bienvenue K. Yaméogo, Louis-Clément Gouagna, Richard J. Hopkins, Georges A. Ouedraogo, Frédéric Simard, Jean-Bosco Ouedraogo, Rickard Ignell, Thierry Lefevre. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria Plos pathogens DOI:10.1371/journal.ppat.1005773 August 4, 2016

Amélie Vantaux, **Domonbabele F. De Sales Hien**, Bienvenue Yameogo, Kounbobr R. Dabiré, Frédéric Thomas, Anna Cohuet and Thierry Lefèvre. Host-seeking of mosquitoes experimentally infected with sympatric field isolates of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* no evidence for host manipulation Front. Ecol. Evol., 03 August 2015 <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2015.00086>

Hermann Sié Pooda, Jean-Baptiste Rayaisse, **François De Sale Hien**, Thierry Lefèvre, Serge Yerbanga, Zakaria Bengaly, Roch K. Dabiré, Adrien M. G. Belem, Issa Sidibé, Philippe Solano and Karine Mouline. Administration of ivermectin to peridomestic cattle: a promising approach to target the residual transmission of human malaria. Malaria Journal 2015 **14**:496 DOI: 10.1186/s12936-015-1001-z

K.R.Dabiré, P.S.Sawadogo, **D.F. Hien**, N.S. Bimbilé-Somda, D.D. Soma, A. Millogo, T. Baldet, L.-C. Gouagna, F. Simard, T. Lefèvre, A. Diabaté, R.S. Lees, J. Gilles Occurrence of natural Anopheles arabiensis swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso city, Burkina Faso, West Africa. Acta Tropica 130 (2014) 44–50
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.016>

Article accepté

Phuong L. Nguyen^{a, 1}, Amélie Vantaux^{a, b, 1}, **Domonbabele FdS Hien^b**, Kounbobr R. Dabiré^{b,c}, Bienvenue K. Yameogo^b, Louis-Clément Gouagna^a, Didier Fontenille^{a,d}, François Renaud^a, Frédéric Simard^a, Carlo Costantini^a, Frédéric Thomas^a, Anna Cohuet^a, Thierry Lefèvre^{a, b,c}. Can malaria parasites manipulate the odour-mediated host preference of their mosquito vectors?

Articles en Preparations

Domonbabele FdS Hien, Kounbobr R. Dabiré, Malgren Louise, Abdoulaye Diabaté, Serge R. Yerbanga, Anna Cohuet, Bienvenue K. Yameogo, Louis-Clément Gouagna, Richard J. Hopkins, Georges A. Ouedraogo, Frédéric Simard, Jean-Bosco Ouedraogo, Rickard Ignell, Thierry Lefevre Influence of malaria infection on mosquito preference for natural nectar sources.

Conférences

2016 Société Africaine de parasitologie (SOAP).

Domonbabele François de Sales Hien, Kounbobr R. Dabiré, Malmgren Louise, Abdoulaye Diabaté, Serge R. Yerbanga, Anna Cohuet, Bienvenue K. Yameogo, Louis-Clément Gouagna, Richard J. Hopkins, Georges A. Ouedraogo, Frédéric Simard, Jean-Bosco Ouedraogo, Rickard Ignell, Thierry Lefevre. **Influence de l'infection du moustique *Anopheles coluzzii* avec *Plasmodium falciparum* sur le choix des sources naturelles de nectar.**

Au Palais des congrès de Bamako, Mali. **Poster**

2016 Journées Scientifiques de la Santé de Bobo-Dioulasso (JSSB).

Domonbabele François de Sales Hien, Kounbobr R. Dabiré, Malmgren Louise, Abdoulaye Diabaté, Serge R. Yerbanga, Anna Cohuet, Bienvenue K. Yameogo, Louis-Clément Gouagna, Richard J. Hopkins, Georges A. Ouedraogo, Frédéric Simard, Jean-Bosco Ouedraogo, Rickard Ignell, Thierry Lefevre. **Influence de l'infection du moustique *Anopheles coluzzii* avec *Plasmodium falciparum* sur le choix des sources naturelles de nectar.**

Au Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. **Communication orale**

2014 Société Africaine de parasitologie (SOAP).

Domonbabele François de Sales Hien, Abdoulaye Diabaté, Anna Cohuet, Serge Yerbanga, Jean-Bosco Ouedraogo, Georges Anicet Ouedraogo, Rickard Ignell, Kounbobr Roch Dabiré and Thierry Lefevre. **Influences des sources naturelles de nectar de plantes sur les interactions *Anopheles*–*P. falciparum*** A l'université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire. **Communication orale**

2014 The first Pan African Mosquito Control Association (PAMCA)

Domonbabele François de Sales Hien, Abdoulaye Diabaté, Anna Cohuet, Serge Yerbanga, Jean-Bosco Ouedraogo, Georges Anicet Ouedraogo, Rickard Ignell, Kounbor Roch Dabiré and Thierry Lefevre **Natural sources of plant sugars alter mosquito vector-malaria parasite interactions and disease transmission potential**

At Panari Hotel, Nairobi, Kenya. **Oral Communication**

RESEARCH ARTICLE

Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria

Domonbabele F. d. S. Hien^{1*}, Kounbobr R. Dabiré¹, Benjamin Roche², Abdoulaye Diabaté¹, Rakiswende S. Yerbanga¹, Anna Cohuet³, Bienvenue K. Yameogo¹, Louis-Clément Gouagna³, Richard J. Hopkins⁴, Georges A. Ouedraogo⁵, Frédéric Simard³, Jean-Bosco Ouedraogo¹, Rickard Ignell⁶, Thierry Lefevre^{1,3*}

1 Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo Dioulasso, Burkina Faso, **2** UMISCO lab (Unité de Modélisation Mathématique et Informatique des Systèmes Complexes), UMI IRD/UPMC 209, Bondy, France, **3** MIVEGEC lab (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), UMR Université Montpellier, CNRS 5290, IRD 224, 911 Av. Agropolis, Montpellier, France, **4** University of Greenwich, Natural Resource Institute—Department of Agriculture Health and Environment, Chatham Maritime, Kent, United Kingdom, **5** Université Polytechnique de Bobo Dioulasso, Bobo Dioulasso, Burkina Faso, **6** Unit of Chemical Ecology, Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden

* hiend83@yahoo.fr (DFdSH); thierry.lefevre@ird.fr (TL)



 OPEN ACCESS

Citation: Hien DFdS, Dabiré KR, Roche B, Diabaté A, Yerbanga RS, Cohuet A, et al. (2016) Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. *PLoS Pathog* 12(8): e1005773. doi:10.1371/journal.ppat.1005773

Editor: Kenneth D Vernick, Institut Pasteur, FRANCE

Received: January 27, 2016

Accepted: June 27, 2016

Published: August 4, 2016

Copyright: © 2016 Hien et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data have been deposited in dryad: Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria, doi:10.5061/dryad.9s690.

Funding: The work was funded by the ANR grant 11-PDOC-006-01 to TL (<http://www.agence-nationale-recherche.fr>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The ecological context in which mosquitoes and malaria parasites interact has received little attention, compared to the genetic and molecular aspects of malaria transmission. Plant nectar and fruits are important for the nutritional ecology of malaria vectors, but how the natural diversity of plant-derived sugar sources affects mosquito competence for malaria parasites is unclear. To test this, we infected *Anopheles coluzzi*, an important African malaria vector, with sympatric field isolates of *Plasmodium falciparum*, using direct membrane feeding assays. Through a series of experiments, we then examined the effects of sugar meals from *Thevetia neriifolia* and *Barleria lupulina* cuttings that included flowers, and fruit from *Lanena microcarpa* and *Mangifera indica* on parasite and mosquito traits that are key for determining the intensity of malaria transmission. We found that the source of plant sugar meal differentially affected infection prevalence and intensity, the development duration of the parasites, as well as the survival and fecundity of the vector. These effects are likely the result of complex interactions between toxic secondary metabolites and the nutritional quality of the plant sugar source, as well as of host resource availability and parasite growth. Using an epidemiological model, we show that plant sugar source can be a significant driver of malaria transmission dynamics, with some plant species exhibiting either transmission-reducing or -enhancing activities.

Author Summary

The *Anopheles coluzzii* mosquito is an effective vector of human *Plasmodium falciparum* malaria. Besides feeding on blood, females readily feed on natural sources of plant sugars; but how plant diversity affects their ability to transmit malaria parasites is currently

unknown. Here we show that mosquito feeding on peridomestic plant- and fruit-derived sugar sources can affect its interaction with *P. falciparum*, and hence malaria transmission. The planting of anti-*Plasmodium* plant sugar sources may represent a promising alternative strategy to contribute to the control of malaria.

Introduction

The ability of anopheline mosquitoes to transmit *Plasmodium falciparum* malaria is a complex phenotypic trait, determined by mosquito and parasite genetic factors, environmental factors, as well as the interaction between these factors [1–6]. A key environmental variable for host-parasite relationships is the availability and quality of food resources, which have been shown to influence host susceptibility, parasite infectivity and virulence, and ultimately disease dynamics [7]. The influence of diet on infectious diseases is particularly apparent in tritrophic interactions involving herbivorous insects, their parasites and larval food plants [8]. Such plant-mediated effects have often been attributed to either the direct toxic effect of plant secondary metabolites on parasite development [9], or differences in nutritional value that, in turn, affect host immunocompetence [10].

Mosquitoes, like herbivorous insects, are part of a multitrophic system that includes plants and parasites. Although female mosquitoes are well known blood-feeders, sugar sources such as nectar from floral and extra-floral nectaries, fruits and phloem sap compose an important part of their diet and have significant biological implications [11,12]. Recent studies indicate that females of *An. gambiae s.l.*, the main vector of *P. falciparum* in large areas of Africa, can locate and display preference for natural sources of plant sugar [13–16], and that environmental sugars may play a crucial role in malaria vectorial capacity (a standard measure of malaria transmission potential), through effects on mosquito survival [17–24] or blood-feeding rate [17,21–23]. However, feeding on plant tissues could also influence vectorial capacity by enhancing or mitigating infection in malaria mosquitoes.

Compared to the important efforts devoted to documenting plant-mediated interactions among herbivorous insects and their parasites [8], studies on the nutritional effects in mosquito-*Plasmodium* interactions have lagged behind despite obvious epidemiological importance. The few existing studies indicate that adult diet can indeed influence mosquito immunocompetence and susceptibility to malaria parasites [25–30]. However, these studies have focused on quantitative, as opposed to qualitative, changes in diet, and have used non-natural food sources (e.g. different concentrations of glucose solutions). Whether natural plant diversity affects mosquito susceptibility to malaria parasites therefore remains to be discovered.

The current study addresses questions of the impact of natural plant diversity on mosquito susceptibility to malaria parasites, using the natural tritrophic interaction between the parasite *P. falciparum*, responsible for causing the most severe form of human malaria, the mosquito *An. coluzzii* (formerly the M molecular form of *An. gambiae s.s.*), a major vector of *P. falciparum* in Africa, and a range of peridomestic plant- and fruit-derived sugar sources. We challenged *An. coluzzii* females with sympatric field isolates of *P. falciparum* using direct membrane feeding assays and, through a series of experiments, examined the effects of plant sugar sources on parasite and mosquito traits that are instrumental in determining the intensity of malaria transmission: (i) the early parasite development within mosquito guts, (ii) the proportion of mosquitoes harboring sporozoite transmissible stages (i.e. the sporozoite index), (iii) the extrinsic incubation period of the parasite (EIP), (iv) the survival and fecundity of infected mosquitoes, and (v) the costs and benefits to feed on these plant sugar sources for both infected

and uninfected mosquitoes. Finally, these results were combined into an epidemiological model to predict the relative contribution of different plant species to overall malaria transmission. We provide evidence for malaria transmission-reducing and -enhancing activities of some natural plant sugar sources.

Methods

Mosquitoes

Laboratory-reared *An. coluzzii* were obtained from an outbred colony established in 2008 and repeatedly replenished with F1 from wild-caught mosquito females collected in Kou Valley (11°23'14"N, 4°24'42"W), 30 km from Bobo Dioulasso, south-western Burkina Faso (West Africa), and identified by routine PCR-RFLP. Mosquitoes were held in 30 cm × 30 cm × 30 cm mesh-covered cages at the IRSS insectary under standard conditions (27 ± 2°C, 70 ± 5% relative humidity, 12:12 LD). Females were maintained on rabbit blood by direct feeding, and adult males and females fed with 5% glucose. Larvae were reared at a density of about 300 first instar larvae in 700 ml of water in plastic trays and were fed with Tetramin Baby Fish Food (Tetra-werke, Melle, Germany).

Plant materials and mosquito feeding on plant sugar source

We selected two perennial flowering ornamental plants: *Thevetia neriiifolia* and *Barleria lupulina* collected in the gardens and parkland of Bobo Dioulasso (S1A and S1B Fig); and two fruits: mango (*Mangifera indica*, variety “demoiselle”) and *Lannea microcarpa*, both locally produced and purchased from the market in Bobo Dioulasso (S1C and S1D Fig). The plants and fruits were selected based on (i) their wide distribution around human dwellings in villages and cities of western Burkina Faso, (ii) *An. coluzzii* females readily rest, probe and feed on them (inferred from both field and lab observations, S1 appendix and [31]), and (iii) they provide relatively high mosquito survival to allow for the development of *Plasmodium falciparum*.

Plant sugar sources were offered to mosquitoes in 30 cm × 30 cm × 30 cm mesh-covered cages. For *T. neriiifolia* and *B. lupulina*, between five and ten fresh bundles of flowering cuttings were added within each cage. The base of the bunch was wrapped in moistened paper towels and an aluminum sheet (S2A and S2B Fig). For the mango treatment, ripe fruits were cut in half, held on two 20 cm long wooden stakes and individually placed in the mosquito cages (S2C Fig). One bunch of about 40 ripe *L. microcarpa* fruits was placed in a petri dish within the mosquito cages (S2D Fig). Finally, 5% glucose was provided on cotton pads wrapped around two 20 cm long wooden stick (S2E Fig). Cuttings, fruits, and glucose were replaced every day. To confirm sugar ingestion, the gut content of a subset of mosquitoes was determined by the cold anthrone test for fructose [32] (S1 Appendix). Mosquitoes can sugar feed from a wide range of plant parts (floral nectaries, extra-floral nectaries at the base of the flowers or on stems or leaves, tissues juices, phloem sap, and honeydew) [11]. Here, the exact sources of the sugar taken up by mosquito females on plant cuttings (*T. neriiifolia* and *B. lupulina*) were not determined.

Parasite isolate and experimental infections

Plasmodium falciparum gametocyte carriers were recruited among 5–12-year-old school children in the villages of Soumousso and Dande, located respectively 30 km north east and 60 km North West of Bobo Dioulasso in southwestern Burkina Faso. Parasitological surveys were carried out in collaboration with the medical team in charge of malaria treatment at the local health center in these two villages. Thick blood smears were taken from each volunteer, air-

dried, Giemsa-stained, and examined by microscopy for the presence of *P. falciparum* at the IRSS lab in Bobo Dioulasso. Asexual trophozoite parasite stages were counted against 200 leucocytes, while infectious gametocytes stages were counted against 1000 leukocytes. Children with asexual parasitemia of > 1,000 parasites per microliter (estimated based on an average of 8000 leucocytes/ml) were treated in accordance with national guidelines. Asymptomatic *P. falciparum* gametocyte-positive children were recruited for the study. Mosquito infections were performed by direct feeding membrane assays using whole donor blood (i.e. no serum replacement) [33,34]. Briefly, gametocyte carrier blood was collected by venipuncture into heparinized tubes. Three to four day old female mosquitoes, distributed in 500 ml paper cups at a density of 80 mosquitoes per cup, were allowed to feed on this blood for one hour. Mosquitoes were starved of glucose solution for 24 h prior to the infection, with only water available, in wet cotton wool. Non-fed or partially fed females were removed and discarded, while the remaining fully-engorged mosquitoes were maintained in a biosafety room under the same standard conditions of $27 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ relative humidity and, 12:12 LD) on their assigned plant sugar source.

Experiment 1: To determine the effect of plant sugars on the early development of *P. falciparum* and on mosquito survival and fecundity

Upon emergence, batches of female mosquitoes from the colony were randomly assigned to one of four sugar sources: a 5% glucose solution, *T. neriifolia*, *B. lupulina* or *M. indica*, for three to four days. Thus, mosquitoes were given ample time to feed on their sugar source, and by 2–3 days, all mosquitoes would have acquired sugar meal at least once. Male and female mosquitoes were kept together to ensure insemination. Three to four day old females were then transferred to paper cups for infection (see above). After infection, fully-engorged females were placed in 30 cm × 30 cm × 30 cm mesh-covered cages with their assigned sugar source (S2 Fig). Females thus received the sugar treatment both before and after the infection. Seven days post blood-meal, mosquitoes were dissected to assess microscopically (×400) the presence of oocysts in the midgut stained with 2% mercurochrome. We also examined whether ovaries contained matured eggs (egg incidence). Mosquito survival was monitored from 1 to 7 days post-treatment (dpi). Twice a day, dead mosquitoes were removed and counted from each cage at 08:00 and 17:00. We performed four replicates using a total of seven gametocyte carriers. To avoid potential cage effect on survival, fecundity and susceptibility to infection, mosquitoes belonging to the same sugar treatment and fed on blood from the same gametocyte carrier were distributed in at least two different cages. On average, 30 (range 10–50) mosquitoes per sugar treatment and gametocyte carrier were dissected (except for the mango treatment, gametocyte carriers A and B for which only 1 and 4 mosquitoes were dissected, respectively, due to a low survival rate, see details in S1 Table).

Experiment 2: To determine the effect of plant sugars on sporozoite index and EIP

The same general procedure as that described in Experiment 1 was used in Experiment 2. Because *P. falciparum* takes an average of 14 days to disseminate sporozoite, and mosquito survival rate on *M. indica* was relatively low, we chose to replace this fruit with *L. microcarpa*. As in the previous experiment, mosquitoes were offered their assigned sugar sources both before and after the infection. Mosquitoes were sampled from day 9 to 13 dpi by dissecting the head and thorax of 20 mosquitoes from each treatment and time point to estimate the parasite's extrinsic incubation period. On day 14 the remaining mosquitoes in each cage were similarly dissected. The head and thorax were individually stored at -20°C . Sporozoite dissemination in head and thorax was assessed using PCR [35]. Mosquito survival was monitored from 1 to 14

dpi. Twice a day, dead mosquitoes were removed and counted from each cage at 08:00 and 17:00. We performed 2 replicates using a total of 4 gametocyte carriers between April and June 2013. On average, 26 (range 8–50) mosquitoes per sugar treatment and gametocyte carrier were dissected (see details in [S2 Table](#)).

Experiment 3: To determine how parasite infection and host plant species interact to influence mosquito longevity

The general procedure was identical to that of the two previous experiments except that a group of uninfected control mosquitoes was added, and that survival was monitored until all the mosquitoes had died. We assigned female mosquitoes to a 5% glucose solution, *M. indica*, *T. neriifolia* or *B. lupulina*. Uninfected control mosquitoes received heat-treated gametocytic blood. Briefly, half of the venous blood drawn from the gametocyte carrier was heated at 45°C for 20 minutes to kill the parasite gametocytes. Such heat treatment does not affect the survival and fecundity of mosquito females [36]. Because the nutritive quality of blood substantially vary among people and especially between infected and uninfected individuals, this procedure allows experiments to avoid the potential confounding effects of different blood origins on the performance of infected and control mosquitoes [33,37].

Statistical analysis

All statistical analyses were performed in R (version 2.15.3). Logistic regression by Generalized Linear Mixed Models (GLMM, binomial errors, logit link; lme4 package) was used to investigate the effect of sugar treatment on oocyst infection rate (Experiment 1) and sporozoite index (Experiment 2). GLMM with negative binomial errors (glmmADMB package) was used to test the effect of sugar treatment on oocyst intensity (Experiment 1). For these GLMMs, full models included sugar treatment and gametocytemia and their interaction as fixed effects. Binomial GLMM was also used to test the effect of sugar treatment, infection and gametocytemia on mosquito egg incidence (presence/absence of mature eggs in ovaries, Experiment 1). In all GLMMs, gametocyte carrier identity was included as a random effect. The effect of sugar treatment on mosquito survivorship was analyzed using Cox's proportional hazard regression models ("coxph" function in the "survival" package) with (experiments 1 and 2) or without (experiment 3) censoring. Sugar treatment, gametocytemia, infection (for experiment 3 only) and their interaction were considered as explanatory variables. Model simplification used step-wise removal of terms, followed by likelihood ratio tests (LRT). Term removals that significantly reduced explanatory power ($p < 0.05$) were retained in the minimal adequate model.

Mathematical modeling

To quantify the consequences of plant sugar source on malaria transmission, we designed a mathematical model, grounded within the SIR framework [38,39], that accounts for the essential transmission processes: vector competence (i.e. infection level) and infectious potential (the period during which the mosquito can transmit the pathogen). We assumed that the mosquito population studied could be categorized into Susceptible individuals (S_m , i.e. that could be infected), which then moved to the Exposed category upon infection (E_m , i.e. infected, but not yet infectious) and became Infectious (I_m , i.e. mosquitoes that can transmit the pathogen). Infectious potential was characterized by two phases: a first phase of low infection level (when the oocysts crack up and sporozoites begin to invade mosquito salivary glands i.e. day 9 to days 10–11) followed by a second phase of higher infection levels (from day 10–11 until mosquito death). The duration and vector competence for each phase and each plant are detailed in the [S2 Appendix](#). We also assumed similar categories for the human population ([S2 Appendix](#)).

We simulated the expected outbreak size in a human population (number of individuals that has been infected at the end of the season when one infectious human was introduced into a population of 100 individuals) for each plant sugar. We explored the parameter space through a Latin hypercube sampling with 10,000 replicates for which all parameters were randomly chosen within their confidence interval based on the data measurements obtained experimentally here. Data are deposited in the Dryad repository: (DOI: doi:[10.5061/dryad.9s690](https://doi.org/10.5061/dryad.9s690)) [40]

Ethics statement

Ethical approval was obtained from the Centre Muraz Institutional Ethics Committee (A003-2012/CE-CM) and National Ethics Committee of Burkina Faso (2014-0040). Before enrollment, legal guardians of each child participant provided written consent on behalf of the minors. The protocol conforms to the declaration of Helsinki on ethical principles for medical research involving human subjects (version 2002).

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by both the Office of Laboratory Animal Welfare of US Public Health Service (Assurance Number: A5928-01) and national committee of Burkina Faso (IRB registration #00004738 and FWA 00007038). Animals were cared for by trained personnel and veterinarians.

Results

Plant sugar source influences the early development of *P. falciparum* and the vector's survival and fecundity

A total of 324 out of 764 (42.4%) *An. coluzzii* became successfully infected upon parasite exposure. The infection rate significantly varied among mosquitoes maintained on different sugar treatments (LRT $X^2_3 = 13.2$, $P = 0.004$; Fig 1A). Infection dose (i.e. gametocytemia) significantly affected parasite prevalence, with higher gametocyte density in blood leading to an increased likelihood of infection (X^2_1 inline = 5.2, $P = 0.04$). Finally, there was a significant gametocytemia by sugar treatment interaction (X^2_3 inline = 10.2, $P = 0.017$).

The mean number of developing oocysts in infected females (i.e. intensity) significantly varied among sugar treatments (LRT $X^2_3 = 19.8$, $P = 0.0002$, Fig 1B). Gametocytemia had a positive effect on intensity (LRT $X^2_1 = 4.6$, $P = 0.03$), and there was a significant gametocytemia by sugar treatment interaction (LRT $X^2_3 = 12.5$, $P = 0.006$).

Sugar source was also linked to the probability of a mosquito surviving until 7 dpi (LRT $X^2_3 = 80$, $P < 0.001$; Fig 1C and S3 Table), with survivorship ranging from 92%, 90% and 89.5% on 5% glucose, *T. neriifolia* and *B. lupulina*, respectively, to 50% on *M. indica*. Egg incidence was reduced in mosquitoes fed on *M. indica* (LRT $X^2_3 = 27$, $P < 0.001$; Fig 1D and S3 Table). Infected females were more likely to carry eggs in their ovaries compared to females exposed to an infectious blood-meal but which remained uninfected (hereafter referred to as “exposed-uninfected”) (LRT $X^2_1 = 8$, $P = 0.005$; Fig 1D), irrespective of sugar treatment (i.e. no infection by sugar treatment interaction: LRT $X^2_3 = 3.5$, $P = 0.32$, Fig 1D). Among infected females, egg incidence was also positively associated with infection intensity ($X^2_1 = 5.8$, $P = 0.016$, S3 Fig). Finally, there was no effect of gametocytemia on mosquito survival (LRT $X^2_1 = 0.12$, $P = 0.72$) and egg incidence (LRT $X^2_1 = 1.3$, $P = 0.26$).

Plant sugar source influences the sporozoite index and the parasite's Extrinsic Incubation Period (EIP)

The aim of this experiment was to determine the extent to which natural plant sugar sources can affect the time of sporozoite release as well as the proportion of mosquitoes harboring

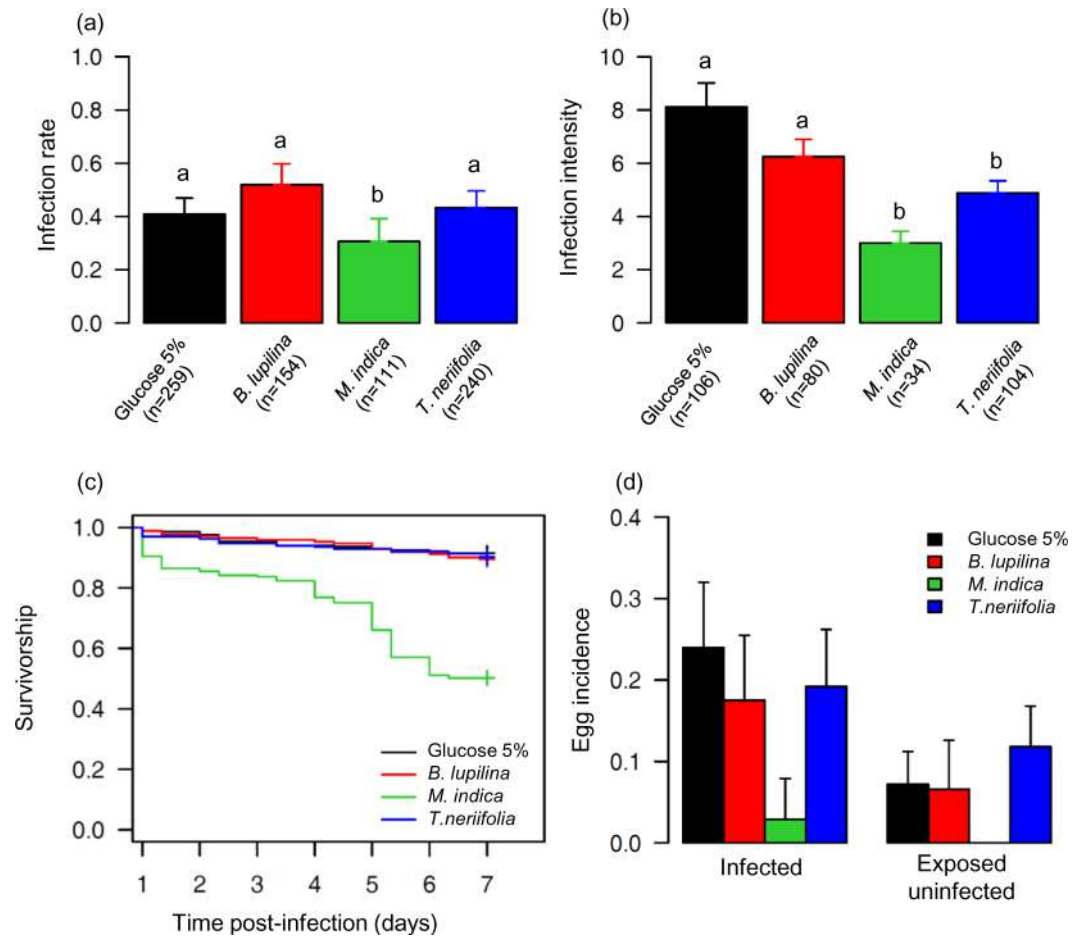


Fig 1. Effect of sugar treatment on the early development of *P. falciparum*, and on the survival and fecundity of malaria-exposed *Anopheles coluzzii*. (a) Infection rate (\pm 95% CI), expressed as the proportion of mosquitoes exposed to an infectious blood meal and harboring at least one oocyst in their midgut, over 4 replicates and using a total of 7 gametocyte carriers. Numbers in brackets indicate the total number of mosquitoes dissected 7 days post infection (dpi) for each sugar treatment. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pair-wise post-hoc tests. (b) Infection intensity (\pm se), expressed as the mean number of developing oocysts in the guts of infected females, over 4 replicates and using a total of 7 gametocyte carriers. Numbers in brackets indicate the total number of infected mosquitoes for each sugar treatment. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pair-wise post-hoc tests. (c) Survivorship of malaria-exposed mosquitoes for each sugar treatment over 4 replicates and using a total of 7 gametocyte carriers. Survival was recorded twice a day from 1 to 7 dpi. (d) Egg incidence (\pm 95% CI) of malaria-exposed mosquitoes, expressed as the proportion of mosquito females carrying fully matured eggs inside their ovaries on 7 dpi for each sugar treatment and infection status.

doi:10.1371/journal.ppat.1005773.g001

sporozoites. A high mortality rate was observed in mosquitoes fed on *M. indica* (Fig 1C and preliminary data indicating a very low number of mosquitoes surviving until 14 dpi, the average incubation period of *P. falciparum*), hence, we replaced *M. indica* with *Lannea microcarpa* (S1 Fig), a less common fruit-derived sugar but one which provides relatively high mosquito survival rate.

Overall, a total of 235 out of 420 (56%) *An. coluzzii* harbored sporozoites 14 dpi. Sugar treatment had a significant effect on sporozoite index (LRT $X^2_3 = 15$; $P = 0.002$; Fig 2A), with mosquitoes fed on *T. nerifolia* being less likely to harbor disseminated sporozoites (Fig 2A). Gametocytemia positively influenced sporozoite index (LRT $X^2_1 = 4$, $P = 0.046$). We also found an effect of sugar treatment on mosquito survival (LRT $X^2_3 = 26$; $P < 0.001$, Fig 2B and S3

Table) with mosquitoes living longer when maintained on *B. lupulina* followed by *L. microcarpa*, 5% glucose and *T. neriifolia*.

Sporozoites were observed as soon as 9 dpi (Fig 2C). Significant differences in sporozoite index between sugar treatments were observed from 10 to 14 dpi, indicating that the temporal dynamics of sporozoite dissemination varied (Fig 2C) depending on sugar treatment. As expected, there was a significant time effect with sporozoite index increasing over time (LRT $X^2_1 = 94$, $P < 0.0001$).

Plant sugar source similarly influences the longevity of infected and uninfected control mosquitoes

The previous experiment showed a reduced sporozoite index in *T. neriifolia*-fed mosquitoes (Fig 2A) compared to those fed on other sugar sources. Although, this can be an effect of the plant on parasite development and sporozoite dissemination, this observation is also consistent with an increased mortality of infected individuals compared to exposed-uninfected counterparts. In other words, there might be an interaction between infection and plant treatment, such that infected mosquitoes suffer increased mortality when reared on this species, and hence display reduced sporozoite index at 14 dpi. Therefore, we measured mosquito longevity using a factorial design, crossing infection status (infected with *P. falciparum* versus exposed-uninfected versus uninfected control) with sugar treatment. Uninfected control mosquitoes received a heat-treated gametocytic blood meal. Because *M. indica* showed an effect on both oocyst infection rate and intensity (Fig 1A and 1C), while *L. microcarpa* showed no effect on sporozoite dissemination (Fig 2A) compared to a 5% glucose solution, we used *M. indica* instead of *L. microcarpa* for this experiment.

Infection status had no effect on mosquito lifespan (LRT $X^2_2 = 1$; $P = 0.6$, Fig 3). Importantly, although mosquito longevity significantly varied among sugar treatment (LRT $X^2_3 = 160$; $P < 0.001$, Fig 3), there was no sugar treatment by infection status interactions (LRT $X^2_6 = 4.8$; $P = 0.56$, Fig 3), demonstrating that the source of the sugar meals affected mosquito longevity irrespective of their infection status. We further analyzed the effect of infection status on the longevity of *T. neriifolia*-fed mosquitoes only and found no significant difference (LRT $X^2_2 = 1.6$; $P = 0.4$). This suggests that the observed reduction in the sporozoite index of mosquitoes fed on *T. neriifolia* does not result from the influence of increased parasite virulence on mosquito lifespan.

Plant sugar source affects the transmission intensity of malaria

The epidemiological outcome predicted by the model for each plant species considered in isolation is consistent with intuitive expectations (Fig 4A). Compared to the baseline scenario with a 5% glucose solution, both *L. microcarpa* and *B. lupulina* caused an increased transmission potential, mainly because of increased infection rates among mosquitoes exposed to an infectious blood-meal (i.e. higher vector competence) (S4 Fig). In contrast, *T. neriifolia* induced a lower transmission potential, mainly because of a lower mosquito competence, as well as a longer infectious period (longevity).

When considering these individual effects within a community perspective, including the various proportions of each plant species, contrasting results appeared (Fig 4B). We assumed that mosquitoes do not display preference for plant species, hence that feeding choice is solely dependent on plant relative abundance. First, when considering plant communities generally occurring in urban areas, malaria transmission potential was largely impacted by plant relative abundance (Fig 4B). In this setting, increasing plant diversity leads to a decrease in *T. neriifolia* relative abundance and hence results in higher levels of transmission. In contrast, the different

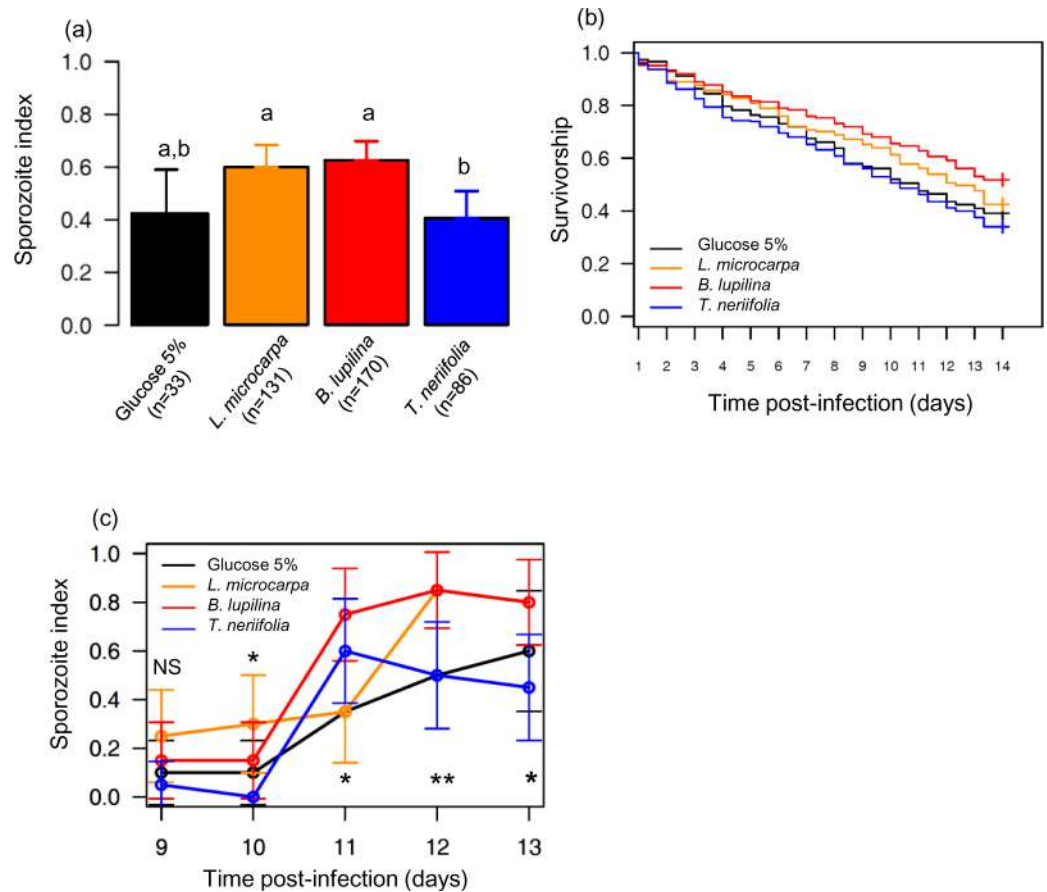


Fig 2. Effect of sugar treatment on the sporozoite index and EIP. (a) Sporozoite index (\pm 95% CI), expressed as the proportion of mosquitoes exposed to an infectious blood meal and having disseminated sporozoites in their head/thoraces, over 2 replicates and using a total of 4 gametocyte carriers. Numbers in brackets indicate, for each sugar treatment, the total number of mosquitoes analyzed with PCR on 14 days post infection (dpi). Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pairwise post-hoc tests. (b) Survivorship of malaria-exposed mosquitoes for each sugar treatment over 2 replicates, and using a total of 4 gametocyte carriers. Survival was recorded every day from 1 to 14 dpi. (c) Sporozoite index (\pm 95% CI) over time and using a total of 2 gametocyte carriers. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, NS: non-significant difference between sugar treatment

doi:10.1371/journal.ppat.1005773.g002

configurations of plant relative abundance showed similar patterns of transmission in rural areas where *T. nerifolia* is less abundant.

Discussion

Feeding on different sources of natural plant-derived sugars can influence key traits that affect the capacity of mosquitoes to transmit malaria, including mosquito longevity and mosquito susceptibility to *P. falciparum*. When combined into an epidemiological model these effects have important consequences for malaria transmission. Compared to control mosquitoes fed on a 5% glucose solution, individuals fed on *T. nerifolia* showed a 30% decrease in malaria transmission. In contrast, mosquitoes fed on *L. microcarpa* and *B. lupulina* showed a 30% and 40% increase in transmission potential, respectively. Previous research has revealed the role of sugar in providing energy for flight, increasing mosquito survival and fecundity and decreasing biting rate on vertebrate hosts [12,23]. Our findings add a more direct effect of epidemiological

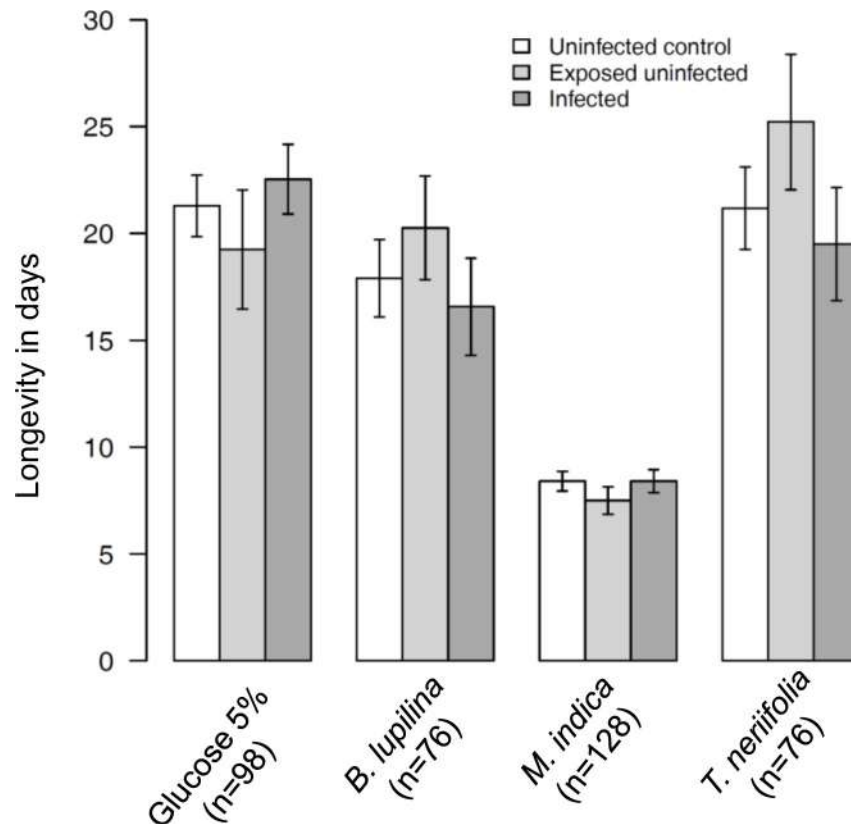


Fig 3. Effects of sugar treatment and infection status on mosquito longevity. Bars show the mean adult longevity \pm 1 SE of uninfected control, exposed-uninfected and infected mosquitoes held on one of four sources of sugar. Numbers in brackets indicate, for each sugar treatment, the total number of mosquitoes monitored.

doi:10.1371/journal.ppat.1005773.g003

importance by showing that plant-derived sugars can modulate mosquito-*Plasmodium* interactions.

The plant-mediated effect on infection could not be attributed to variation in blood meal size (S3 Appendix). Uptake of larger infectious blood meals may result in more gametocytes entering the mosquito midgut [41] and hence possibly increased infection. We tested whether plant sugar source could influence mosquito blood meal size. Mosquitoes fed with *L. microcarpa* prior to a blood meal took on average smaller blood meals than mosquitoes fed on glucose 5% or *B. lupulina* (S1 Appendix). However, infection in *L. microcarpa*-fed mosquitoes was not higher than that of glucose- or *B. lupulina*-fed individuals (Fig 2A). Furthermore, the results could not be attributed to mosquito inability to survive on particular plant sources such as *M. indica* owing to less feeding and eventual starvation (S4 Appendix).

At least three non-mutually exclusive mechanisms could explain the effects of plant sugar sources on mosquito competence for *P. falciparum*. First, there can be direct negative effects of plant secondary metabolites (e.g. alkaloids, terpenes, glycosides) on pathogen development. Secondary compounds generally play a role in plant defense against herbivores and thereby tend to be toxic and reduce host survivorship and reproduction [42,43]. These chemicals are found in all plant tissues, including floral nectars and fleshy fruits [44–47]. In bumblebees for example, the ingestion of alkaloids, terpenoids and iridoid glycosides contained in floral nectars can reduce infection by the protozoan parasite, *Crithidia bombi* [48,49]. Second, plants can

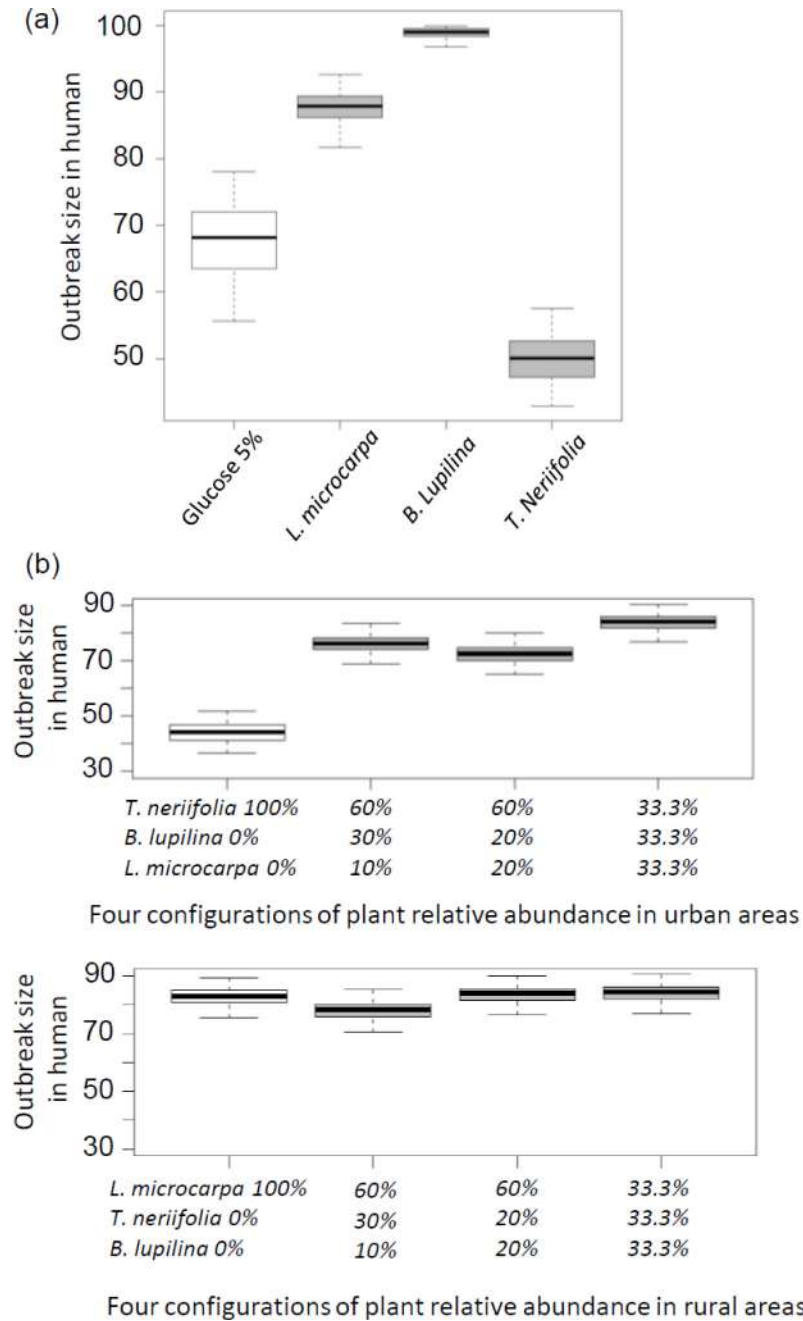


Fig 4. Theoretical difference in the distribution of outbreak sizes among plant sugars. (a) Epidemiological outcomes predicted by the model for each plant species considered in isolation, and (b) in a community perspective. In urban areas (upper panel), *Thevetia neriifolia* is relatively more abundant than *Barleria lupulina* and *Lannea microcarpa*. Four configurations with various relative abundances were considered: (i) a scenario of no diversity whereby *T. neriifolia*—the dominant plant—represents 100% of the feeding opportunities, (ii) a scenario of 60% *T. neriifolia*, 30% *B. lupulina* and 10% *L. microcarpa*, (iii) a scenario of 60–20–20%, and (iv) a scenario of equal feeding opportunities on each plant species. In rural areas (lower panel), *L. microcarpa* is relatively more abundant than *T. neriifolia* and *B. lupulina*. The same configurations as for urban areas were considered using this ranking. Outbreak size is the proportion of humans that has been infected at the end of the transmission season after one infectious human was introduced into the population. The box plots indicate the median (large horizontal bars), the 25th and 75th percentiles (squares), the minimum and maximum values (whiskers) and outliers (circles).

doi:10.1371/journal.ppat.1005773.g004

enhance or reduce infection by modulating the host body condition and energetic status [50]. Feeding on poor quality resources may yield less energy to parasite growth and hence limit parasite infection [51]. Third, plants may indirectly influence infection through effects on host immune response or gut microbiota. Because immunological defenses are energetically expensive, hosts in poor condition may display reduced resistance to parasites [52]. In our experiments, mosquitoes fed with *M. indica* fruits or *T. neriifolia* flowers displayed reduced infection levels and reduced fitness (survivorship or fecundity), thus corroborating the first two mechanisms. *T. neriifolia* contain toxic cardiac glycosides, and mango fruits contain phenolic compounds, including mangiferin, two secondary metabolite groups suspected to have strong anti-protozoan properties [9,53–55]. In addition, previous studies have demonstrated that malaria parasites require sugars from the vector for an optimal development [56,57]. The relationships between nutrition, host general condition, toxic chemicals and infection are complex [58,59], and further studies are required to determine whether *T. neriifolia* and mango fruits have direct anti-plasmodium activities or have low nutritional value that limit both parasite growth and host fitness. The plant sugar source treatment was continuously provided in our study, thus it will be important to determine whether these effects result from the ingestion of plant-derived sugars prior (prophylactic effects) or post (therapeutic effects) infection. Mosquitoes from a colony continually replenished with F1 from wild-caught females were used here and it will also be important to study plant-mediated effects using field mosquitoes since rearing insects in the laboratory for many generations is unlikely to represent the genetic diversity observed in nature.

Under natural conditions, the frequency of contacts between a mosquito and a source of natural sugar will depend on the innate plant preference of the insect and environmental factors such as plant availability and accessibility. Our design did not allow the mosquitoes to choose between the different plants. We expect different epidemiological consequences when mosquitoes consume different proportions of each plant. Using our model, we simulated different scenarios of plant relative abundance in either urban (where *T. neriifolia* is relatively dominant compared to *B. lupulina* and *L. microcarpa*) or rural (where *L. microcarpa* dominates) areas. Our findings indicate that sharp epidemiological differences are indeed expected in urban areas where relatively small decreases in *T. neriifolia* abundance could lead to important increases in malaria transmission. This can be interpreted as an example of a dilution effect whereby poor-competent host species decreases the average efficiency of pathogen transmission [60,61]. In contrast, in rural areas, a decrease in *L. microcarpa* abundance in favor of *T. neriifolia* would only have a small negative impact on disease transmission (i.e. a weak dilution effect [60]).

Infected mosquitoes were more likely to carry eggs in their ovary compared to exposed-uninfected counterparts. This finding may illustrate a cost of resistance whereby the expression of an efficient immune response against *Plasmodium* establishment comes at a cost to egg production. Alternatively, this finding may illustrate the terminal investment hypothesis (also known as fecundity compensation), which postulates that when the future reproductive opportunities of an individual decline because of high mortality risk such as high infection levels, organisms increase their current reproductive investment [48]. We examined the first gonotrophic cycle only and further studies are needed to determine the mechanisms responsible for the increased probability of egg development in infected individuals.

Although we did not find any significant reductions in mosquito longevity or fecundity following *Plasmodium* infection, previous studies have demonstrated that this parasite can be costly to the mosquito host, especially in specific conditions reflecting what occurs in nature, such as nutritional, predation, insecticide or hydric stress [37,39,62–65]. Since *Plasmodium* infection decreases mosquito fitness, natural selection should favor the evolution of defenses

against it. Besides immunological defenses, insect hosts can develop behavioral defenses including self-medication to better resist or tolerate their parasites [66,67]. Alternatively, malaria parasites might manipulate mosquito plant preference in ways that favor their own development and transmission [3,68]. A recent study found that *P. falciparum* infection increases both *An. gambiae* attraction to nectar sources and their total sugar uptake [69]. It will be of fundamental importance to better investigate the fitness costs and benefits of feeding on different natural sugar sources and to study plant preference by infected and uninfected mosquitoes. This will allow us to determine whether mosquito vectors or *P. falciparum* can exploit plant sugar sources to respectively self-medicate or manipulate the insect plant choice.

The interaction between malaria parasites and mosquito vector has drawn much attention for possible interventions to prevent transmission of this pathogen. Our findings have several implications for disease control. A number of different genetic manipulation strategies are now available to reduce mosquito competence for *Plasmodium* in the laboratory (refractory transgenic mosquitoes) [70–72]. In addition, the use of transmission-blocking vaccines against *P. falciparum* mosquito-stages has proven to be a promising strategy [73]. However, before translating these findings into the natural settings, it will be crucial to determine how the transgenes expression or vaccine efficacy can be affected by mosquito plant-feeding behavior. Finally, some novel perspective for malaria control including the cultivation of anti-*Plasmodium* plants may be truly sustainable. Concretely, fostering the planting of species such as *T. neriifolia*, which is commonly used by mosquitoes and which negatively affects vectorial capacity may locally reduce malaria transmission.

Supporting Information

S1 Fig. Natural plant species used in the experiments. (a) *Thevetia neriifolia* (syn: *Thevetia peruviana*. *Casacabela thevetia*; common name: yellow oleander. Fam: *Apocynaceae*) is an ever-green tropical shrub or small tree (up to 6 m) native of central South America. Yellow oleanders are common and widespread in villages and cities of West Africa where it is mostly used as a courtyard hedge. (b) *Barleria lupulina* (syn: *Barleria macrostachys*; common name: Hop-headed barleria; Fam: *Acanthaceae*) is a common ornamental shrub (about 1.5 m) in cities and villages of West Africa. (c) *Mangifera indica* (common name: mango; Fam: *Anacardiaceae*) is a large fruit-tree (up to 30 m) native of India, and widely distributed in West Africa for fruit consumption. In Burkina Faso, mango trees are commonly found in villages and cities within courtyards where they provide shade and fruit. (d) *Lannea microcarpa* (syn: *L. microcarpa acida*. *L. microcarpa djalonica*; common name: African grape. Fam: *Anacardiaceae*) is a tree (up to 15 m) indigenous of West Africa. Unlike mango, *L. microcarpa* species are not cultivated; they propagate naturally in the savanna vegetation and can occur in West African villages and cities.

(DOCX)

S2 Fig. Sugar treatment layout. (a) Bundle of flowers of *Thevetia neriifolia*. (b) Bundle of flowers of *Barleria lupulina*. (c) Fruit of *Mangifera indica*. (d) Fruits of *Lannea microcarpa microcarpa*. (e) 5% glucose solution on cotton pads.

(DOCX)

S3 Fig. Relationship between egg incidence and the number of oocysts in mosquito midgut.

(DOCX)

S4 Fig. Epidemiological outcome predicted by the model for each plant species considered in isolation when mosquito longevity (γ_i) is similar across all sugar treatment.

(DOCX)

S1 Appendix. Field observational surveys, mosquito behavioural choice in the lab and Anthrone tests.

(DOCX)

S2 Appendix. Mathematical model details.

(DOCX)

S3 Appendix. Effects of plant sugar source on mosquito blood-meal size (protocol and results).

(DOCX)

S4 Appendix. Starvation experiments.

(DOCX)

S1 Table. Details of sample size, Infection rate and intensity in experiment 1.

(DOCX)

S2 Table. Details of sample size, Infection rate and intensity in experiment 2.

(DOCX)

S3 Table. Risk of mosquito mortality (hazard ratio) along with the 95%CI, z, P-value and sample size for each treatment group relative to the 5% glucose solution.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Raymond Hien, Jean Bazié, Fulgence Da and Baudoin Dabiré for technical help; all children and their parents for participating in this study and the local authorities for their support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DFdSH RI KRD TL. Performed the experiments: DFdSH TL BKY SRY. Analyzed the data: DFdSH TL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AD RSY AC LCG RJH GAO JBO FS BR. Wrote the paper: TL DFdSH RI RJH LCG AC BR. Performed the mathematical modeling: BR.

References

1. Li J, Wang X, Zhang G, Githure JI, Yan G, James AA. Genome-block expression-assisted association studies discover malaria resistance genes in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 20675–80. doi: [10.1073/pnas.1321024110](https://doi.org/10.1073/pnas.1321024110) PMID: [24297936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24297936/)
2. Molina-Cruz A, DeJong RJ, Ortega C, Haile A, Abban E, Rodrigues J, et al. Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: E1957–62. doi: [10.1073/pnas.1121183109](https://doi.org/10.1073/pnas.1121183109) PMID: [22623529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22623529/)
3. Lefèvre T, Vantaux A, Dabiré KR, Mouline K, Cohuet A. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003365. doi: [10.1371/journal.ppat.1003365](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003365) PMID: [23818841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23818841/)
4. Lambrechts L, Halbert J, Durand P, Gouagna LC, Koella JC. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2005; 4: 3. PMID: [15644136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15644136/)
5. Redmond SN, Eiglmeier K, Mitri C, Markianos K, Guelbeogo WM, Gneme A, et al. Association mapping by pooled sequencing identifies TOLL 11 as a protective factor against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. 2015; 16: 779. doi: [10.1186/s12864-015-2009-z](https://doi.org/10.1186/s12864-015-2009-z) PMID: [26462916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462916/)

6. Gendrin M, Rodgers FH, Yerbanga RS, Ouédraogo JB, Basáñez M- G, Cohuet A, et al. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat Commun.* 2015; 6: 5921. doi: [10.1038/ncomms6921](https://doi.org/10.1038/ncomms6921) PMID: [25562286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562286/)
7. Wolinska J, King KC. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 2009; 25: 236–244. doi: [10.1016/j.pt.2009.02.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.004) PMID: [19356982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19356982/)
8. Cory JS, Hoover K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. *Trends Ecol Evol.* 2006; 21: 278–286. PMID: [16697914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16697914/)
9. Lefèvre T, Oliver L, Hunter MD, De Roode JC, Letters E. Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecol Lett.* 2010; 13: 1485–1493. doi: [10.1111/j.1461-0248.2010.01537.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01537.x) PMID: [21040353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21040353/)
10. Lee KP, Simpson SJ, Wilson K. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct Ecol.* 2008; 22: 1052–1061.
11. Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol.* 1995; 40: 443–474. PMID: [7810991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810991/)
12. Stone CM, Foster WA. Plant-sugar feeding and vectorial capacity. In: Takken W, Koenraadt CJM, editors. *Ecology of parasite-vector interactions*, Volume 3. Wageningen Academic Publishers; 2013. pp. 35–79.
13. Müller GC, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, et al. Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits / seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. *Malar J.* 2010; 9: 262. doi: [10.1186/1475-2875-9-262](https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-262) PMID: [20854666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20854666/)
14. Nyasembe VO, Teal PEA, Mukabana WR, Tumlinson JH, Torto B. Behavioural response of the malaria vector *Anopheles gambiae* to host plant volatiles and synthetic blends. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 234. doi: [10.1186/1756-3305-5-234](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-234) PMID: [23069316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23069316/)
15. Nikbakhtzadeh MR, li JWT, Otienoburu PE, Foster WA. Olfactory basis of floral preference of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera : *Culicidae*) among common African plants. *J Vector Ecol.* 2014; 39: 372–383. doi: [10.1111/jvec.12113](https://doi.org/10.1111/jvec.12113) PMID: [25424267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25424267/)
16. Manda H, Gouagna LC, Nyandat E, Kabiru EW, Jackson RR, Foster W a, et al. Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. on endemic plants in western Kenya. *Med Vet Entomol.* 2007; 21: 103–11. PMID: [17373953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17373953/)
17. Gary RE, Foster WA. Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera : *Culicidae*). *J Med Entomol.* 2001; 38: 22–28. PMID: [11268686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11268686/)
18. Impoinvil DE, Kongere JO, Foster WA, Njiru BN, Killeen GF, Githure JI, et al. Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. *Med Vet Entomol.* 2004; 18: 108–115. PMID: [15189235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15189235/)
19. Gary RE, Foster WA. *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants. *Med Vet Entomol.* 2004; 18: 102–107. PMID: [15189234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15189234/)
20. Manda H, Gouagna LC, Foster WA, Jackson RR, Beier JC, Githure JI, et al. Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2007; 6: 11.
21. Stone CM, Jackson BT, Foster WA. Effects of plant-community composition on the vectorial capacity and fitness of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 727–736. doi: [10.4269/ajtmh.2012.12-0123](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0123) PMID: [22927493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22927493/)
22. Gu WD, Muller G, Schlein Y, Novak RJ, Beier JC. Natural plant sugar sources of *Anopheles* mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. *PLoS One.* 2011; 6: e15996. doi: [10.1371/journal.pone.0015996](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015996) PMID: [21283732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21283732/)
23. Zhu L, Qualls W a, Marshall JM, Arheart KL, DeAngelis DL, McManus JW, et al. A spatial individual-based model predicting a great impact of copious sugar sources and resting sites on survival of *Anopheles gambiae* and malaria parasite transmission. *Malar J.* 2015; 14: 59. doi: [10.1186/s12936-015-0555-0](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0555-0) PMID: [25652678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25652678/)
24. Nyasembe VO, Cheseto X, Kaplan F, Foster WA, Teal PEA, Tumlinson JH, et al. The invasive American weed *Parthenium hysterophorus* can negatively impact malaria control in Africa. *PLoS One.* 2015; 10.
25. Suwanchaichinda C, Paskewitz SM. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) to melanize sephadex beads. *J Med Entomol.* 1998; 35: 157–161. PMID: [9538577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9538577/)
26. Lambrechts L, Chavatte JJ- M, Snounou G, Koella JC. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2006; 273: 1501–1506.
27. Ferguson HM, Read AF. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2002; 269: 1217–1224.

28. Okech BA, Gouagna LC, Kabiru EW, Beier JC, Yan G, Githure JI. Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *Plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers. *J Insect Sci.* 2004; 4: 33. PMID: [15861248](#)
29. Koella JC, Sorensen FL. Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol.* 2002; 16: 316–320. PMID: [12243233](#)
30. Kelly R, Edman JD. Infection and transmission of *Plasmodium gallinaceum* (Eucoccidia: Plasmodiidae) in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): effect of preinfection sugar meals and postinfection blood meals. *J Vector Ecol.* 1997; 22: 36–42. PMID: [9221737](#)
31. Gouagna L, Poueme RS, Dabiré KR, Ouédraogo J, Fontenille D, Simard F. Patterns of sugar feeding and host plant preferences in adult males of *An. gambiae* (Diptera : Culicidae). *J Vector Ecol.* 2010; 35: 267–276. doi: [10.1111/j.1948-7134.2010.00082.x](#) PMID: [21175931](#)
32. Van Handel E. The detection of nectar in mosquitoes. *Mosq News.* 1972; 32: 458.
33. Vantaux A, Dabiré KR, Cohuet A, Lefèvre T. A heavy legacy: offspring of malaria-infected mosquitoes show reduced disease resistance. *Malar J.* 2014; 13: 442. doi: [10.1186/1475-2875-13-442](#) PMID: [25412797](#)
34. Vantaux A, de Sales Hien DF, Yameogo B, Dabiré KR, 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. *Front Ecol Evol.* 2015; 3: 1–12.
35. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66: 503–508. PMID: [12201583](#)
36. Sangare I, Michalakakis Y, Yameogo B, Dabire R, Morlais I, Cohuet A. Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J.* 2013; 12: 2. doi: [10.1186/1475-2875-12-2](#) PMID: [23282172](#)
37. Alout H, Yameogo B, Djogbénou LS, Chandre F, Dabiré RK, Corbel V, et al. Interplay between *Plasmodium* infection and resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J Infect Dis.* 2014; 210: 1464–1470. doi: [10.1093/infdis/jiu276](#) PMID: [24829465](#)
38. Keeling MJ, Rohani P. Modeling infectious diseases in humans and animals. Princeton University Press; 2008.
39. Roux O, Vantaux A, Roche B, Yameogo B, Dabiré KR, Diabaté A, et al. Evidence for carry-over effects of predator exposure on pathogen transmission potential. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2015; 282: 20152430.
40. Hien DF, Dabiré K, Roche B, Diabaté A, Yerbanga R, Cohuet A, et al. Data from: Plant-mediated effects on mosquito capacity to transmit human malaria. Dryad Digital Repository. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.9s690>. 2015;
41. Pichon G, Awono-Ambene HP, Robert V. High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology.* 2000; 121: 115–120. PMID: [11085230](#)
42. Stam JM, Kroes A, Li Y, Gols R, van Loon JJ a, Poelman EH, et al. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annu Rev Plant Biol.* 2014; 65: 689–713. doi: [10.1146/annurev-arplant-050213-035937](#) PMID: [24313843](#)
43. Ode PJ. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. 2006; 51: 163–185. PMID: [16332208](#)
44. Adler LS. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos.* 2001; 3: 409–420.
45. Cipollini ML, Levey DJ. Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *Am Nat.* 1997; 150: 346–372. doi: [10.1086/286069](#) PMID: [18811294](#)
46. Baker HG. Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie.* 1977; 8: 349–356.
47. Whitehead SR, Bowers MD. Evidence for the adaptive significance of secondary compounds in vertebrate-dispersed fruits. *Am Nat.* 2013; 182: 563–577. doi: [10.1086/673258](#) PMID: [24107365](#)
48. Manson JS, Otterstatter MC, Thomson JD. Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia.* 2010; 162: 81–89. doi: [10.1007/s00442-009-1431-9](#) PMID: [19711104](#)
49. Richardson LL, Adler LS, Leonard AS, Andicoechea J, Regan KH, Anthony WE, et al. Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2015; 282: 20142471.
50. Cressler CE, Nelson WA, Day T, Mccauley E. Disentangling the interaction among host resources, the immune system and pathogens. *Ecol Lett.* 2014; 17: 284–293. doi: [10.1111/ele.12229](#) PMID: [24350974](#)

51. Hall SR, Knight CJ, Becker CR, Duffy MA, Tessier AJ, Caceres CE. Quality matters: resource quality for hosts and the timing of epidemics. *Ecol Lett.* 2009; 12: 118–128. doi: [10.1111/j.1461-0248.2008.01264.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01264.x) PMID: [19049510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19049510/)
52. Sheldon BC, Verhulst S. Ecological immunity: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol.* 1996; 11: 317–321. PMID: [21237861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21237861/)
53. Gowler CD, Leon KE, Hunter MD, De Roode JC. Secondary defense chemicals in milkweed reduce parasite infection in monarch butterflies, *Danaus plexippus*. *J Chem Ecol.* 2015; 41: 520–523. doi: [10.1007/s10886-015-0586-6](https://doi.org/10.1007/s10886-015-0586-6) PMID: [25953502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25953502/)
54. Shah K, Patel M, Patel R, Parmar P. *Mangifera Indica* (Mango). *Pharmacogn Rev.* 2010; 4: 42. doi: [10.4103/0973-7847.65325](https://doi.org/10.4103/0973-7847.65325) PMID: [22228940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22228940/)
55. Ibrahim N, Mathew L. Comparative analysis of cardiac glycosides and quantification of peruvoside from *Thevetia nerifolia*, Juss fruit rind extracts through HPLTC fingerprinting. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 6: 412–415.
56. Liu K, Dong Y, Huang Y, Rasgon JL, Agre P. Impact of trehalose transporter knockdown on *Anopheles gambiae* stress adaptation and susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 17504–9. doi: [10.1073/pnas.1316709110](https://doi.org/10.1073/pnas.1316709110) PMID: [24101462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24101462/)
57. Mack SR, Samuels S, Vanderberg JP. Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 3. Carbohydrates. *J Parasitol.* 1979; 65: 217–221. PMID: [376818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/376818/)
58. Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ. Nutritional immunology: a multi-dimensional approach. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002223. doi: [10.1371/journal.ppat.1002223](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002223) PMID: [22144886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22144886/)
59. Mason PA, Singer MS. Defensive mixology: combining acquired chemicals towards defence. *Funct Ecol.* 2015; 29: 441–450.
60. Ostfeld RS, Keesing F. Effects of host diversity on infectious disease. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2011; 43: 157–182.
61. Roche B, Rohani P, Dobson AP, Guégan J- F. The impact of community organization on vector-borne pathogens. *Am Nat.* 2013; 181: 1–11. doi: [10.1086/668591](https://doi.org/10.1086/668591) PMID: [23234841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23234841/)
62. Sangare I, Dabire R, Yameogo B, Da DF, Michalakos Y, Cohuet A. Stress dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. *Infect Genet Evol.* 2014; 25: 57–65. doi: [10.1016/j.meegid.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.006) PMID: [24747607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747607/)
63. Lalubin F, Delédevant A, Glaizot O, Christie P. Natural malaria infection reduces starvation resistance of nutritionally stressed mosquitoes. *J Anim Ecol.* 2014; 83: 850–857. doi: [10.1111/1365-2656.12190](https://doi.org/10.1111/1365-2656.12190) PMID: [24286465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286465/)
64. Aboagye-Antwi F, Guindo A, Traore AS, Hurd H, Coulibaly M, Traore S, et al. Hydric stress-dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild-caught *Anopheles gambiae* female mosquitoes. *Malar J.* 2010; 9: 12.
65. Ahmed AM, Hurd H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes Infect.* 2006; 8: 308–315. PMID: [16213176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16213176/)
66. De Roode JC, Lefèvre T. Behavioral Immunity in Insects. *Insects.* 2012; 3: 789–820. doi: [10.3390/insects3030789](https://doi.org/10.3390/insects3030789) PMID: [26466629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466629/)
67. de Roode JC, Lefèvre T, Hunter MD. Ecology. Self-medication in animals. *Science (80-).* 2013; 340: 150–1.
68. Lefèvre T, Thomas F. Behind the scene, something else is pulling the strings: Emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 504–519. PMID: [17588825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17588825/)
69. Nyasembe VO, Teal PEA, Sawa P, Tumlinson JH, Borgemeister C, Torto B. *Plasmodium falciparum* infection increases *Anopheles gambiae* attraction to nectar sources and sugar uptake. *Curr Biol.* 2014; 24: 217–221. doi: [10.1016/j.cub.2013.12.022](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.022) PMID: [24412210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412210/)
70. Isaacs AT, Li F, Jasinskiene N, Chen X, Nirmala X, Vinetz JM, et al. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS Pathog.* 2011; 7: 13.
71. Dong Y, Das S, Cirimotich CM, Souza-Neto JA, McLean KJ, Dimopoulos G. Engineered Anopheles immunity to Plasmodium infection. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002458. doi: [10.1371/journal.ppat.1002458](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002458) PMID: [22216006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22216006/)
72. Wang S, Jacobs-Lorena M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol.* 2013; 31: 185–193. doi: [10.1016/j.tibtech.2013.01.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.001) PMID: [23395485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23395485/)
73. Wu Y, Sinden RE, Churcher TS, Tsuboi T, Yusibov V. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. *Adv Parasitol.* 2015; 89: 109–52. doi: [10.1016/bs.apar.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.04.001) PMID: [26003037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26003037/)

Host-seeking behaviors of mosquitoes experimentally infected with sympatric field isolates of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: no evidence for host manipulation

Amélie Vantaux^{1,2*}, Dombabale F. de Sales Hien^{1,2}, Bienvenue Yameogo^{1,2}, Kounbo R. Dabiré¹, Frédéric Thomas², Anna Cohuet² and Thierry Lefèvre^{1,2}

¹ Institut de Recherches en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso, ² UMR Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Centre National de la Recherche Scientifique 5290, Institut de Recherche pour le Développement 224, Université Montpellier, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sara Goodacre,
University of Nottingham, UK

Reviewed by:

Alex Wong,
Carleton University, Canada
Jacob Evan Crawford,
University of California, Berkeley, USA

*Correspondence:

Amélie Vantaux,
Malaria Molecular Epidemiology Unit,
Institut Pasteur in Cambodia, 5
Boulevard Monivong, PO Box 983,
Phnom Penh, Cambodia
amelie.vantaux@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Population Genetics,
a section of the journal
Frontiers in Ecology and Evolution

Received: 19 April 2015

Accepted: 07 July 2015

Published: 03 August 2015

Citation:

Vantaux A, de Sales Hien DF,
Yameogo B, Dabiré KR, Thomas F,
Cohuet A and Lefèvre T (2015)
Host-seeking behaviors of mosquitoes
experimentally infected with sympatric
field isolates of the human malaria
parasite *Plasmodium falciparum*: no
evidence for host manipulation.
Front. Ecol. Evol. 3:86.
doi: 10.3389/fevo.2015.00086

Previous studies have shown that *Plasmodium* parasites can manipulate mosquito feeding behaviors such as motivation and avidity to feed on vertebrate hosts, in ways that increase the probability of parasite transmission. These studies, however, have been mainly carried out on non-natural and/or laboratory based model systems and hence may not reflect what occurs in the field. We now need to move closer to the natural setting, if we are to fully capture the ecological and evolutionary consequences of these parasite-induced behavioral changes. As part of this effort, we conducted a series of experiments to investigate the long and short-range behavioral responses to human stimuli in the mosquito *Anopheles coluzzii* during different stages of infection with sympatric field isolates of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. First, we used a dual-port olfactometer designed to take advantage of the whole body odor to gauge mosquito long-range host-seeking behaviors. Second, we used a locomotor activity monitor system to assess mosquito short-range behaviors. Compared to control uninfected mosquitoes, *P. falciparum* infection had no significant effect neither on long-range nor on short-range behaviors both at the immature and mature stages. This study, using a natural mosquito-malaria parasite association, indicates that manipulation of vector behavior may not be a general phenomenon. We speculate that the observed contrasting phenotypes with model systems might result from coevolution of the human parasite and its natural vector. Future experiments, using other sympatric malaria mosquito populations or species are required to test this hypothesis. In conclusion, our results highlight the importance of following up discoveries in laboratory model systems with studies on natural parasite-mosquito interactions to accurately predict the epidemiological, ecological and evolutionary consequences of parasite manipulation of vector behaviors.

Keywords: *Anopheles*, *Plasmodium*, parasite manipulation, behavior, host-seeking, experimental infection

Introduction

Since parasitic organisms exploit patchy host resources, transmission from one host to another represents one of the most risky and challenging step of their lifecycles. In response, parasites have evolved a series of strategies that increase their probability of transmission (Poulin, 2007). Of the many potential transmission strategies, parasite manipulation of host behavior is without doubt the most appealing. For example, ants infected with *Ophiocordyceps* fungi leave the colony, climb into the canopy (an ideal microenvironment for parasite sporulation and dispersal to new hosts), and express a “death grip” behavior by clamping down with jaws on a leaf vein shortly before dying (Hughes et al., 2011). Crickets infected with gordian worms dive into water, allowing the aquatic parasite to exit their body and mate (Thomas et al., 2002). These are just some of the many examples of the dramatic impact parasites can have on their host’s behavior (Moore, 2002). Parasite manipulation has now been documented in a large range of host-parasite associations, and studies indicate that it is a widespread phenomenon in nature with important ecological and evolutionary implications (Thomas et al., 2005; Lefèvre et al., 2009a,b; Poulin, 2010; Hughes et al., 2012).

Besides ecological and evolutionary relevance, host manipulation by parasite may also have profound significance for human health. Many manipulative parasites are responsible for devastating vector-borne diseases such as dengue fever, malaria, leishmaniasis, or sleeping sickness. These parasites can indeed induce changes in the behaviors of their insect vectors that affect the frequency of interactions between hosts and vectors (Molyneux and Jefferies, 1986; Moore, 1993; Hurd, 2003; Lefèvre et al., 2006; Lefèvre and Thomas, 2008). In particular, several vector-borne parasites seem able to induce increased biting rates in their arthropod vectors by interfering with the ingestion process: *Leishmania* spp. and *Yersinia pestis* block the foregut of sand flies and fleas, respectively (Rogers, 2012; Rebeil et al., 2013); *Trypanosoma* spp. obstructs phagoreceptors (Jenni et al., 1980) and modifies the salivary composition of tsetse flies (Van Den Abbeele et al., 2010); and *Plasmodium* spp. and *Trypanosoma* spp. reduce activity of the apyrase salivary protein (platelet aggregation inhibitor) in mosquitoes and kissing bugs, respectively (Añez and East, 1984; Rossignol et al., 1984). These mechanisms seem to impair the vector’s ability to engorge and therefore induce them to feed several times on vertebrate hosts.

Biting rate is a key predictor of transmission intensity of vector-borne diseases (MacDonald, 1957). Specifically, the transmission potential of vector-borne parasites is strongly determined by the number of bitten vertebrate hosts: the greater the number of host bitten by infectious vectors, the more intense transmission will be. Accordingly, some studies found that increased biting rate by infectious vectors not only increase the number of bites on the same individual vertebrate host, but also the number of bites on different hosts, thereby increasing parasite transmission (Jenni et al., 1980; Rogers and Bates, 2007; Van Den Abbeele et al., 2010).

In addition, the onset of behavioral changes seems to be synchronized with the parasite development. When the parasite is not fully mature (i.e., non-transmissible stage), it changes the behavior of the vector in a way that reduces the contact rate with vertebrate hosts. Since biting is risky (e.g., host defensive behaviors can kill the vector and its parasite), reduced biting rate seems beneficial to the parasite (Schwartz and Koella, 2001). In contrast, when the parasite is mature and ready to be transmitted, it modifies the behavior of its vector in a way that increases the contact with the vertebrate host and hence the transmission. This “stage-dependant” manipulation seems to be the rule in the above cited examples (Rogers and Bates, 2007; Lefèvre and Thomas, 2008; Van Den Abbeele et al., 2010).

Over the last three decades, particular attention has been devoted to behavioral changes in malaria-infected mosquitoes (Hurd, 2003; Lefèvre and Thomas, 2008; Cator et al., 2012). Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* which are transmitted through the bites of infected *Anopheles* mosquitoes. Inside its vector, the parasite undergoes complex developmental transformations. Shortly after the ingestion of an infectious blood meal, *Plasmodium* male and female gametocytes fuse to form zygotes within the mosquito midgut. Zygotes then develop into motile ookinetes that penetrate the gut wall to form oocysts (non-transmissible parasite stage). There, oocysts undergo several mitotic divisions resulting in hundreds of sporozoites (transmissible parasite stage) that are released into the haemoceol about 2 weeks post-infection. At this stage, the parasites migrate to the salivary glands from which they can be injected into another human host during subsequent blood meals.

Mosquito behavioral traits altered by malaria sporozoites are multiple and include increased response to host odors (Rossignol et al., 1986; Cator et al., 2013), increased landing and biting activity (Rossignol et al., 1984, 1986; Wekesa et al., 1992; Anderson et al., 1999; Koella et al., 2002; Smallegange et al., 2013), increased number of feeds (Koella et al., 1998) and increased blood volume intake (Koella and Packer, 1996; Koella et al., 1998, 2002). The exact proximate mechanisms by which malaria parasites modify these traits remain elusive but modifications of salivary and brain proteins (Rossignol et al., 1984; Shandilya et al., 1999; Lefèvre et al., 2007) as well as changes in the responsiveness of odorant receptors (Cator et al., 2013) have been suggested.

Altogether these studies strongly support the existence of parasite manipulation of mosquito behavior. However, they have been carried out on either artificial model systems or field mosquitoes, and this can be problematic. First, using host-parasite combinations that do not occur in nature excludes the coevolutionary processes that shape parasite manipulation. Accordingly, findings on unnatural mosquito-*Plasmodium* associations do not always reflect natural interactions (Aguilar et al., 2005; Boëte, 2005; Cohuet et al., 2006; Dong et al., 2006; Tripet et al., 2008; Lefèvre et al., 2013; Severo and Levashina, 2014). Furthermore, the stimuli used to elicit mosquito behavioral responses in the laboratory studies cited above derived from either inappropriate - and sometimes anesthetized—hosts (e.g., human odors for mosquitoes infected with rodent *Plasmodium*) or from extracts adsorbed on worn

pieces of cloth. Finally, sampling wild specimens can lead to some misinterpretations due to possible confounding effects. This is of particular relevance in the field of parasitology since infection can be more a consequence than a cause of host behavioral traits. For example, while the increased biting rate observed in sporozoite-infected mosquitoes can result from infection, it can also be a mere intrinsic mosquito characteristic. In other words, infected mosquitoes may exhibit increased biting rates not because of being infected but just because of an innate aggressiveness, and thus making these individuals more likely to become infected compared to less aggressive mosquitoes. Another possible confounding effect is mosquito age which is associated to infection (i.e., increased likelihood of sporozoite infection as mosquitoes become older, Koella and Packer, 1996; Koella et al., 1998; but see Wekesa et al., 1992).

As a result, there is a critical lack of data on the effects of malaria infection on its vector behavior using both controlled conditions and a natural host-parasite association. The current study aims to fill this gap using the parasite *P. falciparum*, responsible for causing the most severe form of human malaria, and the mosquito *Anopheles coluzzii* (formerly the M molecular form of *An. gambiae s.s.*), a major vector of *P. falciparum* in Africa. We experimentally challenged *An. coluzzi* with sympatric field isolates of *P. falciparum* using direct membrane feeding assays and, through a series of experiments, examined the effects of immature and mature infections on mosquito host-seeking behaviors. First, we used a dual-port olfactometer designed to take advantage of the whole human body odor (breath and skin emanations) to gauge mosquito long-range behaviors. Second, we used a locomotor activity monitor system to gauge mosquito short-range behaviors.

Materials and Methods

Mosquitoes

Three- to five-day-old laboratory-reared female of *An. coluzzii* were obtained from an outbred colony established in 2008 and repeatedly replenished with F1 from wild-caught mosquito females collected in Kou Valley (11°23'14"N, 4°24'42"W), 30 km from Bobo Dioulasso, south-western Burkina Faso (West Africa) and identified by PCR-RFLP (Fanello et al., 2002). Mosquitoes were maintained under standard insectary conditions (27 ± 2°C, 70 ± 5% relative humidity, 12:12 LD). Adult mosquitoes were provided with a solution of 5% glucose and water, and the larvae were bred in the laboratory with *ad libitum* Tetramin® food. Female mosquitoes were starved for sugar 24 h prior access to a blood meal to ensure willingness to feed.

Mosquito Infection

Experimental infections were performed as described in Alout et al. (2013) and Vantaux et al. (2014). Briefly, 3–5 days old females were fed through membranes on gametocyte (*P. falciparum* transmission stages)-infected blood from malaria patients in Burkina Faso. Gametocyte carriers were selected by examining thick blood smears from children aged between 5 and 11 from two villages in southwestern Burkina Faso (Dande and Soumouso, located 60 km north and 40 km

southeast of Bobo-Dioulasso, respectively). As a negative control (uninfected mosquitoes), females were fed on the same blood in which gametocytes were heat-inactivated. This heat-inactivation inhibits the infection and does not affect the blood nutritive quality (Sangare et al., 2013). This was done to avoid the potential confounding effects of different blood origins on performance and behaviors of infected and control mosquitoes (Sangare et al., 2013). Parasite inactivation was performed by placing collected blood in a thermo-mixer and heating it at 43°C for 15 min and 900 rpm while the remaining infectious blood was maintained at 37°C. Three hundred µl of blood were distributed in membrane feeders maintained at 37°C by water jackets. Cups containing 80 mosquitoes were placed under the feeders to allow blood feeding through Parafilm® membranes for 2 h. Fed females were sorted out and placed in new cages (30X30X30 cm) where they had constant access to 5% glucose solution on cotton wool pads until the behavioral assays.

Long-range Behavioral Assay

We studied the olfactory responses of our mosquitoes to human odor and control outdoor air using a dual-port olfactometer (Figure 1). The dual-port olfactometer was made of glass. The set-up consisted of two odor-sources connected to two collecting boxes (L X l X h = 40X20X20 cm) linked by two glass tubes (L = 60 cm, Ø = 10 cm) to a releasing cage (L X l X h = 60X40X40 cm). Odor stimuli came from two tents (L X l X h = 250X150X150 cm) connected to the two collecting boxes of the olfactometer by air vent hoses (Scanpart®, DXL = 10X300 cm). Fans, setup at the junction of the air vent hose and the tent, drew air from the tents to the olfactometer, providing the odor laden air current against which mosquitoes were induced to fly. A mosquito net was placed at the junction of the air vent hose with the collecting boxes to restrain responding mosquitoes inside the box, and to prevent them from flying into the hoses and into the tents. The tents were located outdoors and the olfactometer inside an experimental room. The air speed in the releasing cage of the dual-port olfactometer was regulated at 15 cm/s (±2 cm/s) using a Testo 425- Compact Thermal Anemometer (Testo, Forbach, France) equipped with a hot wire probe [range: 0 to +20 m/s, accuracy: ±(0.03 m/s + 5% of mv)]. The experimental room was at ambient temperature (27.5 ± 2.5°C) and relative humidity (80 ± 10%).

Olfactometer assays were carried out between 6 and 8 days post-infection, corresponding to the oocyst non-transmissible parasite stage, and between 13 and 17 days post-infection, corresponding to the sporozoite transmissible parasite stage. Mosquitoes that received an infectious blood-meal (exposed to infection) and mosquitoes that received an inactivated blood-meal (unexposed) were colored in the morning of the test and had access to water only. Mosquitoes were colored with one of two different colored powders (Luminous Powder Kit, BioQuip), corresponding to their exposure status (exposed vs. unexposed). The matching between exposure status and colors was switched between each test. In the evening, about 20 exposed and 20 unexposed mosquitoes were simultaneously released into the releasing cage and allowed to respond for 30 min. During this timeframe, mosquitoes that were activated by the stimuli left the

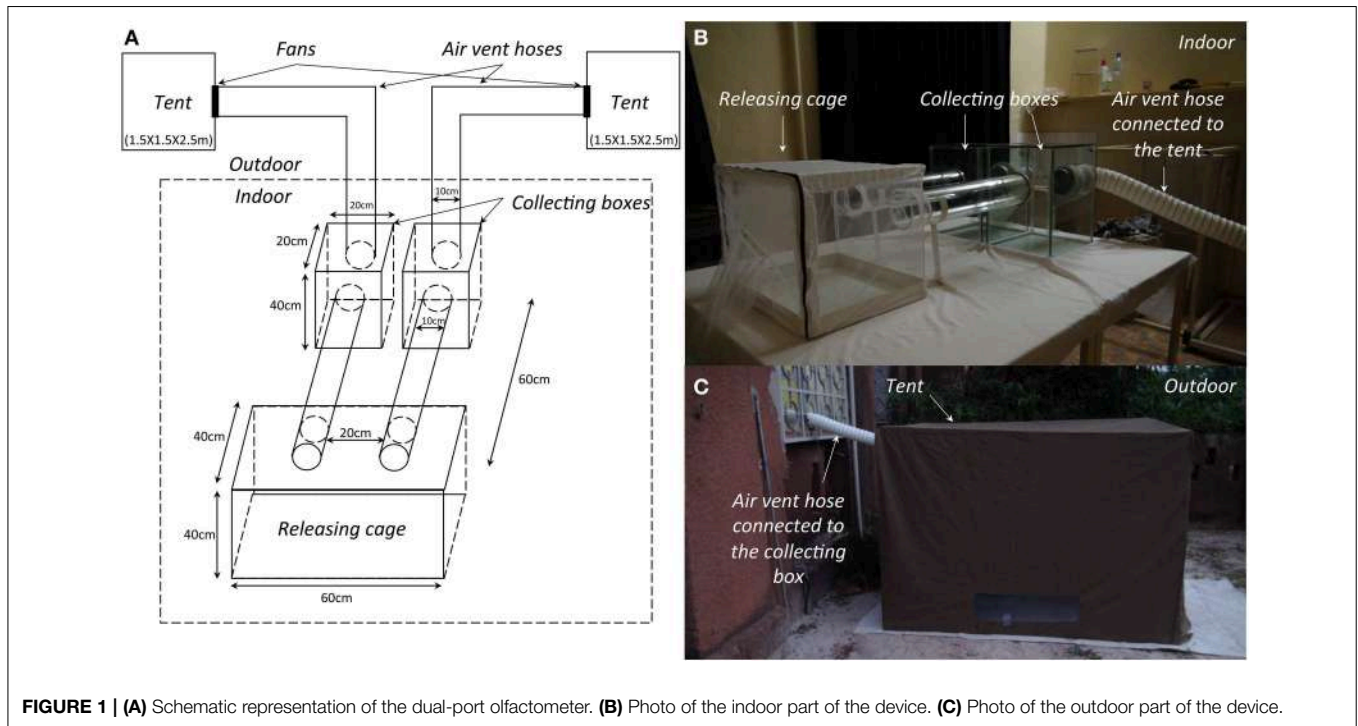


FIGURE 1 | (A) Schematic representation of the dual-port olfactometer. (B) Photo of the indoor part of the device. (C) Photo of the outdoor part of the device.

releasing cage and flew upwind into the collecting boxes from which they were retrieved. Two tests per evening were carried out between 7 and 11 p.m. Odor stimuli (human odor vs. outdoor air) were alternated between the right and left arm to avoid side effect. Different human volunteers were used as odor sources to obviate any host effect. We used a total of 15 volunteers. All volunteers who served as the human odor source were male Burkinabe between 20 and 44 years old and 50–80 kg who lived in Bobo Dioulasso. Volunteers were in good health condition. Before the test, volunteers were asked not to take a shower, apply perfume or use repellent, smoke or eat garlic and onion (Lefèvre et al., 2009c, 2010). The volunteers acting as odor sources sat on a chair inside the tent. To compare mosquito behavioral responses between immature (oocyst) and mature (sporozoite) infection phases, we used the same volunteers at both periods to reduce the background noise inherent to the high variability of mosquito response to different human hosts (Mukabana et al., 2002, 2004; Qiu et al., 2006, 2011).

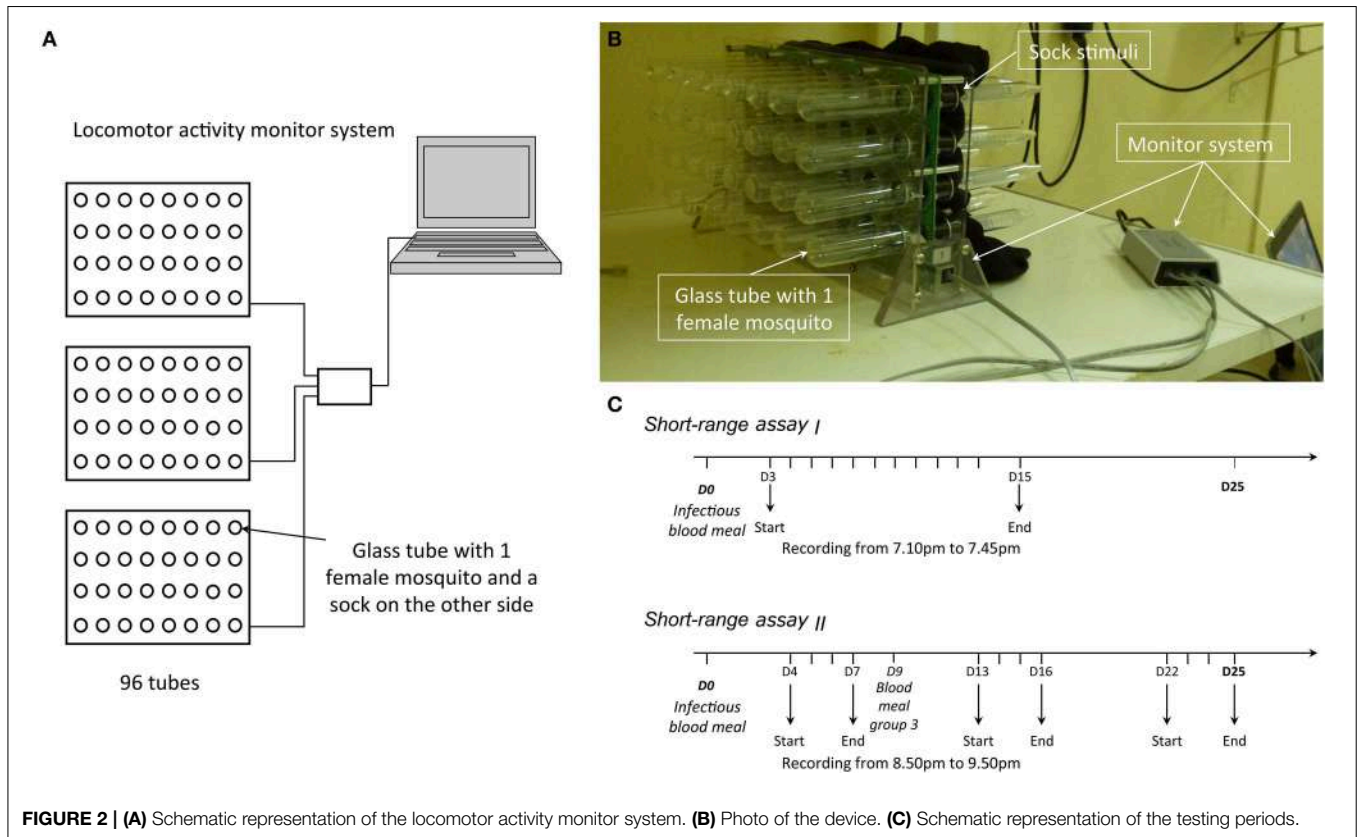
Each batch of mosquitoes was tested once, so that a fresh batch of naive mosquitoes was used for each test. A total of 755 unexposed and 682 exposed mosquitoes were released. At the end of a test, the mosquitoes inside each of the two upwind collecting boxes and the releasing box were removed with an aspirator and counted. After each test, the olfactometer was washed with 70% alcohol to remove odor contaminants left from previous test. Similarly, latex gloves were worn by the experimenter to avoid contamination of the equipment. This setup allows to study mosquito long-range behavioral responses from total host emanations instead of fractions thereof, such as skin extracts adsorbed on worn stockings (e.g., Smallegange et al., 2013). Two behavioral responses were

gauged: the *long-range activation* (proportion of mosquitoes caught in both collecting boxes out of the total number released, that is the proportion of mosquitoes engaging in take-off and up-wind flight) and *attraction* (proportion of mosquitoes caught in the collecting box emitting human odor out of the total number retrieved from both collecting boxes, that is the proportion of mosquitoes flying toward human volunteers' odors), both of which are part of the behavioral sequence leading a mosquito toward its host, and through which host-seeking is expressed.

Oocyst prevalence (proportion of *P. falciparum*-infected females) and intensity (number of oocysts in the midgut of infected females) were assessed by dissecting mosquito midguts the morning after behavioral testing (midguts were stained in a 1% mercurochrome solution and examined by light microscope). Heads and thoraces were used to determine sporozoite prevalence (proportion of infected females) by PCR assays (Morassin et al., 2002). Three groups of mosquitoes were thus obtained: (i) females that received a gametocyte-positive blood and became successfully infected (“exposed-infected” hereafter); (ii) females that received a gametocyte-positive blood and remained uninfected (“exposed-uninfected”); and (iii) females that received a heat-treated gametocytic blood (“unexposed”). Three replicates with a different gametocyte carrier each time were carried out.

Short-range Behavioral Assay I

The short-range behavior of exposed and unexposed *An. coluzzii* mosquitoes was studied using a locomotor activity monitor system (TriKinetics, Waltham, MA) following the procedure previously described (Lima-Camara et al., 2011; Rund et al., 2012;



Figures 2A,B). Briefly, mosquitoes were placed individually in glass tubes (2.5 cmX15 cm) with an infrared beam bisecting each tube and detecting motion. As an individual interrupted an infrared beam that crossed the tube, this interruption was detected by the monitoring system and added to the tube's activity count. In the morning of the third day post-infectious blood meal, females were set-up in the tubes closed by mosquito nets. They were provided daily with a 5% glucose solution. Unlike the long-range behavioral assay for which we used total body emanations, the short-range assay used clean or worn socks as a source of stimuli. The infrared beam was placed next to the sock to allow contact between the mosquito and the socks and each time the mosquito came back and forth on the sock, infrared beam breaks were recorded (**Figure 2B**).

Tests were conducted every evening between 7.10 and 7.45 p.m. from day 3 post-blood meal to day 15 post-blood meal except day 14 during which a power cut prevented the daily run (**Figure 2C**). The room was kept dark, and the temperature and relative humidity were similar to standard insectary conditions ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ relative humidity, 12:12 LD). Sugar was removed at 6 pm and the mosquito nets replaced by cleaned ones. Latex gloves were worn by the experimenter to avoid contamination of the equipment. The socks were set-up and mosquitoes were left to acclimatize for 20 min prior recordings. The socks were worn for 8 h on the same day as the behavioral assay. Two pairs of socks per volunteer were used, such that they were cleaned before being re-used the second following day. All

socks were cleaned with the same soap and water as well as dried in the same conditions. Three monitors were used allowing to simultaneously recording up to 96 individuals (**Figures 2A,B**). Stimuli (worn vs. unworn sock) as well as mosquito status (exposed vs. unexposed) were randomized on each monitor. The same mosquito individuals were followed daily; unless they died in which case they were replaced by naïve individuals kept in 30×30 cm cages. Four human volunteers worn the socks and a total of 265 mosquitoes were used.

Two behavioral responses were gauged: the *short-range activation* (proportion of mosquitoes that crossed at least once the infrared beam) and *activity* (number of infrared beam breaks in active individuals).

For this assay, the venous blood collected from the gametocyte-infected patients was centrifuged at 3000 rpm at 37°C for 3 min, and the serum was replaced by the same volume of European AB serum in order to limit potential effect of human transmission blocking immunity (Gouagna et al., 2004). The oocyst prevalence (number of *P. falciparum* infected females) and intensity (number of oocysts in the midgut of infected females) were assessed by dissecting mosquito midguts on a subset of additional (that were not used in the behavioral assay) females ($n = 109$), 6 days post-infectious blood meal. The midguts were stained in a 1% mercurochrome solution and examined by light microscope to detect and count the oocysts (Alout et al., 2014). Two different gametocyte carriers were used in one replicate.

Short-range Behavioral Assay II

This experiment used the same set-up as described above with some slight modifications. Mosquito activity was recorded during three periods: (i) from day 4 to day 7, (ii) from day 13 to day 16, and (iii) from day 22 to day 25 (Figure 2C). A new batch of mosquitoes was used for each period. The tests were carried out between 8.50 and 9.50 p.m. and socks were positioned at 8.25 p.m. *Anopheles coluzzii* mosquitoes exhibit daily nocturnal rhythms of flight activity with a peak at dusk (Jones and Gubbins, 1978; Rund et al., 2012). As *short-range assay I* recordings were taken soon after this dusk-related peak in flight activity possibly blurring the expected behavioral differences, we investigated whether a later recording would coincide with possible increased behavioral differences between exposed and unexposed mosquitoes. To assess the possible effect of heat-killed gametocytes on mosquito behavior, individuals were fed on three different types of blood for their first blood-meal: *P. falciparum* infected blood, the same heat-inactivated *P. falciparum* infected blood and blood from a healthy host (no *P. falciparum* infection) blood donor. This experiment therefore used two blood donors (one gametocyte carrier and one uninfected volunteer) and produce three groups of mosquitoes: (i) females that received a gametocyte-positive blood (“exposed” hereafter), (ii) females that received a heat-treated gametocytic blood (“unexposed”), and (iii) females that received a non-infectious blood (“unexposed healthy donor”). Finally, the batch of mosquitoes monitored from day 22 to day 25 received a second, non-infectious, blood meal from rabbit on the ninth day post-infectious blood meal (Smallegange et al., 2013). As for the odor stimuli, we used three socks-wearing volunteers and a total of 305 mosquitoes.

Oocyst prevalence (proportion of *P. falciparum*-infected females) and intensity (number of oocysts in the midgut of infected females) were assessed by dissecting mosquito midguts on a subset of additional females ($n = 50$), 7 days post-infectious blood meal. The midguts were stained in a 1% mercurochrome solution and examined by light microscope to detect and count oocysts (Alout et al., 2014). The assay was carried out on one replicate using one gametocyte carrier and one healthy blood donor and the same behavioral responses were gauged, i.e., mosquito *short-range activation* and *activity*.

Statistical Analyses

Long-range Behavioral Assay

Binomial generalized linear mixed models (“*glmer*” function in “*lme4*” package) were fitted to investigate the *long-range activation* (proportion of mosquitoes caught in both collecting boxes out of the total number released) and *attraction* (proportion of mosquitoes caught in the collecting box emitting human odor out of the total number retrieved from both collecting boxes). In these GLMMs, infection status (three levels: unexposed, exposed-infected, exposed-uninfected), time post-blood meal (two levels corresponding to the oocyst stage—6 to 8 days post-infectious blood meal—and to the sporozoite stage—13 to 17 days post-infectious blood meal), volunteer placed in the tent and the interaction between infection status and time post-blood meal were coded as fixed factors, while date and replicate were coded as random factors. Binomial GLMs were used to

assess the effect of oocyst intensity on mosquito long-range activation and attraction using a data subset made of infected females at the oocyst stage only.

Short-range Behavioral Assays

A binomial GLMM (“*glmer*” function in “*lme4*” package) was used to investigate the *short-range activation* (proportion of females that crossed the infrared beam at least once) and a negative binomial GLMM (to account for overdispersion—“*glmmadmb*” function in “*glmmADMB*” package) was used to investigate *activity* (number of infrared beam breaks). In these models, odor stimuli (worn sock vs. clean sock), parasite exposure (two and three levels for assay I and II, respectively: exposed, unexposed, and unexposed healthy donor for experiment II only), time post-blood meal and their interactions were coded as fixed factors and individual mosquito was coded as a random factor to account for repeated measurements on the same individual.

For model selection, we used the stepwise removal of terms, followed by likelihood ratio tests (LRT). Term removals that significantly reduced explanatory power ($P < 0.05$) were retained in the minimal adequate model (Crawley, 2007). All analyses were performed in R v. 3.0.3 (R Development Core Team, 2013). Results are presented as mean \pm standard error (se) and proportion \pm confidence interval (CI).

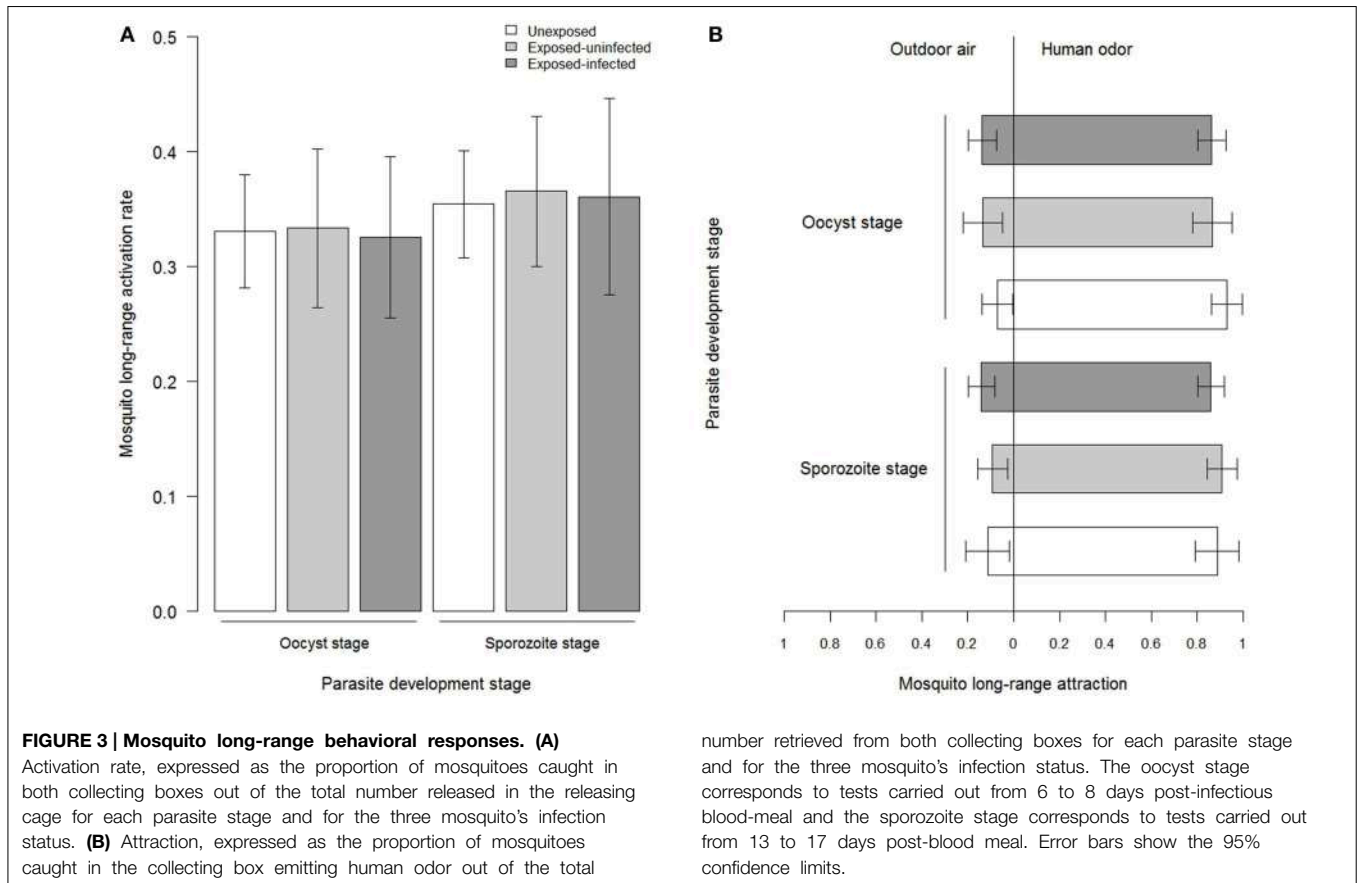
Ethic Statement

Ethical approval was obtained from the Centre Muraz Institutional Ethics Committee under agreement no. A003-2012/CE-CM. The protocol conforms to the declaration of Helsinki on ethical principles for medical research involving human subjects (version 2002) and informed written consent were obtained from all volunteers.

Results

Long-range Behavioral Assay

We tested a total of 1437 females (755 unexposed females and 682 females exposed to an infectious blood-meal). Among the 682 females exposed to an infectious blood-meal, 172 out of 352 females ($48.9 \pm 5\%$) harbored parasites at the oocyst stage and significantly less, 122 out of 330 ($36.9 \pm 5\%$), harbored parasite at the sporozoite stage [$X_1^2 = 8.6$, $P = 0.003$; Figure S1A]. The mean oocyst intensity was 15.26 ± 2.06 (Figure S1B). Overall 495 out of 1437 *An. coluzzii* left the releasing cage to fly upwind into one of the two collecting boxes (long-range activation of $34.45 \pm 2.5\%$). We found no significant effect of mosquito infection status [three levels: unexposed females, exposed-infected females, exposed-uninfected females; $X_2^2 = 0.15$, $P = 0.93$, Figure 3A] nor of the time post-blood meal [two-levels: days 6–8 and days 13–17; $X_1^2 = 1.1$, $P = 0.29$; Figure 3A], indicating that neither exposure to the parasite nor the time elapsed since the blood meal affected mosquito long-range activation. Similarly, the analysis of the subset of infected females at the oocyst stage showed no significant effect of parasite intensity on mosquito long-range activation [$X_1^2 = 0.9$,



$P = 0.34$]. Finally, there was no infection status by time post-blood meal interaction [$X_2^2 = 0.13$, $P = 0.94$, **Figure 3A**], indicating that parasite had no effect on mosquito activation regardless of its development stage. Long-range activation was however significantly influenced by the volunteer involved [$X_1^2 = 30.52$, $P = 0.007$; Figure S2].

Overall 435 out of the 495 activated mosquitoes chose the port emitting human odor ($87.88 \pm 3\%$, significant departure from a 50 to 50 distribution, $z = 14.38$, $P < 0.0001$; **Figure 3B**). There was no significant effect of the infection status [$X_2^2 = 1.2$, $P = 0.55$] nor of the time post-blood meal [$X_1^2 = 0.11$, $P = 0.74$] on mosquito attraction (**Figure 3B**). Similarly, analysis of the subset of infected females at the oocyst stage showed no influence of parasite intensity on mosquito long-range attraction [$X_1^2 = 0.03$, $P = 0.87$]. Finally, there was no infection status by time post-blood meal interaction [$X_2^2 = 1.01$, $P = 0.6$; **Figure 3B**], indicating that parasite had no effect on mosquito attraction toward human host regardless of its development stage. Long-range attraction was however significantly affected by the volunteer involved [$X_1^2 = 36.73$, $P < 0.001$; Figure S2].

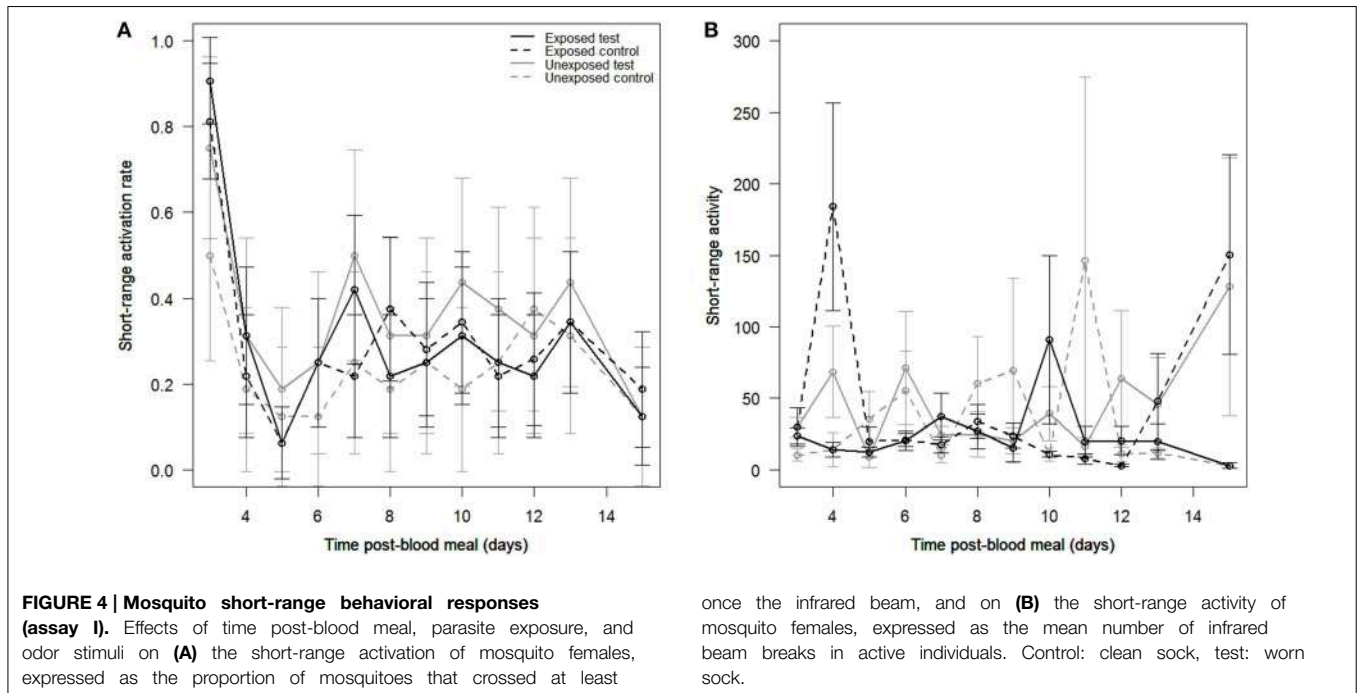
Short-range Behavioral Assay I

Among the 109 additional females exposed to an infectious blood meal but not used for behavioral tests, 54 females ($49.5 \pm 12\%$) harbored parasite at the oocyst stage (Figure S3A). The mean oocyst intensity was 8.87 ± 1.16 (Figure S3B).

number retrieved from both collecting boxes for each parasite stage and for the three mosquito's infection status. The oocyst stage corresponds to tests carried out from 6 to 8 days post-infectious blood-meal and the sporozoite stage corresponds to tests carried out from 13 to 17 days post-blood meal. Error bars show the 95% confidence limits.

We tested a total of 265 mosquitoes over 12 evenings. Among the 1149 records, 346 (30.1%) were active (i.e., mosquitoes crossed the infrared beam at least once to land/probe on the socks). We did not find a significant effect of parasite exposure [$X_1^2 = 0.03$, $P = 0.87$] nor of odor stimuli [$X_1^2 = 1.61$, $P = 0.2$] on mosquito short-range activation. Activation was however affected by the time post-blood meal [$X_1^2 = 19.56$, $P < 0.0001$; **Figure 4A**]. There was no interaction between parasite exposure and time post-blood meal [$X_1^2 = 2.29$, $P = 0.13$], indicating that the effect of time post-blood meal on mosquito activation was consistent across exposed and unexposed mosquitoes. Similarly, there was no odor stimuli by parasite exposure interaction [$X_1^2 = 3.15$, $P = 0.08$], indicating that exposed mosquitoes were not more active than unexposed females when confronted to a worn sock. There was also no odor stimuli by time post-blood meal interaction [$X_1^2 = 2.04$, $P = 0.15$]. Finally, we did not find a significant three-way interaction between parasite exposure, time post-blood meal and odor stimuli [$X_1^2 = 0.016$, $P = 0.9$; **Figure 4A**].

We found an average short-range activity of 35.4 ± 4.12 beam breaks/35 min. Mosquito activity was not significantly influenced by parasite exposure [$X_1^2 = 1.62$, $P = 0.2$] nor by odor stimuli [$X_1^2 = 0.12$, $P = 0.73$]. The time elapsed since the blood-meal had no effect on mosquito short-range activity [$X_1^2 = 0.96$, $P = 0.33$]. The interaction between parasite exposure and time post-blood meal did not significantly affect



mosquito short-range activity [$X_1^2 = 0.5$, $P = 0.48$], indicating that exposed mosquitoes were not significantly more active over time compared to unexposed mosquitoes. Similarly, there was no odor stimuli by parasite exposure [$X_1^2 = 3.36$, $P = 0.07$], indicating that exposed mosquitoes were not more active than unexposed counterparts in the presence of a worn sock. There was no odor stimuli by time post-blood meal interaction [$X_1^2 = 0$, $P = 1$] and no three-way interaction [$X_1^2 = 0.04$, $P = 0.84$; **Figure 4B**].

Short-range Behavioral Assay II

Among the 50 females exposed to an infectious blood meal but not used in the behavioral tests and dissected 7 days later, 39 harbored parasite at the oocyst stage ($78 \pm 11\%$; **Figure S3A**). The mean oocyst intensity was 12.08 ± 1.83 (**Figure S3B**).

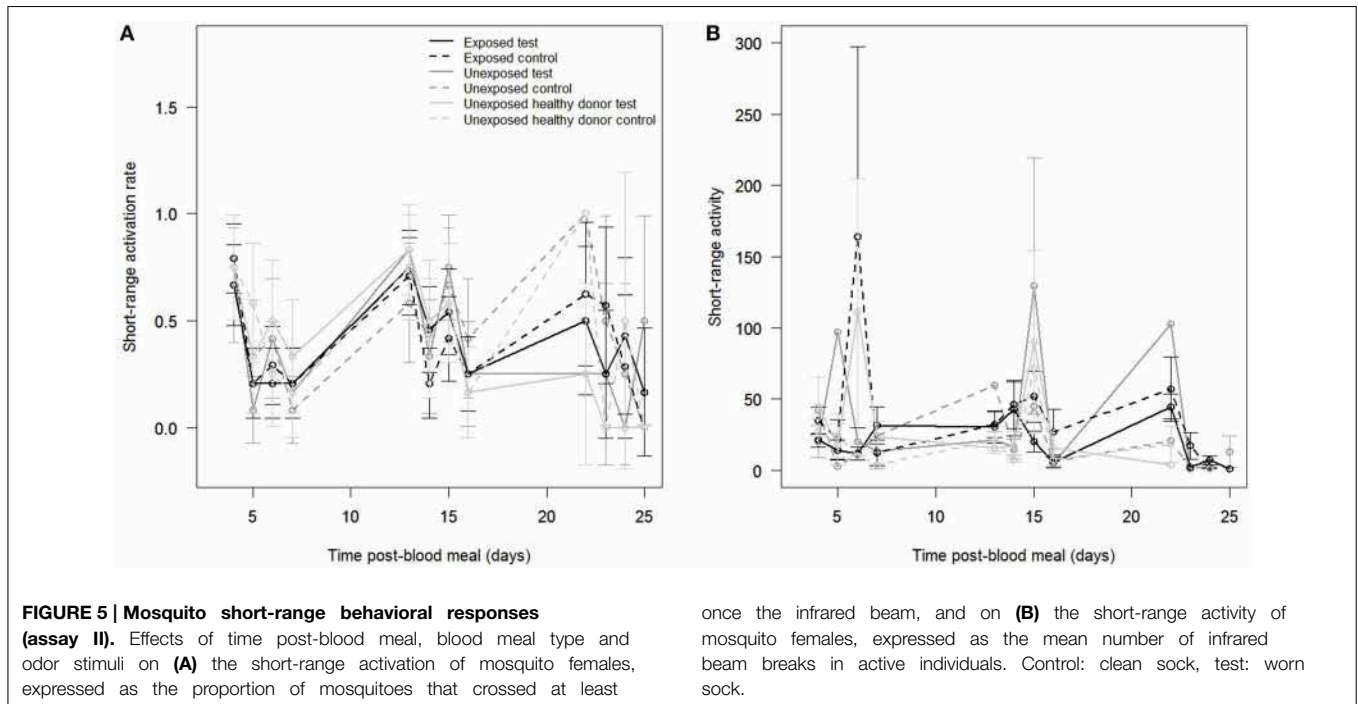
We tested a total of 305 mosquitoes over 12 evenings. Among the 875 records, 368 (42.06%) were active (i.e., mosquitoes crossed the infrared beam at least once to land/probe on the socks). We did not find a significant effect of blood meal type on mosquito short-range activation [$X_2^2 = 2.26$, $P = 0.32$, **Figure 5A**], indicating that exposed, unexposed and unexposed healthy donor mosquitoes had similar short-range activation. The short-range activation was not significantly affected by the time post-blood meal [$X_1^2 = 1.38$, $P = 0.24$] or by odor stimuli [$X_1^2 = 0.03$, $P = 0.85$]. There was no interaction between blood meal type and time post-blood meal [$X_2^2 = 1.27$, $P = 0.53$], indicating that exposed mosquitoes, unexposed and unexposed healthy donor mosquitoes displayed similar short-range activation over time. Similarly, there were no significant interactions between odor stimuli and blood meal type [$X_2^2 = 0.35$, $P = 0.84$] and between odor stimuli and time post-blood meal [$X_1^2 = 0.005$, $P = 0.95$]. Finally, there was no

significant three-way interaction effect [$X_2^2 = 1.34$, $P = 0.51$; **Figure 5A**].

The average short-range activity was 34.7 ± 4.3 beam breaks/hour. We did not find a significant effect of blood meal type on mosquito short-range activity [$X_2^2 = 0.1$, $P = 0.95$; **Figure 5B**]. Mosquito female activity was not significantly affected by odor stimuli [$X_1^2 = 0.56$, $P = 0.45$] nor by the time post-blood meal [$X_1^2 = 0.42$, $P = 0.52$]. The interaction between blood meal type and time post-blood meal was not significant [$X_2^2 = 0.38$, $P = 0.83$], indicating that exposed, unexposed and unexposed healthy donor mosquitoes displayed similar short-range activity over time. Similarly, there were no significant interactions between odor stimuli and time post-blood meal [$X_1^2 = 0.02$, $P = 0.89$] and between odor stimuli and blood meal type exposure [$X_2^2 = 5.38$, $P = 0.07$]. Finally, there was no significant three-way interaction effect [$X_2^2 = 1.92$, $P = 0.38$; **Figure 5B**].

Discussion

Several laboratory and field studies have demonstrated behavioral modifications in *Plasmodium*-infected mosquitoes such as motivation and avidity to feed on vertebrate hosts, in ways that increase contact with vertebrate hosts and hence increase the probability of parasite transmission (Rossignol et al., 1984, 1986; Wekesa et al., 1992; Koella and Packer, 1996; Koella et al., 1998, 2002; Anderson et al., 1999; Cator et al., 2013; Smallegange et al., 2013). Because investigations on sympatric host-parasite combinations are essential to integrate local co-adaptation phenomena (Munstermann, 1994; Norris et al., 2001; Joy et al., 2008; Harris et al., 2012; Baeshen et al., 2014) as well as to validate the results found in unnatural host-parasite associations



(Boëte, 2005; Cohuet et al., 2006; Tripet et al., 2008), the current study examined for the first time in controlled laboratory conditions whether natural field isolates of the deadliest human malaria parasite *P. falciparum* can manipulate the behavior of its vector *An. coluzzii*. We first used a dual-port olfactometer to investigate the activation and attraction of uninfected and infected mosquitoes in response to either outdoor air or human odors. *Plasmodium falciparum* infection had no significant effect on mosquito behaviors irrespective of parasite developmental stage (oocyst vs. sporozoite stages). While our device allows the study of odor-mediated behaviors and obviates short-range stimuli such as visual cues, warm, moist convective currents, and host movement, most evidence for parasite influence on mosquito behaviors come from studies using short-range devices. Therefore, it is possible that sporozoite-infected *An. coluzzii* presents similar behavioral responses as uninfected counterparts in the early stages of the host-seeking process, when it mostly responds to long-range odor stimuli, and then display increased responses at a shorter range, when other cues become more important. To test this possibility we used a locomotor activity monitor system (short-range behavioral assays I and II). Again, we found no effect of parasite exposure on mosquito behavior, neither during the early non-transmissible infection phase, nor during the late transmissible infection phase.

Altogether our findings contrast with the previous evidence for the existence of parasite manipulation of mosquito behavior. Several hypotheses could explain these contradictory results. First, it is possible that natural selection has not favored the evolution of manipulation in this population because uninfected wild *An. coluzzii* already take multiple blood meals during each gonotrophic cycle (Scott and Takken, 2012). Since feeding is costly (e.g., host defensive behavior) it is possible that, in this

system, any further increases in vector feeding attempts would not significantly increase parasite fitness (as suggested for *Aedes aegypti* mosquitoes infected with dengue viruses, Putnam and Scott, 1995). Future studies investigating the fitness costs and benefits associated to feeding behavior of uninfected *An. coluzzii* in our study area would be necessary to test this hypothesis.

Second, since manipulation can be costly for the vector (e.g., higher mortality risk; Anderson et al., 2000; Schwartz and Koella, 2001), it is possible that during their long co-evolutionary history, the mosquito vector has evolved resistance (Daoust et al., 2015). In their seminal paper, May and Anderson (1979) noted that “because the generation times of most hosts are several orders of magnitude longer than those of their parasites, it is tempting to conclude that selection acts more rapidly on the parasites. However, the way parasitic infections act within host populations makes it likely that the parasites force the pace of host evolution to keep step with, or even ahead of, their own evolution.” According to this scenario, our mosquito vector is locally adapted to its parasite and is ahead in the arm race such that manipulation is not expressed. In contrast, when the parasite is artificially associated with an allopatric or unnatural vector, its ability to manipulate the mosquito behavior could be expressed.

In particular, parasite manipulation may depend on infection intensity so that behavioral manipulation can be expressed only above a certain threshold. Accordingly, unnatural mosquito-*Plasmodium* interactions often exhibit higher infection intensity compared to natural combinations (Cohuet et al., 2006), and higher intensities were also observed in allopatric vs. sympatric infections with field isolates of *P. falciparum* (Harris et al., 2012). Future experiments, increasing infection levels using, for instance, blood with exceptional amount of gametocytes, are required to address this hypothesis.

Finally, it is possible that manipulation was not expressed merely because of our designs. For example, while our experiments were carried out from 19:00 to 23:00, mosquito activity spans from dusk to dawn with a peak around midnight. This activity peak is correlated to human resting behavior and is expected to minimize defensive behaviors-related death (Lehane, 2005). Future experiments investigating host-seeking behaviors of infected and uninfected mosquitoes around this peak are required to test whether malaria parasites have evolved the ability to fine-tune their manipulation to the temporal behavior of both their mosquito vectors and vertebrate hosts.

In the long-range behavioral assay, about 88% of the activated mosquitoes were retrieved from the human collecting box regardless of their infection status. We cannot exclude the possibility that this general high level of attraction to human odor reduced the chance to detect an effect of infection. Our previous studies using the same methodology but different mosquitoes (either different species or F0 and F1 wild mosquitoes) report mosquito attraction varying from *ca.* 50% (Lefèvre et al., 2009c, 2010) to *ca.* 80% (Lefèvre et al., 2009c). Further studies using mosquito populations with varying natural level of attraction to human odors are needed to assess possible parasite manipulation of mosquito behavior.

In the short-range behavioral assays, worn socks did not induce a significant increase in mosquito activation and activity as observed in previous studies using a different device (e.g., Smallegange et al., 2013 with free flying mosquitoes in cages). At least three hypotheses can be proposed to explain this result. Firstly, with our Locomotor Activity Monitor System, mosquitoes were kept in glass tubes and this may have either constrained their movement and willingness to activate, or stressed them in some way that would make them overly active regardless of the stimulus. Secondly, as the odor stimuli were emitted in a small enclosed environment (the glass tube), mosquito odorant receptors were perhaps quickly saturated hindering behavioral responses. Thirdly, previous recordings of mosquito behavior with this system were carried out for 24 h on several days (Lima-Camara et al., 2011; Rund et al., 2012). Thus, our relatively short-recording times might have limited

the threshold of detection in case of small behavioral differences between clean and worn socks.

In addition, the distinction between infected and exposed-uninfected mosquitoes was not considered in the short-range behavioral assays. Although no behavioral differences were observed among infected and exposed-uninfected mosquitoes in the long-range assay and most (~80% see above) of the mosquitoes were infected in the short-range experiment II, we cannot completely exclude the possibility that this lack of distinction obscured differences especially if the manipulation signal was subtle.

In conclusion, this study using a natural mosquito-malaria parasite association suggests that manipulation of vector behavior may not be a general phenomenon. We hypothesize that the observed contrasting phenotypes with model systems might result from coevolution of the human parasite and its natural vector. Overall, our results highlight the importance of following up discoveries in laboratory model systems with studies on natural parasite-mosquito interactions to accurately predict the epidemiological, ecological and evolutionary consequences of parasite manipulation of vector behaviors.

Acknowledgments

This study was funded by the ANR (11-PDOC-006-01). We would like to thank all children and their parents for participating in this study, the local authorities for their support, as well as all the volunteers for the dual-port olfactometer assays. We are very grateful to the IRSS staff in Burkina Faso for technical assistance. We thank Frédéric Simard and Karine Mouline for letting us use their locomotor activity monitor system. We thank the Laboratoire Mixte International LAMIVECT, Bobo Dioulasso, Burkina Faso. We are grateful to A. Wong and J. E. Crawford for their valuable comments.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2015.00086>

References

- Aguilar, R., Dong, Y., Warr, E., and Dimopoulos, G. (2005). *Anopheles* infection responses; laboratory models versus field malaria transmission systems. *Acta Trop.* 3, 285–291. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.06.005
- Alout, H., Djégbé, I., Chandre, F., Djogbenou, L. S., Dabiré, R. K., Corbel, V., et al. (2014). Insecticide exposure impacts vector-parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proc. R. Soc. Lond.* 281, 1786. doi: 10.1098/rspb.2014.0389
- Alout, H., Ndam, N. T., Sandeu, M. M., Djogbe, I., Chandre, F., Dabiré, R. K., et al. (2013). Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS ONE* 8:e63849. doi: 10.1371/journal.pone.0063849
- Anderson, R. A., Knols, B. G. J., and Koella, J. C. (2000). *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitol* 120, 329–333. doi: 10.1017/S0031182099005570
- Anderson, R. A., Koella, J. C., and Hurd, H. (1999). The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. Lond.* 266, 1729–1733. doi: 10.1098/rspb.1999.0839
- Añez, N., and East, J. S. (1984). Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. *Acta Trop.* 41, 93–95.
- Baeshen, R., Ekechukwu, N. E., Toure, M., Paton, D., Coulibaly, M., Traore, S. F., et al. (2014). Differential effects of inbreeding and selection on male reproductive phenotype associated with the colonization and laboratory maintenance of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 13, 14. doi: 10.1186/1475-2875-13-19
- Boëte, C. (2005). Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol.* 21, 445–447. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.012
- Cator, L. J., George, J., Blanford, S., Murdock, C. C., Baker, T. C., Read, A. F., et al. (2013). 'Manipulation' without the parasite: altered feeding behaviour of

- mosquitoes is not dependent on infection with malaria parasites. *Proc. R. Soc. Lond.* 280:0711. doi: 10.1098/rspb.2013.0711
- Cator, L. J., Lynch, P. A., Read, A. F., and Thomas, M. B. (2012). Do malaria parasites manipulate mosquitoes? *Trends Parasitol.* 28, 466–470. doi: 10.1016/j.pt.2012.08.004
- Cohuet, A., Osta, M. A., Morlais, I., Awono-Ambene, P. H., Michel, K., Simard, F., et al. (2006). *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *Embo. Rep.* 7, 1285–1289. doi: 10.1038/sj.embor.7400831
- Crawley, M. J. (2007). *The R Book. The Atrium, Southern Gate*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Daoust, S. P., King, K. C., Brodeur, J., Roitberg, B., Roche, B., and Thomas, F. (2015). Making the best of a bad situation: host partial resistance and by-pass to behavioural manipulation by parasites? *Trends Parasitol.* doi: 10.1016/j.pt.2015.05.007. [Epub ahead of print].
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., and Dimopoulos, G. (2006). *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.* 2:e52. doi: 10.1371/journal.ppat.0020052
- Fanello, C., Santolamazza, F., and della Torre, A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med. Vet. Entomol.* 16, 461–464. doi: 10.1046/j.1365-2915.2002.00393.x
- Gouagna, L. C., Bonnet, S., Gounoue, R., Verhave, J. P., Eling, W., Sauerwein, R., et al. (2004). Stage-specific effects of host plasma factors on the early sporogony of autologous *Plasmodium falciparum* isolates within *Anopheles gambiae*. *Trop. Med. Int. Health* 9, 937–948. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01300.x
- Harris, C., Morlais, I., Churcher, T. S., Awono-Ambene, P., Gouagna, L. C., Dabire, R. K., et al. (2012). *Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations. *PLoS ONE* 7:849. doi: 10.1371/journal.pone.0030849
- Hughes, D., Andersen, S., Hywel-Jones, N., Himaman, W., Billen, J., and Boomsmma, J. (2011). Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecol.* 11:13. doi: 10.1186/1472-6785-11-13
- Hughes, D. P., Brodeur, J., and Thomas, F. (2012). *Host Manipulation by Parasites*. Oxford: University Press.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 141–161. doi: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112722
- Jenni, L., Molyneux, D. H., Livesey, J. L., and Galun, R. (1980). Feeding behaviour of tsetse flies infected with salivarian trypanosomes. *Nature* 283, 383–385. doi: 10.1038/283383a0
- Jones, M. D. R., and Gubbins, S. J. (1978). Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiol. Entomol.* 3, 213–220. doi: 10.1111/j.1365-3032.1978.tb00151.x
- Joy, D. A., Gonzalez-Ceron, L., Carlton, J. M., Gueye, A., Fay, M., McCutchan, T. F., et al. (2008). Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1245–1252. doi: 10.1093/molbev/msn073
- Koella, J. C., and Packer, M. J. (1996). Malaria parasites enhance blood-feeding of their naturally infected vector *Anopheles punctulatus*. *Parasitol* 113, 105–109. doi: 10.1017/S0031182000066348
- Koella, J. C., Rieu, L., and Paul, R. E. L. (2002). Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behav. Ecol.* 13, 816–820. doi: 10.1093/beheco/13.6.816
- Koella, J. C., Sorensen, F. L., and Anderson, R. A. (1998). The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc. R. Soc. Lond.* 265, 763–768. doi: 10.1098/rspb.1998.0358
- Lefèvre, T., Adamo, S. A., Biron, D. G., Missé, D., Hughes, D., and Thomas, F. (2009a). “Chapter 3 Invasion of the Body Snatchers: The Diversity and Evolution of Manipulative Strategies in Host–Parasite Interactions,” *Advances in Parasitology*, Vol. 68, ed P. W. Joanne (Academic Press), 45–83.
- Lefèvre, T., Gouagna, L. C., Dabire, R. K., Elguero, E., Fontenille, D., Costantini, C., et al. (2009c). Evolutionary lability of odour-mediated host preference by the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Trop. Med. Int. Health* 14, 228–236. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02206.x
- Lefèvre, T., Gouagna, L.-C., Dabiré, K. R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., et al. (2010). Beer Consumption Increases Human Attractiveness to Malaria Mosquitoes. *PLoS ONE* 5:e9546. doi: 10.1371/journal.pone.0009546
- Lefèvre, T., Koella, J. C., Renaud, F., Hurd, H., Biron, D. G., and Thomas, F. (2006). New prospects for research on manipulation of insect vectors by pathogens. *PLoS Pathog.* 2:72. doi: 10.1371/journal.ppat.0020072
- Lefèvre, T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Missé, D., Poulin, R., and Thomas, F. (2009b). The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol. Evol.* 24, 41–48. doi: 10.1016/j.tree.2008.08.007
- Lefèvre, T., and Thomas, F. (2008). Behind the scene, something else is pulling the strings: emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect. Genet. Evol.* 8, 504–519. doi: 10.1016/j.meegid.2007.05.008
- Lefèvre, T., Thomas, F., Schwartz, A., Levashina, E., Blandin, S., Brizard, J. P., et al. (2007). Malaria *Plasmodium* agent induces alteration in the head proteome of their *Anopheles* mosquito host. *Proteomics* 7, 1908–1915. doi: 10.1002/pmic.200601021
- Lefèvre, T., Vantaux, A., Dabiré, R. K., Mouline, K., and Cohuet, A. (2013). Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9:e1003365. doi: 10.1371/journal.ppat.1003365
- Lehane, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects, 2nd Edn*. New York, NY: Cambridge University Press.
- Lima-Camara, T. N., Bruno, R. V., Luz, P. M., Castro, M. G., Lourenco-de-Oliveira, R., Sorgine, M. H. F., et al. (2011). Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS ONE* 6:e17690. doi: 10.1371/journal.pone.0017690
- MacDonald, G. (1957). *The Epidemiology and Control of Malaria*. London: Oxford University Press.
- May, R. M., and Anderson, R. M. (1979). Population biology of infectious diseases: Part. I. *Nature* 280, 455–461. doi: 10.1038/280455a0
- Molyneux, D. H., and Jefferies, D. (1986). Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitol.* 92, 721–736. doi: 10.1017/S0031182000065574
- Moore, J. (1993). Parasites and the behavior of biting flies. *J. Parasitol.* 79, 1–16. doi: 10.2307/3283270
- Moore, J. (2002). *Parasites and the Behavior of Animals*. New York, NY: Oxford University Press.
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, A., and Magnaval, J. F. (2002). One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 503–508.
- Mukabana, W., Takken, W., Coe, R., and Knols, B. (2002). Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 1:17. doi: 10.1186/1475-2875-1-17
- Mukabana, W., Takken, W., Killeen, G., and Knols, B. (2004). Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 3:1. doi: 10.1186/1475-2875-3-1
- Munstermann, L. E. (1994). Unexpected genetic consequences of colonization and inbreeding: allozyme tracking in Culicidae (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 157–164. doi: 10.1093/aesa/87.2.157
- Norris, D. E., Shurtleff, A. C., Toure, Y. T., and Lanzaro, G. C. (2001). Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera : Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38, 336–340. doi: 10.1603/0022-2585-38.2.336
- Poulin, R. (2007). *Evolutionary Ecology of Parasites, 2nd Edn*. Princeton: Princeton University Press.
- Poulin, R. (2010). Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. *Adv. Stud. Behav.* 41, 151–186. doi: 10.1016/S0065-3454(10)41005-0
- Putnam, J. L., and Scott, T. W. (1995). Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 225–227.
- Qiu, Y. T., Smallegange, R. C., Van Loon, J. J. A., and Takken, W. (2011). Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Med. Vet. Entomol.* 25, 247–255. doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00924.x
- Qiu, Y. T., Smallegange, R. C., Van Loon, J. J. A., Ter Braak, C. J. F., and Takken, W. (2006). Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s. s. *Med. Vet. Entomol.* 20, 280–287. doi: 10.1111/j.1365-2915.2006.00627.x

- R Development Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rebeil, R., Jarrett, C. O., Driver, J. D., Ernst, R. K., Oyston, P. C. F., and Hinnebusch, B. J. (2013). Induction of the *Yersinia pestis* PhoP-PhoQ regulatory system in the flea and its role in producing a transmissible infection. *J. Bacteriol.* 195, 1920–1930. doi: 10.1128/JB.02000-12
- Rogers, M. E. (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front. Microbiol.* 3:223. doi: 10.3389/fmicb.2012.00223
- Rogers, M. E., and Bates, P. A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 3:e91. doi: 10.1371/journal.ppat.0030091
- Rossignol, P. A., Ribeiro, J. M. C., and Spielman, A. (1984). Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 17–20.
- Rossignol, P. A., Ribeiro, J. M. C., and Spielman, A. (1986). Increased biting rate and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 277–279.
- Rund, S. S. C., Lee, S. J., Bush, B. R., and Duffield, G. E. (2012). Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J. Insect. Physiol.* 58, 1609–1619. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.09.016
- Sangare, I., Michalakis, Y., Yameogo, B., Dabire, R. K., Morlais, I., and Cohuet, A. (2013). Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar. J.* 12:2. doi: 10.1186/1475-2875-12-2
- Schwartz, A., and Koella, J. C. (2001). Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends Parasitol.* 17, 189–194. doi: 10.1016/S1471-4922(00)01945-0
- Scott, T. W., and Takken, W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol.* 28, 114–121. doi: 10.1016/j.pt.2012.01.001
- Severo, M. S., and Levashina, E. A. (2014). Mosquito defenses against *Plasmodium* parasites. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 3, 30–36. doi: 10.1016/j.cois.2014.07.007
- Shandilya, H., Gakhar, S. K., and Adak, T. (1999). *Plasmodium* infection-induced changes in salivary gland proteins of malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *J. Infect. Dis.* 52, 214–216.
- Smallegange, R. C., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., Gezan, S., Takken, W., Sauerwein, R. W., et al. (2013). Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PLoS ONE* 8:e63602. doi: 10.1371/journal.pone.0063602
- Thomas, F., Adamo, S., and Moore, J. (2005). Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav. Processes.* 68, 185–199. doi: 10.1016/j.beproc.2004.06.010
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P., and Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *J. Evol. Biol.* 15, 356–361. doi: 10.1046/j.1420-9101.2002.00410.x
- Tripet, F., Aboagye-Antwi, F., and Hurd, H. (2008). Ecological immunology of mosquito-malaria interactions. *Trend Parasitol.* 24, 219–227. doi: 10.1016/j.pt.2008.02.008
- Van Den Abbeele, J., Caljon, G., De Ridder, K., De Baetselier, P., and Coosemans, M. (2010). *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. *PLoS Pathog.* 6:e1000926. doi: 10.1371/journal.ppat.1000926
- Vantaux, A., Dabiré, R., Cohuet, A., and Lefèvre, T. (2014). A heavy legacy: offspring of malaria-infected mosquitoes show reduced disease resistance. *Malar. J.* 13:442. doi: 10.1186/1475-2875-13-442
- Wekesa, J. W., Copeland, R. S., and Mwangi, R. W. (1992). Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding-behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 484–488.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Vantaux, de Sales Hien, Yameogo, Dabiré, Thomas, Cohuet and Lefèvre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESEARCH

Open Access



Administration of ivermectin to peridomestic cattle: a promising approach to target the residual transmission of human malaria

Hermann S. Pooda^{1,2,5*}, Jean-Baptiste Rayaisse¹, Domonbabele François de Sale Hien³, Thierry Lefèvre^{3,4}, Serge R. Yerbanga³, Zakaria Bengaly¹, Roch K. Dabiré³, Adrien M. G. Belem⁵, Issa Sidibé^{1,2}, Philippe Solano⁶ and Karine Mouline^{3,4}

Abstract

Background: The success of current control tools in combatting malaria vectors is well established. However, sustained residual transmission of *Plasmodium* parasites persists. Mass drug administration (MDA) to humans of the endectocide ivermectin for vector control is receiving increasing attention. However, vectors feeding upon animals escape this promising approach. Zoophagy of mosquitoes sustains both the vector population and endemic population of vector-borne pathogens. Therefore, only a strategy that will combine ivermectin MDAs targeted at humans and their peridomestic animals could be successful at controlling residual malaria transmission.

Methods: Burkinabé cattle have been treated with injectable therapeutic dose of ivermectin (0.2 mg/kg of body weight) to render blood meals toxic to field representative populations of *Anopheles coluzzii* carrying the *kdr* mutation. Direct skin-feeding assays were performed from 2 to 28 days after injection (DAI) and mosquitoes were followed for their survival, ability to become gravid and fecundity. Membrane feeding assays were further performed to test if an ivermectin blood meal taken at 28 DAI impacts gametocyte establishment and development in females fed with infectious blood.

Results: The mosquitocidal effect of ivermectin is complete for 2 weeks after injection, whether 12 days cumulative mortalities were of 75 and 45 % the third and fourth weeks, respectively. The third week, a second ivermectin blood meal at sub-lethal concentrations further increased mortality to 100 %. Sub-lethal concentrations of ivermectin also significantly decreased egg production by surviving females, increasing further the detrimental effect of the drug on vector densities. Although females fitness was impaired by sub-lethal ivermectin blood meals, these did not diminish nor increase their susceptibility to infection.

Conclusion: This study demonstrates the potential of integrated MDA of ivermectin to both human and peridomestic cattle to target vector reservoirs of residual malaria transmission. Such integration lies in 'One-Health' efforts being implemented around the globe, and would be especially relevant in rural communities in Africa where humans are also at risk of common zoonotic diseases.

Keywords: Ivermectin, Cattle, One-Health, Malaria, West Africa, *Anopheles coluzzii*, Survival, Fecundity, Infectivity

*Correspondence: poodasiehermann@yahoo.fr

² Ministère des Ressources Animale/Campagne Panafricaine d'éradication de la mouche tsé-tsé et des trypanosomoses, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The success of long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) in combatting malaria transmission by *Anopheles* mosquitoes is well established. However, transmission of *Plasmodium* parasites persists despite effective coverage being achieved with LLINs and IRS interventions. Besides the evolution of physiological resistance allowing a mosquito to survive despite direct contact with insecticides (either by target site mutations and/or metabolic resistance [1]), vectors responsible for residual transmission can exhibit specific behaviours, such as biting at unusual times, that allow them to escape the fatal exposure to LLINs or IRS [2, 3]. Insecticide avoidance, exophily, exophagy, but also zoophagy [4], are all behaviours that minimize the contact between the mosquito and the insecticides, and contribute to the build-up of reservoirs of vector populations responsible for residual transmission of diseases.

In this context, mass drug administration (MDA) of endectocidal drugs to humans for human malaria control is receiving increasing attention [5, 6]. Endectocides are drugs that have activity against endo- and ectoparasites among which ivermectin was first introduced for commercial use as an anti-parasitic drug for animal (livestock and pets) use in 1981. This molecule shares with other avermectins and milbemecins a pharmacophore consisting on 16-membered macrocyclic lactone, and is an agonist of specific chloride ion channels (primarily glutamate-gated chloride channels). As these channels are neurotransmission inhibitors, ivermectin leads to flaccid paralysis, which culminates in the animal death [7]. Ivermectin is the only known endectocide currently approved for human use and is now massively distributed as part of pan-African programs for onchocerciasis control and lymphatic filariasis elimination [8, 9]. The broad range of invertebrates it targets includes mosquito vectors of diseases, such that ivermectin is now proposed as an additional tool to control vector-borne diseases such as malaria [5, 6, 10–15]. Hence, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that a blood meal containing ivermectin causes a significant reduction in adult female mosquito longevity, fecundity and fertility [5]. In experimental infections of malaria mosquitoes, ivermectin was also shown to inhibit *Plasmodium* sporogony [16]. Recent field-based studies have demonstrated that MDA using ivermectin can significantly reduce the survivorship of adult field-caught *Anopheles* mosquitoes [11, 12, 14, 15]. Ivermectin, thus, seems to negatively affect a series of mosquito traits (longevity, fecundity, competence to pathogens), which are keys in determining the intensity of disease transmission. In other words, ivermectin can reduce mosquito vectorial capacity. The straightforward rationale of using ivermectin MDA for

vector control lies on the fact that the treated human directly delivers the toxic molecule to any human-feeding mosquito regardless of its genus, species, and possibly for a large spectrum of the behavioural resistance it might display, i.e., mosquitoes of diurnal or nocturnal activities, resting indoors or outdoors, feeding indoors or outdoors, could be targeted.

The glutamate-gated chloride channel, primary targets of ivermectin, has recently been characterized in *Anopheles gambiae*, where it is expressed in motor and sensory neurons [17]. Like for other invertebrates [18, 19], ivermectin has been shown to potentiate glutamate action in malaria mosquitoes [17]. This mode of action is distinct compared to current (and candidate) insecticides for IRS application (pyrethroids, organochlorines, organophosphates, and carbamates) and LLIN treatment (pyrethroids), making ivermectin administration a promising tool for integrated vector control and insecticide resistance management in malaria vectors.

However, vectors feeding upon animals will still escape this approach. *Anopheles* mosquitoes are able to feed on many other vertebrates than humans and secondary malaria vectors feed primarily on animals, outdoors. Because they only feed occasionally on humans these mosquitoes are poor disease vectors, but since they respond poorly to LLIN or IRS interventions, they are therefore responsible for limited but self-sustaining disease transmission [4]. Highly anthropophilic *Anopheles* species also display zoophilic and outdoor blood-feeding behaviour in response to the altered patterns of blood source availability following IRS or LLIN implementation [20]. For example, a study conducted in an area of extensive coverage with LLINs showed that whereas the anthropophilic rate (as measured with odour-baited entry traps) of *Anopheles coluzzii* was 88 %, over 50 % fed on cattle, indicating a plastic feeding strategy with a zoophilic pattern of host selection despite a stronger response to human odour. In this field population, *An. coluzzii* has an innate preference for humans but the weak accessibility of this host species, due to the use of bed nets, forces the mosquitoes to feed on cattle, an available, less preferred host [21]. Zoophagy of mosquitoes, either innate or induced by control interventions, can therefore sustain the build-up of a reservoir of vector populations responsible for the residual transmission of parasites.

Ivermectin is also widely used by veterinarian services for the control of parasites of companion animals and livestock [22]. Therefore, animal treatment with ivermectin as a supplementary tool for controlling vectors of human disease would be rather straightforward to implement and, hence, this approach has received little attention [4, 5, 23]. However, it is not yet considered

as an intrinsic, mandatory part of future malaria vector control approaches using MDA of ivermectin distributed to humans. Such integration would lie in 'One-Health' efforts being implemented around the globe, and would be especially relevant in rural farming communities in Africa where humans are also at risk of common zoonotic diseases.

In Burkina Faso, around 77 % of the population live in rural areas [24], where people mainly rely on small family farming for their livelihoods, based on cereals and cotton cropping, livestock breeding and tree product collection. Almost each farm household owns a pair of oxen dedicated to field labour. The present work explores the possibility of integrated ivermectin MDA measures, which would benefit humans and animals in rural areas of Burkina Faso. Other studies have dealt with the impact of ivermectin on life history traits of *Anopheles gambiae s.l.* fed on cattle [22, 25–27] and on their vector competence for laboratory strain of *P. falciparum* [16]. However, the present study uses a combination of sympatric, recently established mosquito colonies, local calves and field-collected strains of *P. falciparum*, with the aim of being as relevant as possible in establishing the proof of concept that ivermectin-treated cattle could be used as an additional tool to circumvent residual malaria transmission in rural Africa.

Methods

Mosquito colony

The *An. coluzzii* colony hosted at the Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo Dioulasso, Burkina Faso insectary facility was used. This colony was established in 2008 and repeatedly replenished with F1 from wild-caught mosquito females collected in Kou Valley (11°23'14"N, 4°24'42"W), 30 km from Bobo-Dioulasso, southwestern Burkina Faso (West Africa), and identified for their species status by routine PCR [28]. Potential contamination of the colony by other *Anopheles* species was routinely checked using the same technique. Mosquitoes were maintained under the standard conditions of 27 ± 2 °C, 75 ± 5 % relative humidity and 12 h/12 h day/night cycle. Larvae were reared at low densities in plastic trays in tap water and fed ad libitum with commercial alevin food [Tetramin® Baby Fish Food (Tetrawerke, Melle, Germany)]. Pupae were collected in cups and placed in 30 × 30 × 30 cm cages. Newly emerged adults were allowed to feed for three to 5 days on 5 % glucose solution then starved for 16–18 h before blood feeding on cattle.

Thirty-two females were randomly chosen in the colony to characterize their physiological resistance status by PCR following [29] for the *kdr* mutation and for *ace1* [30]. Eight females carried the mutated *kdr* allele, and all carried the wild alleles of the *ace-1* gene. The *kdr* mutation checked for in the colony refers to the West-African

kdr mutation (i.e. *kdr*-W or L1041F), as the *kdr*-E (or L1041S, first evidenced in East-Africa) has not yet been reported in the area of Bama for *An. coluzzii* [31].

Cattle hosts

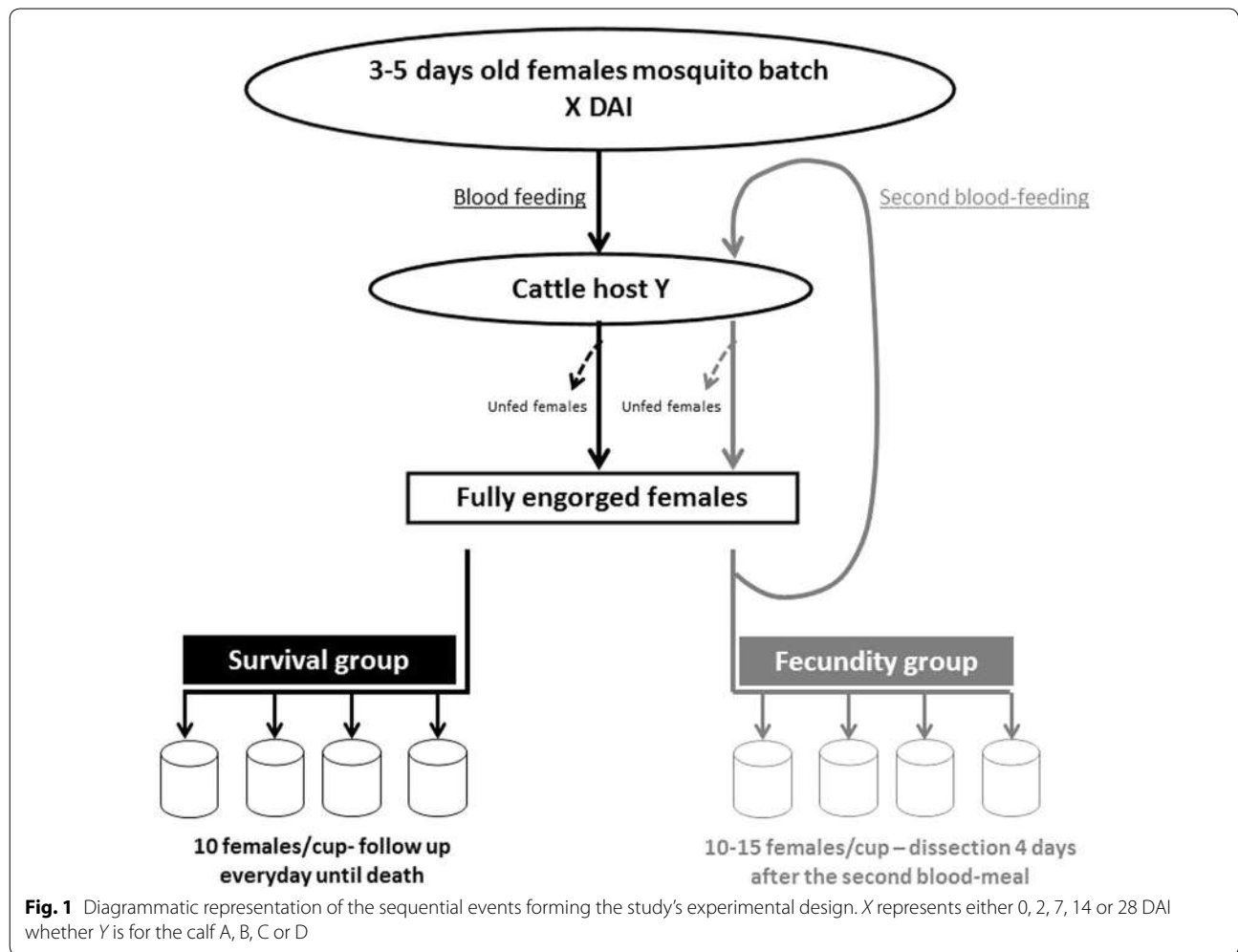
Four bull calves (mean weight = 91 ± 24 kg) of the local Metis breed (obtained from cross breedings between Fulani zebus and Baoulé bulls) were used as hosts for *Anopheles* blood feeding. Upon their arrival to the Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zones Subhumides (CIRDES) stable facilities, (i.e., 1 month before the start of experiments), the calves were systematically treated with therapeutic doses of aceturate diminazene and albendazole to, respectively, cure potential trypanosomiasis (endemic in this area) and gastrointestinal infestation with endoparasites, which could affect their well-being. During the experiment, calves were fed with a diet made of straw and cotton oil cake and provided with water ad libitum. They were maintained in the stable, protected by a net to avoid any insect disturbance, and checked every other day by a veterinarian to ensure their well-being.

Ivermectin treatment

Two calves were randomly chosen to receive a subcutaneous injection of ivermectin (IVOMECE D®) at the therapeutic dose of 0.2 mg/kg of body weight (treated calves, A and C), while the two other calves received no treatment (controls, B and D).

Blood feeding

Three to five days old mosquitoes were randomly introduced into 16 plastic cups covered with nets (n = 30 mosquitoes per cup). Four plastic cups were randomly assigned to each control and treated calf and disposed on the sides of the calves, where they were held using a rubber strap arranged around the animals' abdomen. Calves were restrained using ropes to avoid rough movements and scratching. Mosquitoes were allowed to feed for 15 min, after which only fully engorged females were transferred in maintaining cups or cages, for survival and fecundity evaluation, respectively (Fig. 1 for a diagrammatic representation of the experimental set-up). Blood feeding of mosquitoes occurred in six instances: once before treatment and at different times points after ivermectin treatment, taking into account previous experiments (Additional files 1 and 2), and already published plasmatic pharmacokinetics of the molecule in cattle [32]: i.e. at 2, 7, 14, 21, and 28 days after the injection (DAI). Different batches of mosquitoes were used for each blood-feeding episode. The percentage of blood-fed mosquitoes was similar between the seven batches (i.e. 95 %), for each treatment and each calf.



Life history traits of mosquitoes fed on treated and control cattle

Survival

Fully engorged females were randomly distributed, maintained in paper cups (cup volume was 455 cu). Four cups were used per calf with ten mosquitoes per cup (Fig. 1) and provided every day with cotton balls soaked in 2.5 % glucose solution. Mortality was recorded every day from the day of blood feeding until all mosquitoes died.

Reproduction

In *An. gambiae s.l.*, the first blood meal is often used to compensate nutritional deficiencies carried over from larval stages instead of developing ovarian follicles [33]. This was also observed in the IRSS' *An. coluzzii* colony, for which only a small proportion of females developed eggs after only one blood meal [34]. For this reason and in line with previous studies [35], the number of eggs produced after two consecutive

blood meals was considered as more representative of mosquito fecundity. Hence, 4 days after a first blood meal, female mosquitoes took a second blood meal on the same host than the first (Fig. 1). Dissections of the ovaries were performed 4 days afterwards, when the second blood meal was entirely digested. The second blood meal success was similar to the first (i.e. 90 %) and only females that had actually taken two blood meals were considered. Ovaries were extracted from the abdomen and dissected in a drop of Phosphate Buffered Saline (PBS) to release the eggs, which were counted under a binocular (40×, Leica S6D). The number of females carrying developed eggs (i.e., egg prevalence) and the number of mature eggs (i.e., Christopher stage V) developed by a female were considered as proxies of their fecundity [33]. As for survival experiments, for each mosquito lot (see above), fully engorged females were randomly distributed and maintained in paper cups (four cups per calf, ten to 15 mosquitoes per cage) until the dissection.

Effect of a sub-lethal dose of ivermectin on the sporogonic development of *Plasmodium falciparum*

Experimental infections of *An. coluzzii* females with *P. falciparum* gametocytes were processed by membrane feeding as previously described [36, 37]. Thick blood smears from 5–11 years old children from the village of Dandé (11°34'48" N, 4°33'36" W) were examined using light microscopy to identify gametocyte carriers. Gametocyte density was evaluated against 1000 white blood cells (WBC) and expressed per μl , assuming the canonical number of 8000 WBC/ μl of blood. A gametocyte carrier with 64 gametocytes/ μl was selected for the experiment. Five ml of venous blood were collected and distributed in each membrane feeder and maintained at 37 °C by circulating heated water. In nature, it is likely sequentially that a mosquito will absorb sub-lethal doses of ivermectin from a cattle host and, 2–4 days later, an infectious blood meal from a human host. For ethical considerations, only this “prophylactic” combination was tested (i.e. whether an ivermectin containing bloodmeal would protect the mosquito from a subsequent infection by *Plasmodium falciparum*), since other combinations (i.e. the ivermectin containing blood meal given the same day or 3–4 days after the infectious one (the later being the “therapeutic” combination)) would require potentially infectious mosquitoes to be transported from IRSS to CIRDES. At 28 DAI, batches of mosquitoes that had already taken their first blood meal on treated and control cattle 4 days before (see above for blood feeding processing) were infected. For that, mosquitoes were disposed under the feeders and allowed to feed for 30 min. Only fully engorged mosquitoes were followed up for parasite development, and for this purpose, were provided ad libitum 5 % glucose solution for 8 days after membrane feeding. Mosquito midguts were then dissected in a drop of 0.5 % mercurochrome, mounted on a slide, covered with a coverslip and examined under a light microscope (20 \times , Leica ICC 50) to detect and count the oocysts.

Statistics

All statistical analysis were performed using the software R version 3.1.3 GUI 1.65.

Mosquito survival

Kaplan–Meier survival estimates were calculated to investigate whether females’ longevities were affected by a blood meal taken on cattle at different DAI of a therapeutic dose of ivermectin. Uncensored data were used, as all mosquitoes were dead by the end of the experiment. The effects of the ivermectin treatment, the time after injection and their interaction were further tested using Cox proportional hazards model. Because the blood from different cattle may represent different nutritive values,

the effect of cattle on female survival was evaluated for each DAI and within each treatment status (i.e., ivermectin-treated or control). This cattle effect on mosquito survival was also assessed for the four cattle before the ivermectin was injected (0 DAI) in order to ensure that any difference in mosquito survival was due, at least in part, to the ivermectin treatment.

Mosquito reproduction

First, the effect of the ivermectin treatment, the DAI and their interaction on the probability that a female will become gravid was examined by fitting logistic regression models (generalized linear modelling with binomial errors and logit link function). Second, only females that were gravid were subsequently considered and regression models (generalized linear modelling with quasipoisson errors and logit link function) were used to examine the effect of ivermectin treatment, the DAI and their interaction on the number of developed eggs. Cattle effect was also examined as described above.

Plasmodium sporogonic development

The impact of sub-lethal dose of ivermectin within a first blood meal taken at 28 DAI on the infectivity of *P. falciparum* parasites absorbed during a second blood meal (i.e., infection prevalence) was tested using generalized linear models with binomial errors and logit link function. Only females that were infected were subsequently considered to examine whether the first blood meal had an impact on the number of oocysts developed by infected females (i.e., infection intensity) through generalized linear models (quasipoisson errors and logit function). As for survival and fecundity, the cattle effect has been examined as previously described.

For all the analysis, stepwise simplification of models was performed where non-significant terms were sequentially removed to produce the minimal model with the best explanatory power [38]. When needed, analysis were followed by post hoc tests procedures (multcomp package) to compare the levels of significant factors. Before the analysis, the constancy of variance between datasets was checked using the Fligner–Killeen test. When needed, a variable transformation was performed to meet this constancy.

Results

Survival

Experiments investigating the toxic effect of a blood meal taken from ivermectin-treated cattle included 960 females followed after their blood meal and until their death. For the females fed on cattle before injection of ivermectin, the Cox proportional hazards model revealed no significant effect of cattle identity

on survival ($\chi^2_3 = 1.42, p = 0.69$), which was on average 17.77 ± 1.52 days, 19.80 ± 0.88 , 20.14 ± 1.22 , and 21.32 ± 0.73 days. Analysis of mosquito survival after ivermectin injection showed a significant effect of the treatment, DAI and the interaction between these two factors (Table 1). This significant treatment \times DAI interaction indicates a decrease in the negative impact of ivermectin on mosquito survival overtime (Fig. 2). The reduction of mosquito survival is significant and equal to 86.7 % at 2 DAI, 82.63 % at 7 DAI, and 54.35 % at 21 DAI. At 28 DAI, the mean survival is reduced by 23.48 %, but this tendency is only marginally significant (Cox proportional hazards models for 28 DAI, treatment effect, $\chi^2_1 = 3.76, p = 0.052$). At 15 DAI, lower than usual mean survivals of 5.90 ± 1.52 and 12.75 ± 2.80 days were observed for the mosquitoes fed on, respectively, the control calves B and D, which led to underestimates of the ivermectin effect at this time period. In an additional experiment, mosquitoes fed on control calves at 15 DAI had a usual mean survival of 16.6 ± 3.85 days (Additional file 2), allowing to estimate that feeding on treated calves 15 days after injection leads to a 77 % reduction in average of the mean survival time. For the mosquitoes fed both at 21 DAI and 28 DAI, significant differences appear between the batches fed on the treated calves A and C (mean survival of females fed on cattle A and C at 21 DAI = 5.34 ± 0.78 and 10.33 ± 0.95 , respectively, Cox proportional hazards models, cattle effect for this sub-set, $\chi^2_1 = 11.35, p < 0.001$; mean survival of females fed on cattle A and C at 28 DAI = 5.63 ± 0.55 and 15.03 ± 1.75 , respectively, Cox proportional hazards models, cattle effect for this sub-set, $\chi^2_1 = 25.53, p < 0.001$). At 28 DAI, the effect of the treated cattle C on mosquito survival was no more different from the controls (comparison of mean survival of mosquitoes fed on treated calf C and control calves B and D, $p > 0.5$ for both comparisons), but differed from cattle A ($p < 0.001$). As complementary information to better apprehend the consequences of ivermectin treatment in terms of reduction of vectors densities or sporogony, we also considered the time to 100 % mortality for each DAI. At 2 DAI, 100 % of the mosquitoes would die in 2.87 ± 0.35 days, in

4 ± 0.53 , 5.5 ± 3.07 , 17 ± 4.24 and in 19.5 ± 11.61 days at seven, 15, 21 and 28 DAI, respectively. By comparison, 100 % mortality for the control treatment was achieved in 32.12 ± 5.74 , 24.37 ± 3.99 , 24 ± 4.45 , 27.87 ± 5.59 and 27.12 ± 5.40 at two, seven, 15, 21 and 28 DAI, respectively. For the 15 DAI time point, values from supplemental data were taken (see Additional files 1 and 2).

The effect of an additional blood meal taken on treated cattle was further investigated for its impact on the survival of vector mosquitoes (Additional files 1, 2 and 3). The significant treatment \times DAI \times number of blood meals is due to the fact that the impact of a second blood meal varies with the time elapsed since ivermectin injection: while it had no effect at one, seven and 15 DAI, it further decreased mosquito survival at 21 DAI and was beneficial (i.e., allows a higher survival than a single blood meal) at 31 and 38 DAI (Additional file 3).

Fecundity

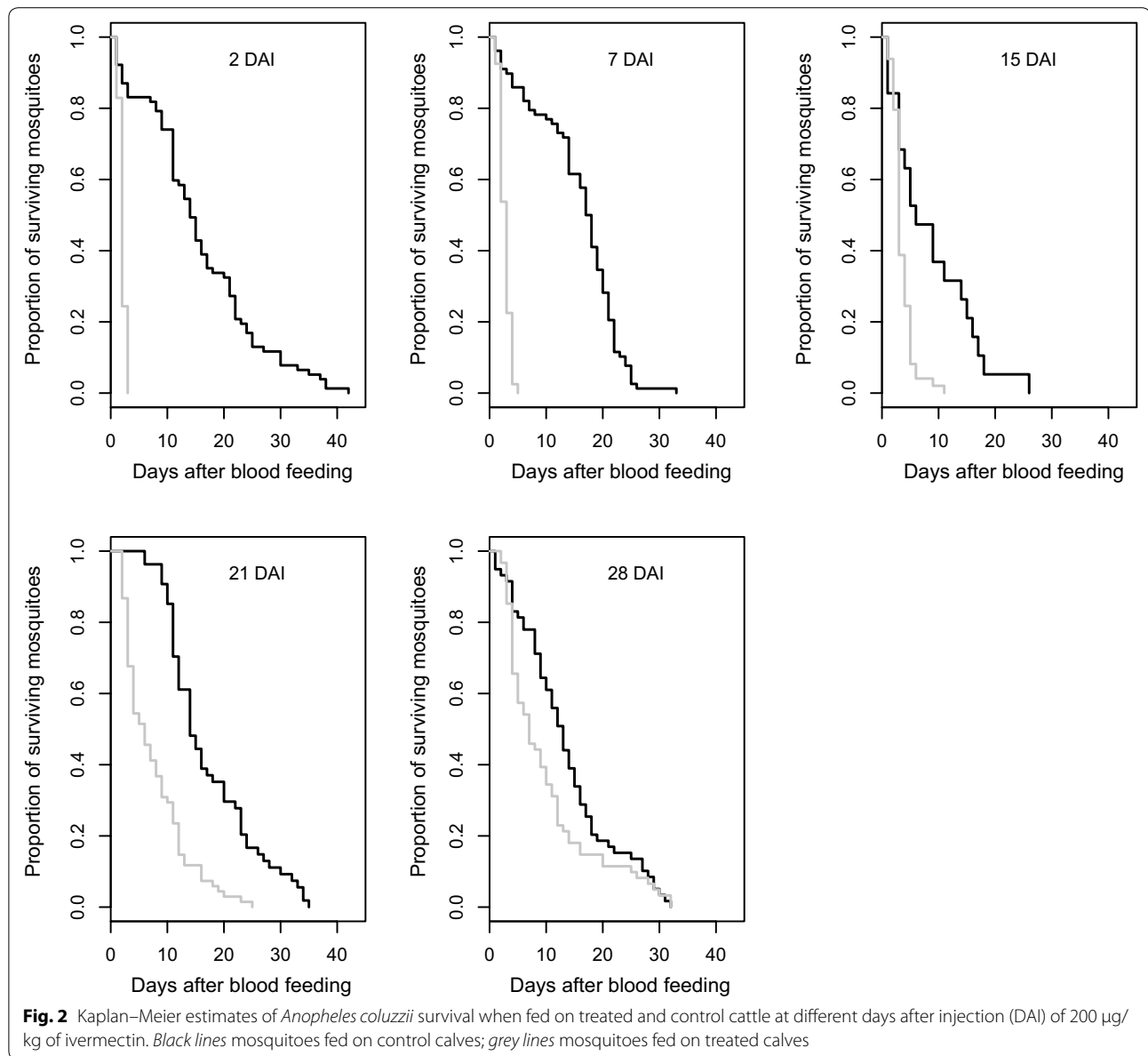
Five hundred and forty-five mosquito females were analysed to investigate the effect of ivermectin treatment on their fecundity. The number of females that did not develop eggs was very low for females fed on cattle before ivermectin injection (i.e., three out of 92 females), but because these females were all from the batch fed on cattle A, a significant effect of the cattle host on female egg prevalence was found ($\chi^2_3 = 10.93, p = 0.012$). However, the analysis further showed that the cattle host blood did not impact the number of eggs developed by the females (calf A 69.85 ± 11.13 , calf B 89.73 ± 6.54 , calf C 85.35 ± 7.46 , calf D 96.37 ± 7.61 , $\chi^2_3 = 18.7, p = 0.70$). After ivermectin injection, only females fed on cattle at 7, 21 and 28 DAI could be analysed due to the absence of surviving mosquitoes 4 days after the second blood feeding in the other mosquito batches. A significant influence of the treatment ($\chi^2_1 = 14.92, p < 0.001$), the DAI ($\chi^2_1 = 45.40, p < 0.001$) and their interaction ($\chi^2_1 = 20.15, p < 0.001$) was found on the probability of a female mosquito to become gravid. The treatment \times DAI interaction was due to the fact that treated females fed at 7 DAI on treated cattle had a significant, lower probability of becoming gravid by comparison to their counterparts fed on control cattle (10 % (n = 10 females) vs. 89 % (n = 88 females), $\chi^2_1 = 28.69, p < 0.001$), whereas the treatment effect was non-significant or marginally significant for mosquitoes fed at 21 and 28 DAI ($\chi^2_1 = 1.77, p = 0.18$ and $\chi^2_1 = 0.66, p = 0.064$, respectively). The effects of ivermectin treatment, the DAI and their interaction on the number of eggs developed by gravid females were further investigated by considering the subset of females that had developed at least one egg. Because a single female developed her eggs in the batch fed on treated cattle at 7 DAI, this batch was excluded from the analysis.

Table 1 Effects of ivermectin treatment, the DAI and their interaction on female *An. coluzzii* survival

Source	DF	χ^2	p value
Treatment	1	211.55	<0.0001*
DAI	4	107.97	<0.0001*
Treatment \times DAI	4	167.87	<0.0001*

DAI days after injection

* Significant effect of parameters or interactions ($p < 0.05$)



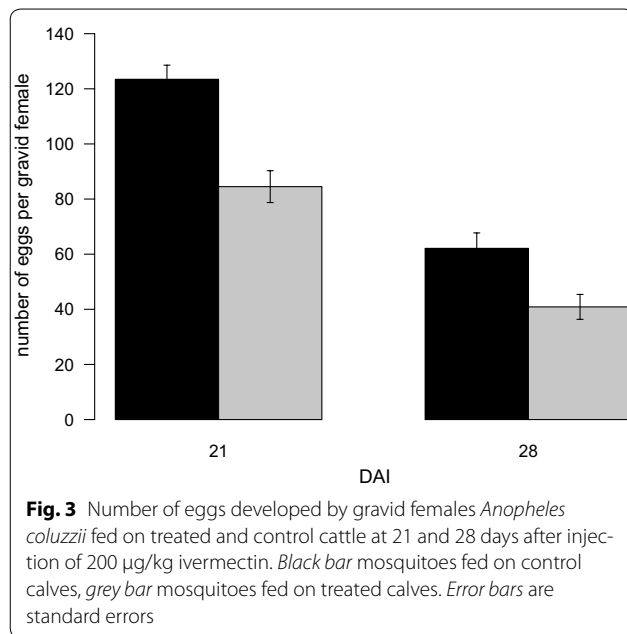
Hence, the analysis was performed on the 21 DAI and 28 DAI batches only after a square-root transformation of the number of eggs per female. The model revealed no significant interaction between the treatment and the DAI, which was removed ($\chi^2_1 = 1.49, p = 0.37$). The minimal model (Table 2) revealed a significant effect of the treatment and the DAI on the number of eggs developed by *An. coluzzii* females. The DAI effect is due to the variability between the batches for the mean number of eggs developed by the females, whether the treatment effect remains constant between 21 and 28 DAI (33 and 36 % reduction of the total number of eggs, respectively,

Fig. 3). For the subset of mosquitoes fed on control or treated calves, there was no cattle effect for the number of gravid females, or for the number of eggs developed by gravid females (cattle effect for egg prevalence in control

Table 2 Effects of ivermectin treatment and of the DAI on the eggs number of *An. coluzzii*

Source	DF	χ^2	p value
Treatment	1	48.57	<0.001*
DAI	1	142.77	<0.001*

* Significant effect of parameters or interactions ($p < 0.05$)



and treated sub-sets, respectively: $\chi^2_1 = 0.044, p = 0.50$; $\chi^2_1 = 0.28, p = 0.31$; cattle effect for the number of developed eggs in control and treated sub-sets, respectively: $\chi^2_1 = 32.47, p = 0.18$; $\chi^2_1 = 38.53, p = 0.12$.

Infection with *Plasmodium falciparum*

The experiment included 168 females that had already taken a first blood meal on cattle hosts either treated or non-treated at 28 DAI, and maintained with 5 % glucose solution after their infectious blood meal. Generalized linear models did not reveal any significant impact of the first ivermectin-rich blood meal on the prevalence or intensity of *An. coluzzii* infection by *P. falciparum* parasites (Table 3). Indeed, females previously fed on control or treated cattle had equivalent infection prevalence and intensity (respectively, 0.73 ± 0.04 and 3.72 ± 0.38 for females fed on controls, and 0.73 ± 0.05 and 4.07 ± 0.56 for females fed on treated cattle).

Discussion

Therapeutic doses of ivermectin injected to local Burkinabé Metis cattle rendered blood meals toxic to sympatric *An. coluzzii* females and reduced both survivorship

Table 3 Effects of sub-lethal dose of ivermectin on the *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in *An. coluzzii*

Source	DF	χ^2	p value
Treatment on infection prevalence	1	0.0003	0.98
Treatment on infection intensity	1	1.33	0.24

and fecundity of the mosquitoes feeding on treated animals for up to 28 days. For the 2 weeks following the treatment, mean survival time of mosquitoes that fed on treated cattle was two to 3.5 days (corresponding to a time to 100 % mortality of 3–5.5 days), meaning that the great majority would die before being able to resume a new gonotrophic cycle by biting a host, achieve sporogony, and eventually transmit malaria parasites. Mosquitocidal effect of ivermectin was not complete the third and fourth week after treatment and a proportion of mosquitoes was able to survive. Yet, 100 % mortality was achieved in 17 and 19 days, a timeframe just long enough to become infectious and potentially transmit the parasite only once (considering that the first blood-meal was infectious and considering a sporogony lasting 12 days in average). Using the same scenario, control mosquitoes would survive for 27 days in average, and would be infectious through at least three gonotrophic cycles. Moreover, the fecundity of mosquitoes fed at 21 and 28 DAI was significantly reduced by 33 and 20 %, respectively. Mosquitoes weren't allowed to lay their eggs nor the hatching rate and larvae survival followed, which represent a limitation of this study, probably leading to an under-estimation of the ivermectin treatments effects on mosquito's fitness. Considering that a mosquito becomes infectious on average 12 days after gametocyte ingestion [39], corrected mortalities [40], i.e., $100 \times (\% \text{ dead mosquitoes fed on treated cattle} - \% \text{ of dead mosquitoes fed on control cattle}) / (100 - \% \text{ dead mosquitoes fed on control cattle})$ were 75 and 45 % at 21 and 28 days post injection, respectively. For up to 1 month, more than half of the mosquitoes would die before being able to transmit malaria parasites if they were blood fed on treated cattle before or the same day as the infectious blood meal. Moreover, a second ivermectin blood meal at sub-lethal concentrations further increased the mortality, so much that cumulative mosquito mortality was 100 % by day 12 after the second meal.

As previously reported [5, 14, 15, 41], the present study confirms that ivermectin reduces both the life span and fecundity of important and dominant malaria vectors of sub-Saharan Africa feeding on ivermectin-treated hosts. The mosquitocidal effect vanishes at different rates between calves, suggesting a fair variability in the kinetic and dynamic processes of ivermectin distribution, metabolism or clearance, which may impact on the compound availability in peripheral blood vessels. In a recent study, a greater availability of ivermectin was reported in female human volunteers, which has been associated with the greater body mass indices of female by comparison to male participants [15]. Although ivermectin is the less lipophilic of the macrolactones used as antiparasitic compounds, it nevertheless concentrates particularly in

adipose tissues, where the limited vascularization and slow turnover rate of fat prolong the residence of the drug in the peripheral blood [32] and, therefore, its availability to vector mosquitoes. The “slow-release reservoir effect” [15] of body fat might also explain why the mosquitocidal effect of ivermectin could last more than a month in this study while in others, this effect disappeared more quickly and is incomplete even shortly after ivermectin administration [5, 15]. Subcutaneous injection distributes a much greater proportion of the ivermectin into lipid reservoirs than oral route and increases its residence time [42]. Moreover, ivermectin maximum concentration (C_{max}) is much lower when the drug is administered by oral route [43], which might further explain the more sustained mosquitocidal effect presented here, but also the greater, complete toxicity of the blood meals taken by *An. coluzzii* on treated cattle, for up to 2 weeks after ivermectin subcutaneous injection. Interestingly, at the sub-lethal doses imbibed by mosquitoes at 31 and 37 days, the deleterious effects of ivermectin on survival diminished after a second blood meal 4 days later, which obviously contained ivermectin at less concentration than the first [10]. A second blood meal that does not contain or contains less ivermectin than the first has been also shown to mitigate the effect of the drug on fecundity and hatch rate in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* [44] and on survival in *An. gambiae s.s* [10]. These cumulative effects must be further examined, considering malaria vectors proclivities for frequent blood feeding in the field [45].

As opposed to in vitro studies [16], the present study failed to demonstrate any transmission blocking properties of sub-lethal concentrations of ivermectin when the ivermectin blood meal was ingested 3 days before an infectious blood meal, but yet at a time post injection where the drug concentration remains toxic enough to impact mosquito survival and fecundity. However, this is in line with recent in situ field studies where ivermectin does not impact gametocyte infectivity [15]. Since only a single DAI (28 days) has been tested on infection prevalence and intensity at the oocyst stage, the present study cannot rule out the possibility that ivermectin has sporontocidal effects. More experiments are needed using different sub-lethal doses, and have to be more adequately designed to study the impact of ivermectin when imbibed with a blood meal at different times after or before the infectious blood meal. However, the present results demonstrate that the stress and corresponding fitness costs induced by sub-lethal doses of the drug did not positively impact infection output, which could have had harmful and counterproductive consequences in terms of transmission, jeopardizing further use of ivermectin to control vector mosquito populations.

The integrative control measure adjunction to existing tools offered by ivermectin has a potential for the management of insecticide resistance since the mode of action of the drug and insecticides currently used for vector control are different. However, despite crucial importance, only a few studies have addressed the question of potential cross-resistance to ivermectin in insecticide-resistant vector mosquitoes. Deus et al. [46] found an increased tolerance to ivermectin imbibed in a blood meal in different *Ae. aegypti* strains resistant to pyrethroid insecticides. For *An. gambiae s.l.*, ivermectin decreases mosquito life span of *Anopheles* in different areas of Burkina Faso [14, 15] where the frequency of insecticide target-site mutations, including knock-down resistance (kdr) and insensitive acetylcholinesterase (Ace-1R) alleles, has been regularly monitored and where detoxifying enzymes also contribute to the diversity of resistant phenotypes observed in the field [47, 48]. Thanks to the presence of one out of three mosquitoes carrying the mutated *kdr* allele in the *An. coluzzii* colony used here, this study suggests that no cross-resistance to ivermectin exists in *kdr* carriers, at least at the plasmatic concentrations where mosquitocidal effect is complete. However, proper phenotypic characterization of mutated *kdr* carriers using bioassays would have been needed to actually check the adequacy between the genotype and resistance phenotype. Hence, more studies are definitely needed to decipher this question, knowing the great diversity and complexity of physiological mechanisms allowing wild *An. gambiae s.l.* populations to resist most, if not all, of the insecticide classes used to date as vector control tools [31, 47].

Ivermectin is of capital importance for the control of many parasitic diseases in animals and humans and resistance appearance in endo- or ectoparasitic fauna classically targeted by ivermectin treatments would represent a public health disaster. Ivermectin resistance was reported in small ruminants and cattle nematodes after frequent host treatment [43–45, 49]. Hence, if the “One-Health” approach was to be implemented as an alternative method for the control of malaria vectors, a careful monitoring of potential resistance appearance must be undertaken. Researches must also be prompted to apprehend the risk of an emerging resistance to ivermectin in *Anopheles* field populations. Indeed, with a much longer mosquitocidal and anti-fecundity effect in cattle serum, longer insecticidal pressure from mosquitocidal cattle blood could select for ivermectin resistance in *Anopheles*. Recent attempts have been made to better understand the IVM-mosquitoes interactions, where canonical detoxification mechanisms seem to be only marginally involved in the mosquito’s response to ivermectin ingestion, whereas non-canonical pathways are highlighted,

notably those involving Nieman–Pick type C-2 family genes [50]. Moreover, the recent discovery of ivermectin sensitive and insensitive glutamate-gated chloride channels generated through alternative splicing, questions this mechanism as the potential target of selection for ivermectin resistance in the field [17]. These findings are important in the sense that they clearly emphasize the complexity of IVM-mosquitoes interactions, which need to be unravelled to better evaluate the risks of emergence of ivermectin resistance in the mosquito populations targeted by ivermectin treatments. Similarly, treating cattle might select for *Anopheles* species/populations with altered behavior toward increased anthropophagy. Hence, the proposed approach would stand only if integrative measures are taken where treatments to humans and cattle and their potential consequences are considered concomitantly. Ivermectin resistance in human or animal targeted parasites and in *Anopheles* populations are dark shadows in the board of “One-Health” MDAs, and facing these caveats even before they become an issue is the only way to leave this promising approach a reality.

Although subcutaneous administration of ivermectin generates lower faeces concentrations of the product when compared to oral or pour-on formulations [32], non-targeted coprophagic fauna could especially be at risk if MDAs to livestock were implemented [51]. Dung pats are widely used for agricultural purposes in rural Burkina Faso, as everywhere in sub-Saharan rural Africa. Coprophagic fauna accelerate the degradation of dung pats and maintain soil productivity by enhancing the activity of the micro-organisms therein that participate in the mineralization of animal waste. Even sub-lethal doses of ivermectin induce an acute toxicity, altering the sensory and locomotor capacities of dung beetles, and preventing their basic biological activities, ultimately leading to their premature death [52]. However, knowing that sensitivity to ivermectin may vary among species of the same taxa [53], further studies are needed to properly assess ivermectin sensitivity of the coprophagic fauna present in the areas targeted for the “One-health approach”. Such studies are needed so the health benefits to humans and animals of integrated MDAs will not be hampered by potentially high economic losses, which might mitigate the acceptance of this approach by communities.

Conclusion

This study indicates a sustained, complete effect of ivermectin on the survival of recently colonized *An. coluzzii* females after blood feeding on local calves treated subcutaneously with the recommended therapeutic dose. Moreover, effects of sub-lethal doses are observed on

mosquito fecundity, which further increases the impact of ivermectin administered to cattle on total vector densities. This effect might be even larger than reported here due to the known deleterious effects of sub-lethal doses of ivermectin on mosquito physiology and behaviour, hampering mosquito survival in the field. Further, this study demonstrates the potential of integrated MDAs of ivermectin to both human and peridomestic cattle to target anthropophilic, endophagic, but also exophilic and zoophagic mosquitoes in areas where both physiological and behavioural resistances are widespread, building reservoirs of residual malaria transmission.

At the approved dose of 200 µg/kg used by medical and veterinary services, current oral formulations can only maintain efficient mosquitocidal concentrations for approximately 2–4 days [15], while injected formulations to cattle do so for up to 2 weeks. Interrupting malaria transmission would require a more prolonged mosquitocidal effect [54], which could be obtained either through the distribution of multiple doses of ivermectin, or through the administration of a slow-release formulation, for which research work is on-going [55].

Additional files

Additional file 1. Materials and Method. Survival of *Anopheles coluzzii* females fed once or twice on control or treated cattle with the therapeutic dose of 0.2 mg/kg of Ivermectin.

Additional file 2. Mean survival time of *Anopheles coluzzii* fed once or twice on treated and control cattle at different days after injection (DAI) of 200 µg/kg ivermectin.

Additional file 3. Analysis of the effects of ivermectin treatment, the day after injection (DAI), the number of blood meals, and their interaction on female *An. coluzzii*'s survival using the Cox Proportional Hazards model.

Abbreviations

CIRDES: Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zones Subhumides; DAI: days after injection of ivermectin; IRS: indoor residual spraying; IRSS: Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso (Burkina Faso); LLIN: long-lasting insecticidal nets; MDA: mass drug administration; PBS: phosphate buffered saline; WBC: white blood cells; Kdr: knock down resistance.

Authors' contributions

All authors participated in the project's elaboration and the design of the study. KM, PSH and PS conceived the study. KM, PSH, LT, and YS elaborated the protocols. PSH did the survival and reproduction experiments with the help of HFS. PSH, HFS, LT, and YS did the experimental infection experiments. PSH and KM performed the statistical analysis and drafted the paper. All authors amended the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en Zone Subhumide, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ² Ministère des Ressources Animales/Campagne Panafricaine d'éradication de la mouche tsé-tsé et des trypanosomes, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ³ Direction Régionale de l'Ouest de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ⁴ MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), UMR IRD 224, CNRS 5290, Université de Montpellier, 911 Av. Agropolis, Montpellier, France. ⁵ Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso,

Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ⁶ UMR INTERTRYP IRD-CIRAD, TA A 17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France.

Acknowledgements

We thank MERIAL for providing free of charge veterinarian ivermectin doses (IVOMEC D). We are grateful to the staff of LAMIVECT, PATTEC-Burkina, IRD, IRSS, CIRDES for the financial and technical supports. We are grateful to the dedicated technicians of these organizations for their precious contributions, and in particular, we thank Boly Saïdou, Bazié Bali J, Hien Dombagniro R, Nikiema Boubakar, Tapsoba Salif, Tapsoba Janvier B, Toé Ange I, and Zougrana Sebastien. We also thank two anonymous reviewers for their constructive comments, which improved our manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 September 2015 Accepted: 19 November 2015

Published online: 10 December 2015

References

- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control. *Trends Parasitol.* 2011;27:91–8.
- Yohannes M, Boelee E. Early biting rhythm in the Afro-tropical vector of malaria, *Anopheles arabiensis*, and challenges for its control in Ethiopia. *Med Vet Entomol.* 2012;26:103–5.
- Sougoufara S, Diedhiou SM, Doucoure S, Diagne N, Sembene PM, Harry M, et al. Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2014;13:125.
- Killeen GF. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar J.* 2014;13:330.
- Chaccour C, Kobylinsky K, Bassat Q, Boussemma T, Drakeley C, Alonso P, et al. Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malar J.* 2013;12:153.
- Chaccour CJ, Rabinovich NR, Slater H, Canavati SE, Bousema T, Lacerda M, ter Kuile F, Drakeley C, Bassat Q, Foy BD, Kobylinski K. Establishment of the Ivermectin Research for Malaria Elimination Network: updating the research agenda. *Malar J.* 2015;14:243.
- Shoope WL, Soll MD. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones. In: Wercruysse J, Rew RS, editors. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy.* CAB Intern; 2002. p. 1–29.
- Amazigo U. The African Programme for Onchocerciasis Control (APOC). *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102(Suppl 1):19–22.
- Ottesen EA, Hooper PJ, Bradley M, Biswas G. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e317.
- Kobylinski KC, Deus KM, Butters MP, Hongyu T, Gray M, Da Silva IM, et al. The effect of oral anthelmintics on the survivorship and re-feeding frequency of anthropophilic mosquito disease vectors. *Acta Trop.* 2010;116:119–26.
- Kobylinski KC, Sylla M, Chapman PL, Sarr MD, Foy BD. Ivermectin mass drug administration to humans disrupts malaria parasite transmission in Senegalese villages. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:3–5.
- Sylla M, Kobylinski KC, Gray M, Chapman PL, Sarr MD, Rasgon JL, et al. Mass drug administration of ivermectin in south-eastern Senegal reduces the survivorship of wild-caught, blood fed malaria vectors. *Malar J.* 2010;9:365.
- Foy BD, Kobylinski DKC, Da Silva IM, Rasgon JL, Sylla M. Endectocides for malaria control. *Trends Parasitol.* 2011;27:423–8.
- Alout H, Krajacich BJ, Meyers JJ, Grubaugh ND, Brackney DE, Kobylinski KC, et al. Evaluation of ivermectin mass drug administration for malaria transmission control across different West African environments. *Malar J.* 2014;13:417.
- Ouedraogo A, Bastiaens G, Tiono A, Guelbeogo W, Kobylinski K, Ouedraogo A, et al. Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: a double-blind, randomized, clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60:357–65.
- Kobylinski KC, Foy BD, Richardson JH. Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2012;11:381.
- Meyers JJ, Gray M, Kuklinski W, Johnson LB, Snow CD, Black WC, et al. Characterization of the target of ivermectin, the glutamate-gated chloride channel, from *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol.* 2015;218:1478–86.
- Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Pares PS, Van der Ploeg LHT, Schaeffer JM, et al. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1994;371:707–11.
- Cully DF, Pares PS, Liu KK, Schaeffer JM, Arena JP. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *J Biol Chem.* 1996;271:20187–91.
- Ndiath MO, Mazonot C, Sokhna C, Trape JF. How the malaria vector *Anopheles gambiae* adapts to the use of insecticide-treated nets by African populations. *PLoS One.* 2014;9:e97700.
- Lefèvre T, Gouagna LC, Dabiré KR, Elguero E, Fontenille D, Renaud F, et al. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s.s. when humans are not readily accessible. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:1023–9.
- Geary TG. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 2005;21:1985–7.
- Pooda SH, Mouline K, De Meeüs T, Bengaly Z, Solano P. Decrease in survival and fecundity of *Glossina palpalis gambiensis* vanderplank 1949 (Diptera: Glossinidae) fed on cattle treated with single doses of ivermectin. *Parasites.* 2013;6:1–6.
- INSD. Recensement general de la population et de l'habitation de 2006 Juillet 2008; 2008.
- Naz S, Maqbool A, Ahmad M-D, Anjum AA, Zaman S. Efficacy of ivermectin for control of zoophilic malaria vectors in Pakistan. *Pak J Zool.* 2013;45:1585–91.
- Poché RM, Burruss D, Polyakova L, Poché DM, Garlapati RB. Treatment of livestock with systemic insecticides for control of *Anopheles arabiensis* in western Kenya. *Malar J.* 2015;14:351.
- Fritz ML, Siegert PY, Walker ED, Bayoh MNI, Vulule JRI. Toxicity of blood-meals from ivermectin-treated cattle to *Anopheles gambiae* s.l. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009;103:539–47.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008;7:163.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998;7:179–84.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, et al. Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature.* 2003;423:136–7.
- Namountougou M, Diabate A, Etang J, Bass C, Sawadogo SP, Gnankinie O, et al. First report of the L1014S kdr mutation in wild populations of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 2013;125:123–7.
- Hennesy D, Alvinerie M. Pharmacokinetics of macrocyclic lactones: conventional wisdom and news paradigms. In: Wercruysse J, Rew R, editors. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy.* New York: CAB; 2002. p. 97–121.
- Fernandes L, Briegel H. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol.* 2005;30:11–26.
- Mouline K, Mamai W, Agnew P, Tchoufienet M, Brengues C, Dabire R, et al. Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol.* 2012;26:447–54.
- Sangare I, Michalakis Y, Yameogo B, Dabire R, Morlais I, Cohuet A. Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J.* 2013;12:2.
- Alout H, Ndam TN, Sandeu MM, Djegbe I, Chandre F, Dabire RK, Djogbenou LS, Corbel V, Cohuet A. Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One.* 2013;8:e63849.
- Vantaux A, Dabire KR, Cohuet A, Lefevre T. A heavy legacy: offspring of malaria-infected mosquitoes show reduced disease resistance. *Malar J.* 2014;13:442.
- Crawley M. The R book, vol. 103. Silwood Park: Imperial College London; 2007.

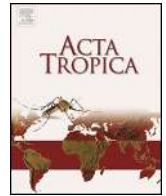
39. Carnevale P, Robert V. *Les Anophèles: Biologie*. Marseille: Transmission Du Plasmodium et Lutte Antivectorielle. IRD; 2009.
40. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Am Mosq Control Assoc*. 1987;3:302–3.
41. Derua YA, Kisinza WN, Simonsen PE. Differential effect of human ivermectin treatment on blood feeding *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Parasit Vectors*. 2015;8:130.
42. Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G, Alvarez L, Sanchez S, Sutra JF, et al. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther*. 1997;20:91–9.
43. Alvinerie M, Escudero E, Sutra JF, Eeckhoutte C, Galtier P. The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. *Vet Res*. 1998;29:113–8.
44. Tesh RB, Guzman H. Mortality and infertility in adult mosquitoes after the ingestion of blood containing ivermectin. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43:229–33.
45. Scott TW, Githeko AK, Fleisher A, Harrington LC, Yan G. DNA profiling of human blood in anophelines from lowland and highland sites in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:231–7.
46. Deus KM, Saavedra-Rodriguez K, Butters MP, Black WC, Foy BD. The effect of ivermectin in seven stains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) including a genetically diverse laboratory strain and three permethrin resistant strains. *J Med Entomol*. 2012;49:356–63.
47. Namountougou M, Simard F, Baldet T, Diabate A, Ouedraogo JB, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso, West Africa. *PLoS One*. 2012;9:e48412.
48. Jones CM, Toe HK, Sanou A, Namountougou M, Hughes A, Diabate A, et al. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS One*. 2012;7:e45995.
49. Geurden T, Chartier C, Fanke J, di Regalbono AF, Traversa D, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2015;5:163–71.
50. Seaman J, Alout H, Meyers JI, Stenglein MD, Dabiré RK, Lozano-Fuentes S, et al. Age and prior blood feeding of *Anopheles gambiae* influences their susceptibility and gene expression patterns to ivermectin-containing blood meals. *BMC Genom*. 2015;16:797.
51. Lumaret J-P, Errouissi F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet Res*. 2002;33:547–62.
52. Verdú JR, Cortez V, Ortiz AJ, González-Rodríguez E, Martínez-Pinna J, Lumaret J-P, et al. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Sci Rep*. 2015;5:13912.
53. Puniamoorthy N, Schäfer MA, Römbke J, Meier R, Blanckenhorn WU. Ivermectin sensitivity is an ancient trait affecting all ecdysozoa but shows phylogenetic clustering among sepsid flies. *Evol Appl*. 2014;7:548–54.
54. Slater HC, Walker PG, Bousema T, Okell LC, Ghani AC. The potential impact of adding ivermectin to a mass treatment intervention to reduce malaria transmission: a modelling study. *J Infect Dis*. 2014;210:1972–80.
55. Chaccour C, Barrio Ál, Royo AGG, Urbistondo DM, Slater H, Hammann F, Del Pozo JL. Screening for an ivermectin slow-release formulation suitable for malaria vector control. *Malar J*. 2015;14:102.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso city, Burkina Faso, West Africa

K.R. Dabiré^{a,*}, P.S. Sawadogo^a, D.F. Hien^a, N.S. Bimbilé-Somda^a, D.D. Soma^a, A. Millogo^a, T. Baldet^b, L.-C. Gouagna^c, F. Simard^d, T. Lefèvre^{a,e}, A. Diabaté^a, R.S. Lees^f, J. Gilles^f

^a IRSS/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

^b Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France

^c IRD/UR016-CRVOI, 2 rue Maxime Rivière 97490, Sainte Clotilde, Ile de la Réunion, France

^d IRD-UMR 224-MIVEGEC, Montpellier, France

^e MIVEGEC, UMR IRD 224-CNRS 5290-Universités Montpellier, 1 & 2 Centre IRD, Montpellier, France

^f Insect Pest Control Laboratory, FAO/IAEA, A2444 Seibersdorf, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2013

Received in revised form 8 September 2013

Accepted 14 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Swarms

An. arabiensis

Urban area

Bobo-Dioulasso

Burkina Faso

ABSTRACT

The swarming behaviour of natural populations of *Anopheles arabiensis* was investigated by conducting transect surveys on 10 consecutive days, around dusk, from March to April and from September to October 2012 in Dioulassoba, a district of Bobo-Dioulasso city in Burkina Faso (West Africa). Swarms were observed outside, around identified larval breeding sites on the banks of the Houet River, as well as in the open-air courtyards found at the centre of many homes in the region. Swarms were found to occur in open sunlit spaces, mostly located above physical or visual cues somehow visually distinct from the surrounding area. Overall 67 and 78 swarms were observed, respectively, during the dry season (March–April) and the rainy season (September–October) of 2012, between 1.5 and 4.5 m above the ground at the centre. 964 mosquitoes were collected and analysed from dry season swarms, of which most were male, and all were *An. arabiensis*, as were the few resting mosquitoes collected indoors. Larvae collected from breeding sites found on the banks of the Houet River mostly consisted of *An. arabiensis* and only a minority of *Anopheles coluzzii* (formerly identified as *An. gambiae* M form). Of 1694 mosquitoes analysed from 78 swarms in the rainy season collections, a few *An. gambiae* (formerly known as *An. gambiae* S form) males were identified, and the remainders were *An. arabiensis*. The majority of larvae collected during the wet season from the same breeding sites were identified as *An. arabiensis* followed by *An. coluzzii* and *An. gambiae*. The same pattern of species composition was observed in resting mosquitoes, though the proportion of *An. arabiensis* was less overwhelming. These data support the conclusion that *An. arabiensis* is the most prevalent species in this area, though the difference in species composition when using different population sampling techniques is noteworthy. Further studies are required for more detailed investigations of male dispersal, feeding behaviour and mating patterns in this urban setting.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the less humid countries of tropical Africa, *Anopheles arabiensis* Patton, a member of the *Anopheles gambiae* Giles species complex, is a major malaria vector, particularly in southern Africa, Madagascar and along a wide East–West belt fringing the Sahel (Della Torre et al., 2005). Generally, *An. arabiensis* is regarded as being more exophilic, exophagic and zoophilic than *An. gambiae* Giles *sensu stricto*, but even so it remains a highly efficient vector of malaria (White, 1974). This species is thus an important subject of research, with a particular need for a greater understanding of

its biological, genetic and ecological characteristics as they relate to malaria control (Petrarca et al., 2000; Costantini et al., 2005; Tirado et al., 2006; Taye et al., 2006). The release of sterile male mosquitoes into malaria and dengue endemic regions is proposed as a technique to control mosquitoes and reduce incidence of disease, and known as the Sterile Insect Technique, or SIT (Benedict and Robinson, 2003). This might be an effective means to reduce malaria cases in this region of Burkina Faso, but this approach relies on an appropriate knowledge of mosquito mating biology (Ferguson et al., 2005). In the past ten years the swarming and mating characteristics of natural populations of *An. gambiae* s.s. have been relatively well studied, especially in West Africa (Tripet et al., 2005; Diabaté et al., 2006, 2009, 2011; Dabiré et al., 2013). However, despite its medical and epidemiological importance, little is known about *An. arabiensis* natural swarming and mating

* Corresponding author. Tel.: +226 70 73 90 69; fax: +226 20 97 04 57.

E-mail address: dabire_roch@hotmail.com (K.R. Dabiré).

patterns in the field (Marchand, 1984; Charlwood et al., 2002). In particular, there is currently very little basic information about *An. arabiensis* swarming behaviour, including swarm location and composition, factors influencing mating success, and the relative competitiveness of laboratory grown and wild male mosquitoes following release of the former into the field. The availability and diversity of plant nectar, as well as factors such as the nature of ground cover and climatic conditions are all likely to impact male dispersal patterns, which in turn are likely to affect the nature and locations of swarms. Before basic knowledge is gained about these and other elements of the mating behaviour of disease vectors it will be difficult to achieve successful population control using SIT.

Recent studies have shown that *An. coluzzii* and *An. gambiae* (formerly *An. gambiae* M and S molecular forms, respectively, (Coetzee et al., 2013), mainly have distinct, separate swarm sites (though shared sites have been reported, REFs), suggesting that the environmental and endogenous cues that determine the nature of swarming/mating sites must be under strong genetic control (Diabaté et al., 2009, 2011; Dabiré et al., 2013). There is concern therefore, that the mating competitiveness of released sterile males may be compromised by selection pressures during laboratory rearing, that alter their responsiveness to swarming cues under natural conditions (Bartlett, 1984; Peloquin and Asman, 1988; Howell and Benedict, 2009). These observations about the selection of swarm sites also indicate that males consistently arrive at predictable sites every day, and local knowledge of these sites may be of great use when monitoring overall population densities during mosquito control campaigns. As part of a series of several studies into the adaptation of *An. arabiensis* to an urban setting, the goal of the current study was to gather data on the locations and characteristics of swarms of mosquitoes in an urban setting within the city of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Previous work has shown that *An. gambiae* s.s and *An. arabiensis* are sympatric in Dioulassoba, with the proportion of *An. arabiensis* increasing over the last decade (Dabiré et al., 2012). Particular emphasis was placed on investigating species composition and the visual cues used by males to select a swarm site. Selected houses were sampled for resting adult mosquitoes and larval breeding sites were also sampled; collected individuals were identified by species.

2. Materials and methods

2.1. Study area

Dioulassoba (11°10'42"N; 4°17'35"W) is a longstanding residential district in the centre of Bobo-Dioulasso, the second largest city in Burkina Faso located in the Southwest of the country. This district is crossed by a permanent stream along which are dotted small plots of vegetables and herb plants grown by the residents, and which is polluted with domestic waste litter and waste water (including sewage). Small puddles along the banks of the stream and the surrounding borders constitute regular breeding sites, which are reported to often contain mosquito larvae. The study was conducted along a transect which was 500 m long and 160 m wide, along the North bank of the Houet River (Fig. 1).

2.2. Identification of physical markers associated with swarm formation

Swarm observations were performed around sunset from 17:00 to 20:00. The onset of swarming was defined as the time the first male was seen flying in characteristic swarming flight patterns at sites that had been identified as swarm sites in previous days (Dabiré et al., 2012). Swarm sites were geo-referenced using GPS (GARMIN, ref. GPSMAP® 62) for further monitoring.

As the team walked along the transect at sunset they recorded each time they saw a swarm of mosquitoes, including those both outside and in the open air courtyards within houses, identifying the visual marker above which each occurred, the location and nature of the visual cue, and the height of the swarm (measured as the distance from the ground to a point judged to be half way up the swarm using a graduated wooden stick). Swarms were then sampled using a sweep net. All swarm sites were monitored daily over ten consecutive days in March and April 2012, corresponding to the most arid period of the dry season, and then from September to October 2012, during the wet season.

2.3. Sampling and visual characterisation of mosquitoes from swarms, indoor resting sites and larval breeding sites

Households in Dioulassoba are arranged around open air courtyards; all courtyards were examined for the presence of swarms, in addition to those swarms observed in the open spaces between buildings. Where possible, all mosquitoes were collected from each swarm using insect sweep nets; it was not possible using the original methodology to sample swarms taller than 4 m or those occurring above the roofs of houses, since the sweep nets were too short to enable all mosquitoes within the swarm to be reached for collection. However, by the second sampling sequence in the wet season the method had been improved with the use of long wooden sticks and so all observed swarms could be collected. Mosquitoes captured in the sweep nets were killed and put into a 10 ml tube labelled with the swarm number and collection date. They were scored visually for species (Gillies and De Meillon, 1968) and sex and stored at -20°C for further species and molecular form identification by PCR.

Adult mosquitoes resting indoors were collected by spraying the inside of houses with aerosol insecticides from 10 sample households (usually individual rooms within courtyards) dispersed throughout the study area, at intervals of about 3 m. Individuals were knocked down and immediately retrieved from white sheets laid on the floor of sprayed huts. They were then scored for species and sex as with samples from swarms, and stored in silica gel in 1.5 ml Eppendorf tubes.

All potential breeding sites bordering the Houet river were checked for the presence of mosquito larvae. Larvae were sampled from 10 of those breeding sites found to be positive for the presence of anopheline larvae and stored in alcohol at -20°C for species identification. The locations of sampled larval breeding sites were geo-referenced as with swarm sites.

2.4. Species identification by PCR

All mosquitoes sampled from swarms, and a sub-sample of around 30 adults per sprayed house and 30 larvae per sampled breeding site, were identified by species and molecular form by PCR using the SINE 2000 protocol of Santolamazza et al. (2008). Genomic DNA (10–50 ng) from individual *An. gambiae* s.l. specimens was PCR amplified using S 200 X6.1 forward (5'-TCGCCTTAGACCTTGCGTTA-3') and reverse (5'-CGCTTCAAGAATTCGAGATAC-3') primers. The PCR conditions were 10 min at 94°C for denaturation followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification products were run on a 1.5% agarose gel.

The relative frequencies of each species and molecular form collected from swarms, indoor spraying catches and larval breeding sites were calculated as a percentage of total mosquitoes (adults and larvae) collected.



Fig. 1. Map of swarm's apparition places and the location of main breeding sites sampled in Dioulassoba during dry and rainy seasons.

3. Results

3.1. Physical and visual markers for swarm formation

All swarm sites and breeding sites where larvae were sampled were geo-referenced, which allowed a map of swarms and the dispersal of breeding sites across the district to be produced both from dry and wet season surveys (Fig. 1). During both the dry and the rainy seasons swarms were observed along the length of the transect and fairly evenly distributed, though concentrated slightly more on the edges of blocks of residences and along the banks of the Houet river. Larval breeding sites were concentrated in certain stretches of the river bed and banks where water was slower moving and so suitable pools formed.

The visual markers associated with the occurrence of swarms included physical objects and areas such as patches of bare soil which were somehow visually distinct from the surrounding area; pieces of litter, wood piles, piles of manure, house roofs and other markers acted as a cue, attracting male mosquitoes to aggregate in preparation for mating. Significantly more *An. arabiensis* swarms formed above rooftops than any other marker ($\chi^2 = 138.65$, $df = 9$, $P < 0.0001$) regardless of the sampling period in this urban environment (Fig. 2A and B respectively for dry and rainy seasons). Other common swarm markers were patches of bare ground either outdoors or in open-air courtyards within houses, and patches of moist soil, whose dark colour produced visual contrast with the surrounding ground. Piles of litter, puddles, piles of sand and plants, either outdoors or in courtyards, were also observed to be swarm markers used by this mosquito species. During the dry season surveys more swarms (46% of all swarms) were observed in open-air courtyards, and their numbers differ slightly but significantly to the number found outdoors (54%). This proportion decreased during the wet season when only 29% of swarms were found indoor (vs. 71% outdoor). During the wet season, 25% of all swarms were found along the river bank, including those occurring above breeding sites, compared to only 10% in the dry season, a significantly lower proportion ($\chi^2 = 5.91$, $df = 1$, $P < 0.05$).

3.2. Other swarm characteristics

Analysis of the position of swarms recorded in the dry season showed two distinct groups of swarm as classified by height from the ground to the midpoint of the swarm (Fig. 3A). One group of swarms, 55% of the total number observed, occurred at a height of more than 3.5 and up to nearly 6 m above the ground (mean $3.8 \text{ m} \pm 0.63 \text{ SE}$), and the second group formed between 1 and 3 m (mean $2.1 \text{ m} \pm 0.34 \text{ SE}$) above the ground. The two groups of swarms

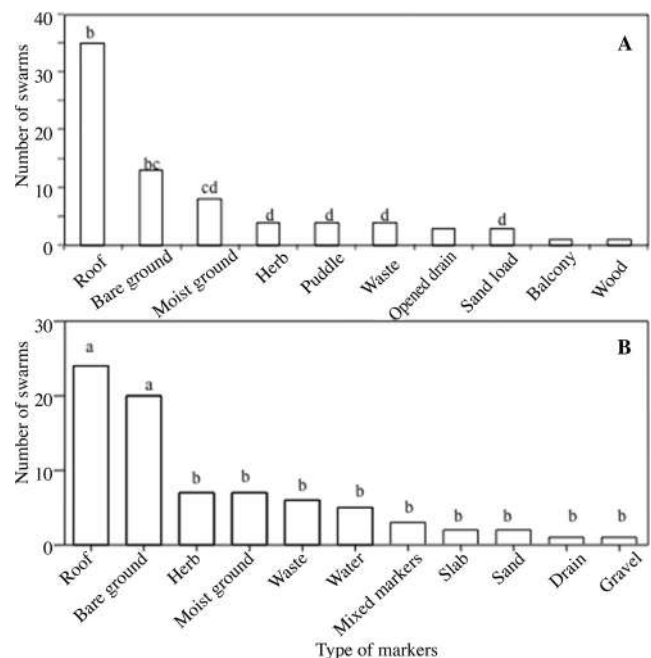


Fig. 2. The main landmarks used by *An. arabiensis* swarms during (A) the dry and (B) rainy seasons in Dioulassoba (data followed by the same letter did not differ significantly, $P > 0.05$).

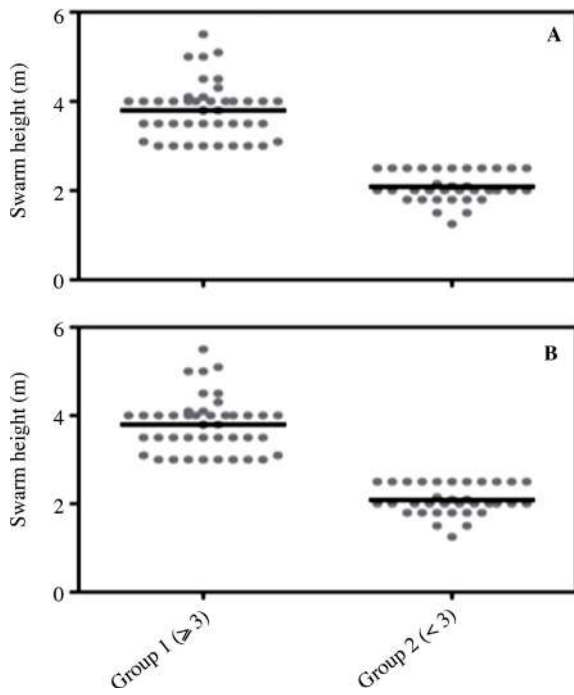


Fig. 3. Comparison of swarm's groups according to their heights (m) when sampled during (A) dry and (B) rainy season in Dioulassoba (lines represent the mean value of swarms height).

were also reported during the rainy season during which similar patterns of heights with 47% of swarms at a height over 3 m (mean $3.80 \text{ m} \pm 0.79 \text{ SE}$) and 53% forming under 3 m (mean $2.00 \text{ m} \pm 0.48 \text{ SE}$) above the ground (Fig. 3B) were observed.

The time at which swarms formed (Fig. 4A) did not significantly differ over the 7 days of the dry season collections, fluctuating between 6:18 and 6:21 pm ($KW=2.45$, $P=0.87$). Swarm initiation times did not differ significantly in the rainy season either,

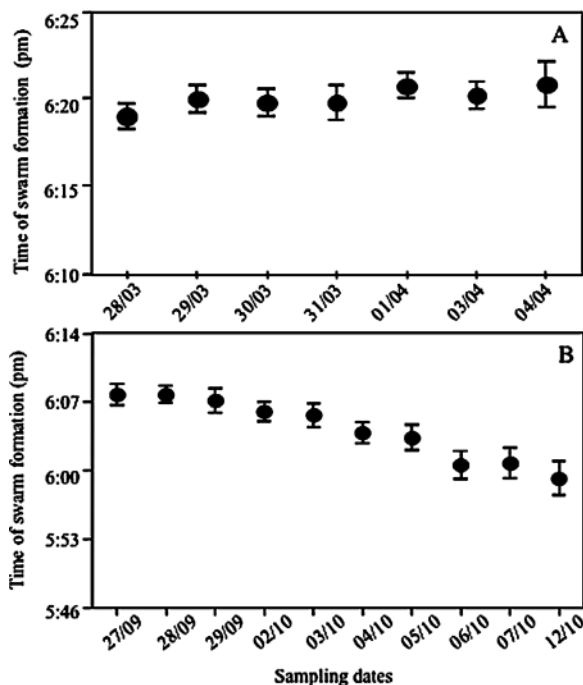


Fig. 4. Variation of swarm formation times during (A) the dry and (B) the rainy seasons in Dioulassoba.

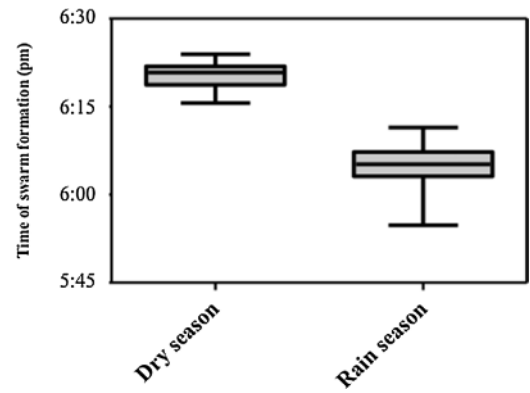


Fig. 5. Means swarm formation times in Dioulassoba during dry and rainy season.

fluctuating between 6:02 and 6:10 pm (Fig. 4B). The trend of swarm initiation time seemed to follow the changing day length in both the dry and wet season, though a significant difference was not observed during the course of either experiment. However, when comparing the time of swarm initiation between dry and rainy seasons (Fig. 5A and B respectively), those swarms observed during the wet season appeared significantly more precociously than those in the dry season ($KW=28.48$, $P=0.0008$).

3.3. Identification of mosquitoes from swarms, from larval breeding sites and those collected indoors

From the dry season surveys, a total of 67 swarms were observed and 26 were close enough from the ground to enable the mosquitoes making up the swarm to be collected. The swarm size varied between 2 and 212 mosquitoes. From the 26 swarms sampled, 964 mosquitoes were collected, exclusively *An. arabiensis*, comprising 956 males and only 8 females (Table 1). Of 304 larvae similarly tested from 10 breeding sites all were identified as *An. arabiensis*, except 7 (from 3 different breeding sites), which were *An. coluzzii*. The density of anopheline adults collected by indoor spraying was very low; only 6 mosquitoes were found from surveillance of 10 households, and all were identified as female *An. arabiensis*.

During the second round of population samples taken in the wet season, all of the 78 observed swarms, including those found up to 4 m above the ground, were effectively sampled as the sampling method had been adapted. All 1694 mosquitoes, including 1678 males and 16 females collected from the 78 swarms were PCR analysed of which 6 were found to be male *An. gambiae* originating from a single pure swarm of *An. gambiae*. All of the remaining adults from all swarms were identified to be *An. arabiensis* (Table 1). Larvae collected during the rainy season from 20 breeding sites (at least 30 larvae were analysed per breeding site) comprised 70.6% *An. arabiensis* and only 20.8% *An. coluzzii* and 8.6% *An. gambiae* (Fig. 6). The 120 resting mosquitoes (at least 30 mosquitoes analysed per day) comprised females mosquitoes collected during four days collection in the rainy season, also identified by PCR, consisted of 63.5% *An. arabiensis*, and only 23.5% *An. coluzzii* and 13% *An. gambiae*.

4. Discussion

The desire to investigate mating and swarming behaviour in wild populations of anopheline mosquitoes is not new. In fact the state-of-the-art research began early (Downes, 1969) and since these first observations several types of insects whose mating systems require swarms have been closely studied (e.g. Sullivan, 1981; Cooter, 1989) and with more relevance to this current study by Yuval et al. (1993), who provided a thorough description of swarming and mating behaviour within natural swarms of *An. freeborni*. A

Table 1
species composition and the main landmarks used by each swarm observed and sampled during the dry and rainy seasons in Dioulassoba.(ID, identification; 1, dry season; 2, rainy season; nb, number; mo, mosquitoes; m, metre).

Swarm ID	Sampling period	Landmark used for swarm	Height (m)	Nb. of mo sampled	Nb. of mo analysed		Species		
					Males	Females	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>
1.1	1	Moist ground	3	212	212	0	212	0	0
1.12	1	Sand heap	2	87	87	0	87	0	0
2.1	1	Moist ground	2.5	15	15	0	15	0	0
2.2	1	Roof	3.5	4	4	0	4	0	0
2.13	1	Roof	3	4	4	0	4	0	0
2.15	1	Moist ground	1.8	59	59	0	59	0	0
2.18	1	Bare ground	2.5	74	74	0	74	0	0
2.19	1	Moist ground	2.5	19	19	0	19	0	0
2.21	1	Bare ground	2.5	134	134	0	134	0	0
2.22	1	Bare ground	1.3	29	27	2	29	0	0
3.1	1	Roof	3.1	38	35	3	38	0	0
3.3	1	Bare ground	1.8	22	22	0	22	0	0
3.4	1	Bare ground	1.8	31	31	0	31	0	0
3.5	1	Bare ground	1.8	8	8	0	8	0	0
3.6	1	Soil heap	2	38	38	0	38	0	0
3.8	1	Wood	2.2	56	53	3	56	0	0
3.11	1	Puddle	2.1	3	3	0	3	0	0
3.12	1	Puddle	2.5	8	8	0	8	0	0
3.13	1	Bare ground	2.5	36	36	0	36	0	0
5.7	1	Moist ground	3	4	4	0	4	0	0
6.4	1	Waste	2	6	6	0	6	0	0
7.1	1	Sand heap	1.5	31	31	0	31	0	0
M1	1	Waste	4	5	5	0	5	0	0
M2	1	Herb	2	2	2	0	2	0	0
M3	1	Puddle	1.8	25	25	0	25	0	0
M5	1	Herb	2	14	14	0	14	0	0
				964	956	8	964	0	0
1.3	2	Roof	3.5	21	21	0	21	0	0
1.4	2	Roof	3.5	38	38	0	38	0	0
1.13	2	Bare ground	1	6	6	0	6	0	6
1.42	2	Bare ground	5.5	4	4	0	4	0	0
2.1	2	Moist ground	2.1	37	37	0	37	0	0
2.2	2	Roof	5	11	11	0	11	0	0
2.3	2	Roof	5	13	13	0	13	0	0
2.5	2	Roof	3.5	21	21	0	21	0	0
2.7	2	Roof	6	18	18	0	18	0	0
2.1	2	Roof	3.5	25	25	0	25	0	0
2.11	2	Roof	5	11	11	0	11	0	0
2.16	2	Slab	2	15	15	0	15	0	0
2.17	2	Bare ground	2.1	32	32	0	32	0	0
2.2	2	Moist ground	1.1	4	4	0	4	0	0
2.23	2	Moist ground	3.1	9	9	0	9	0	0
2.24	2	Roof	4	10	10	0	10	0	0
2.25	2	Roof	4	25	25	0	25	0	0
3	2	Roof	2.5	16	13	3	16	0	0
3.1	2	Roof	2.5	5	4	1	5	0	0
3.6	2	Bare ground	1.5	30	30	0	30	0	0
3.14	2	Slab	1.2	11	10	1	11	0	0
3.15	2	Roof	3	9	9	0	9	0	0
3.16	2	Bare ground	2.2	26	19	7	26	0	0
3.17	2	Bare ground	2.6	88	86	2	88	0	0
3.18	2	Bare ground	2.75	46	44	2	46	0	0
3.19	2	Drain	3.5	14	14	0	14	0	0
3.2	2	Mixed markers	2	6	6	0	6	0	0
4.21	2	Roof	3	15	14	1	15	0	0
4.22	2	Roof	3.5	10	9	1	10	0	0
R15	2	Waste	0.5	39	39	0	39	0	0
R16	2	Gravel	1.2	8	8	0	8	0	0
R17	2	Waste	2	25	25	0	25	0	0
R18	2	Mixed markers	1.5	31	31	0	31	0	0
R19	2	Herb	1.8	25	25	0	25	0	0
R20	2	Herb	3	14	14	0	14	0	0
R21	2	Sand	3	24	24	0	24	0	0
R22	2	Mixed markers	2.5	23	23	0	23	0	0
R23	2	Sand	3	15	15	0	15	0	0
				1694	1678	16	1688 (99.65%)	0	6 (0.35%)

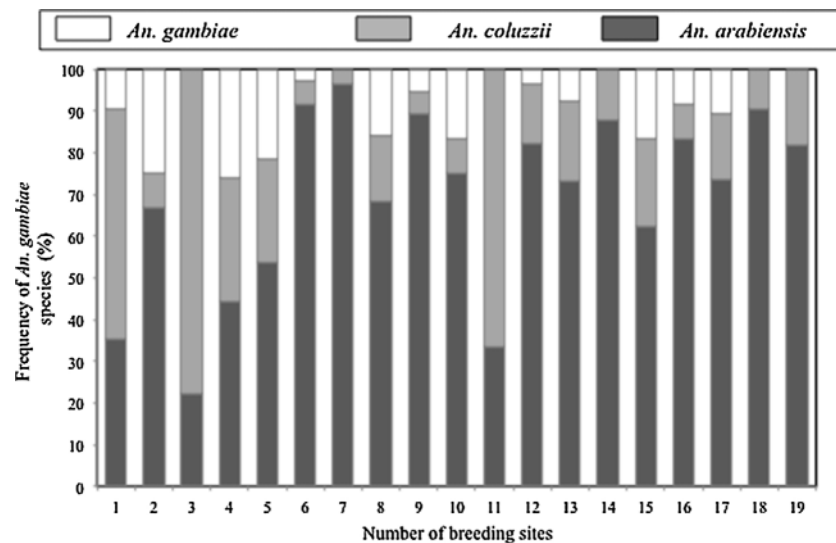


Fig. 6. Variation of the relative proportion of *An. gambiae* species sampled from the breeding sites in Dioulassoba (rainy season).

decade later, the first fieldwork to describe the swarming behaviour of *An. gambiae* was conducted in Sao Tome (Charlwood et al., 2002). Studies of swarming and mating behaviour of mosquitoes in Burkina Faso began in 2003 and have mainly focused on *An. gambiae* s.s., aiming to better describe the behavioural difference between *An. coluzzii* and *An. gambiae*, which create reproductive barriers between the two species (Diabaté et al., 2003, 2006; Dabiré et al., 2013; Sawadogo et al., 2013). Recent studies conducted in Mali have also highlighted spatial segregation in swarm sites between M and S forms of *An. gambiae* s.s. (or *An. coluzzii* and *An. gambiae*, respectively) (Diabaté et al., 2009, 2011). However, none of these studies considered or investigated *An. arabiensis*, one of the major malaria vectors across Africa, reported to occur right across the continent and one of the proposed target species of a vector control strategy based on the release of sterilised males into the field (Benedict and Robinson, 2003; Ageep et al., 2009).

In previous work, we have studied the bionomics of *An. arabiensis*, which remains the most frequently found species of the *An. gambiae* s.l. complex in Bobo-Dioulasso city, Burkina Faso (Dabiré et al., 2012), and the present study is part of a series of ongoing works to better elucidate the extent of its colonisation of this urban area. The first major observation from this study's results is that the number of swarms observed and collected during one week of sampling was greater than would be expected judging from numbers in surrounding areas such as Vallée du Kou and Soumouso (Diabaté et al., 2006; Dabiré et al., 2013). Even though swarms are consistently found in these areas, we have not yet recorded such a high number of swarms in such a relatively short time and confined area as was observed during this study, both in the dry and wet seasons.

The other major observations come from comparison of these data with results from previous research in both Mali and Burkina Faso (Vallée du Kou and Soumouso regions), which found that the major swarms of *An. gambiae* and *An. coluzzii* did not exceed 3 m in height (Dabiré et al., 2013; Diabaté et al., 2009, 2011; Sawadogo et al., 2013) and were never observed around the breeding site, unlike in the current study where many swarms of *An. arabiensis* were observed forming both above rooftops and near to breeding sites. We were able to identify two distinct groups of swarms based on their height, and in fact some swarms occurred so high up that we were unable during the first survey to sample them using the sweep net method. By improving the sampling method using long wooden sticks all swarms could be collected, and it appeared that the majority of these higher swarms were composed by

An. arabiensis. This may be the result of the land use and density of building in the study area; an obvious reason for the taller swarms is that the swarm height is affected by the nature of the visual marker, with the highest swarms occurring above houses (rooftops) and the lowest found over open ground. This relationship between swarm height and the nature of the swarm marker is apparent from our data.

Segregation between the *An. gambiae* M and S molecular forms (or *An. coluzzii* and *An. gambiae*, respectively) has been reported in Mali (Diabaté et al., 2009), where swarms occurring less than 4 m from the ground consisted of *An. gambiae* M form. In Dioulassoba, our study area in Burkina Faso, the two molecular forms still occur in sympatry with *An. arabiensis* even though they compose a very small proportion (less than 10% of all mosquitoes sampled) and probably swarm above different markers or at a different height. But our swarm sampling method needs to be improved for future studies in this area of the minor species (*An. coluzzii* and *An. gambiae*) as only one swarm of *An. gambiae* was sampled in the current study and so no conclusions can be drawn about segregation of the two species. Since the presence of *An. gambiae* and *An. coluzzii* was identified through larval surveys and *An. gambiae* from swarm sampling in the wet season, when higher swarms could be examined, and since larval surveys identified *An. coluzzii* and *An. gambiae* together with *An. arabiensis*, it seems that the sampling technique and when surveillance is conducted affects the species that will be reported in an area. This must be considered in future efforts to characterise species composition, which must be fairly comprehensive to ensure all present species are accounted for. All swarms identified by species in this present study consisted of *An. arabiensis* except one identified as a pure swarm of *An. gambiae* (S form). The species' tendency to form mating swarms above a focal point observed previously in *An. gambiae* and *An. coluzzii* seems to be confirmed since most of the swarms observed here used the same type of visual and physical markers as those reported for *An. gambiae* and *An. coluzzii* swarm formation. The proximity of swarms to larval breeding sites was also greater than previous observations; this is the first time in about ten years of monitoring swarming behaviour that we observed swarms less than one metre from a breeding site or directly above a breeding site. The nature of the study area, which is dense in terms of number of houses, could explain this fact with land use having a significant effect on spatial segregation. As an urban area where houses are very concentrated it is plausible that height plays an important role in allowing a swarm to gain access to more open space, perhaps meaning that they need

to form more than 4 m above the ground to reach natural light. The final difference was the relatively anthropophilic nature of the *An. arabiensis* swarming system observed in this urban setting, with some swarms forming inside human habitations while people were not only present but actively doing domestic work such as cooking or walking across the compound.

Even though a high number of swarms was observed in the study area, only a few adults were collected indoors by insecticide sprays during the dry season. But the data from the rainy season were consistent with those reported by Dabiré et al. (2012) where this mosquito made up between 50 and 100% of total mosquitoes collected indoors. During the dry period a low proportion of mosquitoes were collected indoors. The Dioulassoba locale is not severely arid during the dry season as it is crossed by the Houet river with a permanent source of water, so during the dry season males and females of this species can probably find outdoor resting places which are preferable to sites inside human habitations. The scope of the investigation should be widened to investigate resting places other than houses to tell more about eventual seasonal variation in swarming and resting behaviour. It is also important to address the question of environment factors on swarming, mating and dispersal of *An. arabiensis* males in urban settings.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

SPS conducted fieldwork and contributed to data analyses. HDF and BSNS conducted fieldwork and contributed to molecular analysis in the lab. SDD conducted the PCR analysis. MA drew the swarm map. BT, GLC, SF, TL, DA and LRS, contributed to drafting and revising the manuscript. GJ and DKR designed the study and wrote the manuscript.

Acknowledgments

Authors are grateful to the people of Dioulassoba who were very cooperative and allowed this work to be carried out in a very good working ambience. Authors thank Ouari Ali, field technician of IRSS/Centre Muraz who initiated the fieldwork and geo-referenced the swarm's sites. This work was supported by an IAEA grant, contract no 16190/R0, accorded to Dabiré K. Roch under CRP G34002.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.016>.

References

- Ageep, T.B., Cox, J., Hassan, M.M., Knols, B.G.J., Benedict, M.Q., Malcolm, C.A., Babiker, A., El Sayed, B.B., 2009. Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: influence of environmental factors and implications for vector control. *Malar. J.* 8, 7.
- Bartlett, A.C., 1984. Genetic changes during insect domestication. In: King, E.G., Leppla, N.C. (Eds.), *Advances and Challenges in Insect Rearing*. United States Department of Agriculture, Phoenix.
- Benedict, M.Q., Robinson, A.S., 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol.* 19, 349–355.
- Charlwood, J.D., Thomson, R., Madsen, H., 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J. Vector Ecol.* 27, 178–183.
- Coetzee, M., Hunt, R., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, B.M., Besansky, N., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619, 246–274.
- Cooter, R.J., 1989. Swarm flight behavior in flies and locusts. In: Goldsworthy, G.J., Wheeler, C.H. (Eds.), *Insect Flight*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 165–203.
- Costantini, C., Vale, G., Santolamazza, F., della Torre, A., Torr, S., 2005. Intrinsic host odor preferences of *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* from a remote game area of Zimbabwe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 325.
- Dabiré, K.R., Namountougou, M., Sawadogo, P.S., Yaro, L.B., Toe, K.H., Ouari, A., Gouagna, L.C., Simard, F., Chandre, F., Baldet, T., Bass, C., Diabaté, A., 2012. Population dynamics of *Anopheles gambiae* s.l. in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasit. Vectors* 5, 127.
- Dabiré, K.R., Sawadogo, P.S., Diabaté, A., Toé, K.H., Kengne, P., Ouari, A., Costantini, C., Gouagna, L.C., Simard, F., Baldet, T., Lehmann, T., Gibson, G., 2013. Assortative mating in mixed swarms of the mosquito *Anopheles gambiae* s.s. M and S molecular forms, in Burkina Faso, West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 27, 298–312.
- Della Torre, A., Tu, Z., Petrarca, V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* ss molecular forms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 7055–7069.
- Diabaté, A., Baldet, T., Brengues, C., Kengne, P., Dabiré, K.R., Simard, F., Chandre, F., Hougard, J.M., Hemingway, J., Ouedraogo, J.B., Fontenille, D., 2003. Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 713–716.
- Diabaté, A., Dabiré, K.R., Kengne, P., Baldet, T., Ouari, A., Costantini, C., Simard, F., Fontenille, D., 2006. Mixed-swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* in a sympatric area from Burkina Faso. *J. Med. Entomol.* 43, 480–483.
- Diabaté, A., Dao, A., Yaro, A.S., Adamou, A., Gonzalez, R., Manoukis, N.C., Traoré, S.F., Gwadz, W.R., Lehmann, T., 2009. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc. R. Soc. B* 276, 4215–4222.
- Diabaté, A., Yaro, A.S., Dao, A., Diall, O.M., Huestis, D.L., Lehmann, T., 2011. Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol. Biol.* 11, 184.
- Downes, J.A., 1969. The swarming and mating flight of diptera. *Annu. Rev. Entomol.* 14, 271–298.
- Ferguson, H.M., John, B., Ng'habi, K., Knols, B.G.J., 2005. Redressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends Ecol. Evol.* 20, 202–209.
- Gillies, M.T., De Meillon, B., 1968. *The Anophelinae of Africa South of Sahara*, 2nd edition. South African Institute of Medical Research, SAIMR, Johannesburg, South Africa, pp. 343pp.
- Howell, P.I., Benedict, M.Q., 2009. Mating competitiveness of *Anopheles arabiensis* males as a function of transgenic state and genetic similarity to females. *J. Insect Behav.* 22, 477–491.
- Marchand, R.P., 1984. Field observations on swarming and mating in *Anopheles gambiae* mosquitoes in Tanzania. *Neth J Zool* 34, 367–387.
- Peloquin, J.J., Asman, S.M., 1988. Use of a modified Marchand cage to study mating and swarming behavior in *Culex tarsalis*, with reference to colonization. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4, 516–519.
- Petrarca, V., Nugud, A.D., Elkarim Ahmed, M.A., Haridi, A.M., Di Deco, M.A., Coluzzi, M., 2000. Cytogenetics of the *Anopheles gambiae* complex in Sudan with special reference to *Anopheles arabiensis*: relationship with east and West African populations. *Med. Vet. Entomol.* 14, 1–16.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z., della Torre, A., 2008. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar. J.* 7, 163.
- Sawadogo, S.P., Costantini, C., Pennetier, C., Diabaté, A., Gibson, G., Dabiré, K.R., 2013. 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* 6, 275.
- Sullivan, R.T., 1981. Insect swarming and mating. *Fla Entomol.* 64, 44–65.
- Taye, A., Hadis, M., Adugna, N., Tilahun, D., Wirtz, R.A., 2006. Biting behaviour and *Plasmodium* infection rates of *Anopheles arabiensis* from Sille, Ethiopia. *Acta Trop.* 97, 50–54.
- Tirado, I., Costantini, C., Gibson, G., Torr, J.S., 2006. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. *Med. Vet. Entomol.* 20, 425–437.
- Tripet, F., Thiemann, T., Lanzaro, G.C., 2005. Effect of seminal fluids in mating between M and S forms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 42, 596–603.
- White, G.B., 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 278–301.
- Yuval, B., Wekesa, J.W., Washino, R.K., 1993. Effect of body size on swarming behaviour and mating success of male *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Behav.* 6, 333–342.