

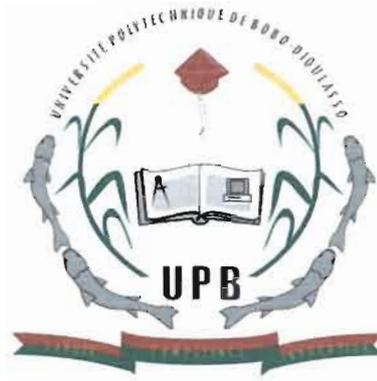
MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

ECOLE DOCTORALE DES
SCIENCES DE LA SANTE (ED- SDS)

FORMATION DOCTORALE EN
PARASITOLOGIE MEDICALE



BURKINA FASO
Unité-Progrès -Justice

Année académique 2013-2014

Thèse N° 000029

*Evaluation expérimentale de l'efficacité de cinq candidats
vaccins bloquant la transmission du paludisme au Burkina Faso*

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 05 Mars 2014

**Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Polytechnique
de Bobo-Dioulasso en Parasitologie médicale**

Par

Dari Yannick Frédéric DA

JURY

Directeur de thèse

Jean-Bosco OUEDRAOGO, Directeur de Recherche IRSS

Co-Directrice

Anna COHUET, Chargée de Recherche, IRD Montpellier

Président :

Robert T. GUIGUEMDE : Professeur titulaire, UPB / Centre Muraz

Membres :

- Jean-Bosco OUEDRAOGO, Directeur de Recherche, IRSS

- Halidou TINTO, Maitre de Recherche, IRSS / Centre Muraz

Rapporteurs :

- Roch K. DABIRE : Directeur de Recherche, IRSS / Centre Muraz

- Vincent ROBERT : Directeur de Recherche, IRD Montpellier

- Yves TRAORE : Maitre de conférences, Université de Ouagadougou

DEDICACE

➤ *A la mémoire de mon très cher père,*

Décédé lors d'une de mes missions, que ton âme repose en paix,

➤ *A ma Mère*

Sans tes prières et bénédictions, les présents travaux n'auraient pas pu être réalisés. A travers ceci, trouvez un début de récompense à toutes ces années de sacrifices. Que le bon Dieu te garde encore longtemps auprès de nous.

➤ *A mes Jumeaux Elvis et Elsie ainsi que ma bien aimée Rosine*

Deux semaines à peine après votre naissance, j'ai été contraint de vous quitter pour une destination dans le cadre du service. Loin d'être un abandon, soyez rassuré de mon affection.

➤ *A toute ma famille*

Les soutiens multiformes ont été un atout majeur pour le succès de ce travail. Je vous réaffirme mon attachement familial.

REMERCIEMENTS

- **Au Pr. Jean Bosco Ouédraogo**, Directeur de L'IRSS/DRO, Directeur de thèse
Homme de grande simplicité, votre rigueur dans le travail, votre passion de la science, votre constante disponibilité, sont autant de qualités et de compétences qui vous couronnent dans votre carrière de chercheur. En dépit de votre agenda chargé, vous n'avez ménagé aucun effort pour nous offrir vos connaissances scientifiques. Je ne saurais quoi vous dire ; simplement merci.

- **Au Dr. Anna Cohuet**, co-directrice de thèse
A travers votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre sens de l'écoute, votre dynamisme, vous avez su créer une atmosphère favorable pour le bon déroulement des travaux. Grâce à vos relations professionnelles, j'ai découvert plusieurs instituts de la communauté scientifique. En plus de ces qualités scientifiques, vos soutiens multiformes au delà du cadre professionnel ont été très réconfortants pour moi, et illuminent en vous des qualités humaines. Je vous témoigne, avec un grand enthousiasme, toute ma reconnaissance.

- J'adresse ma profonde reconnaissance **Au Dr. Louis Clément Gouagna**
Vous avez énormément contribué à ma formation scientifique de base, depuis la rédaction de mon projet de thèse jusqu'aux aspects techniques de laboratoire. Pour nécessité de service, vous avez été affecté à l'Ile de la Réunion. Je vous souhaite beaucoup de succès dans votre poste.

- **Au Dr. Serge Yerbanga**
Votre constante disponibilité, vos précieux conseils et votre lecture critique de mon manuscrit ont été d'un apport indispensable pour l'aboutissement de ce travail. Vous êtes d'une grande simplicité et très ouvert aux débats scientifiques. Vous représentez pour moi un aîné exemplaire dans la recherche. Soyez rassuré de ma profonde gratitude.

- **Au Pr Halidou Tinto**, Maître de recherche à l'IRSS /Centre Muraz
Vous avez initié mes premiers pas à la recherche en dirigeant mon DEA ; Vos conseils et vos directives m'ont servi de guide et m'ont permis d'approfondir ma vision scientifique. Cela s'est concrétisé aujourd'hui par la réalisation de cette thèse. Recevez mes sincères reconnaissances.

- **Au Pr. Roch K. Dabiré**, responsable de la section entomologie médicale
Vous avez été une personne ressource dans le choix du sujet et vous avez été à l'origine de mes relations avec Dr. Louis Clément Gouagna pour l'initiation de cette thèse. En plus des enseignements scientifiques, vos multiples conseils ont été des pistes directrices dans l'organisation de ma vie sociale. Vous êtes pour moi plus qu'un formateur pédagogique ; simplement je vous dis merci.

- **Au Pr. Robert T. Guiguemdé**, Directeur de L'INSSA et Fondateur de l'école doctorale Soucieux de la formation des étudiants, vous aviez mis à leur disposition un cycle doctoral ; l'initiative est noble et mérite d'être soutenue. Votre constante disponibilité à écouter les étudiants et votre parfaite collaboration avec les instituts d'accueil, demeurent un atout majeur pour le déroulement harmonieux de la formation.
- J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. Georges Anicet Ouédraogo**, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso. Vous nous avez encouragés à continuer en thèse après nous avoir assuré une brillante formation en DEA. Le présent travail illustre bien le fruit de vos conseils. Nous vous réitérons notre profonde gratitude.
- Un grand Merci, à Abdoulaye Diabaté, Hervé Kpoda, Serge Somda, Herman Songo, Tarnagda Zekiba, Jérémy Rouamba, Issaka Sakandé. Vous avez, d'une manière ou d'une autre, joué un rôle important dans la réussite de ce travail. Je vous en suis plus que reconnaissant.
- Great thanks go to **Pr. Robert E. Sinden**, leader of transmission-blocking vaccines at Imperial College of London. Thanks of course to all past and present members of the Sinden lab who provided me the training in the design of experiments about transmission-blocking vaccine: especially to Dr. Andrew M. Blagborough, Dr. Tom S. Churcher, Dr. Ellen Bushell, Dr. Michael Delves, Kenneth Baker and Mark Tunnicliff.
- Many acknowledgements to **Pr. Andrian S. V. Hill** at Jenner Institute (University of Oxford) and all members of his team, in particular Dr. Sumi Biswas, Melissa C. Kapulu. Thanks to the collaboration with this team, we obtained vaccine samples from for evaluation in Burkina Faso.
- I would like to extend this acknowledgement to **Dr. yimin Wu** at National Institute of Health for her implication in evaluation of transmission-blocking vaccine evaluation in the field. She provided us a human serum from vaccine clinical trial in USA.
- Je remercie profondément l'unité MIVEGEC de l'IRD à travers **Didier Fonténille** le premier responsable. Votre institut a pleinement joué un rôle important dans ma formation et dans la réalisation des travaux de cette thèse. Je me garde de citer les noms de peur d'en oublier.
- Je remercie de tout cœur **Dr. Parfait Awono** et le personnel de l'OCEAC, en particulier Isabelle Morlais, Carlo Costantini, Etienne, Maloline. La formation dont j'ai bénéficiée au sein de votre institut m'a été d'un grand apport dans la réalisation de mes travaux. Veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude
- Aux amis et collègues Doctorants notamment Ibrahim Sangaré, Mamaï Joseph Wadaka, Fabrice A. Somé, Simon *Pegdewendé* Sawadogo, Robert K. Ouédraogo, Moussa Namountougou, Hyacinthe K. Toé, Jaques Kaboré, Hamidou Ilboudo, Franck Yao, Bienvenu Martin Somda, Emélie Dama, Hamidou Maïga, Cyrile N'Do, François De Salle Hien, pour votre soutien amical.

- Je tiens également à remercier tous les techniciens Yaméogo Bienvenue, Dabiré Baudoin, Da Flugence, Hien Raimond, Bazié Jean, Tamboula Souleymane, Ouari Ali, Ilboudo Séni, Guel Hyacinthe, Nikiema Aboubacar, Diasso Arzouma, pour votre apport à la réalisation des travaux.
- A toute l'équipe "infectivité" de l'IRSS : Serge Yerbanga, Ibrahim Sangaré, Amélie Karine Mouline, Mamai Wadaka, Vantaux, Olivier Roux, Bienvenue Yaméogo, François De Salle Hien, Thierry Lefèvre, pour le climat agréable entretenu au sein du laboratoire.
- Un grand merci au Pr. Yves Traoré, au Pr. Roch Dabiré et au Dr. Vincent Robert pour avoir accepté consacrer leur effort pour l'évaluation de cette thèse en qualité de rapporteurs.
- Cette étude, une composante du projet « TransMalariaBloc » a été financé par l'Union Européenne dans le cadre du FP7-HEALTH-2007-2.3.2-9. Je remercie tous les investigateurs : Pr. George K. Christophides, Pr. Robert E. Sinden, Pr. Jean Bosco Ouédraogo, Dr. Anna Cohuet et Dr. Louis Clément Gouagna.
- Je remercie l'IRD, du partenariat Nord-Sud tant en terme de formation à la recherche que d'appui financier à travers l'octroi d'une bourse du Département de Soutien à la Formation (DSF). Je ne saurais terminer sans adresser mes remerciements à l'ambassade de la France au Burkina Faso et Campus France pour la bourse de mobilité.

Table des matières

Résumé	1
Introduction	3
Chapitre 1 : Généralités	5
I. Le paludisme	5
I. 1. Signes cliniques de la maladie.....	5
I. 2. Le diagnostic biologique	5
I. 2.1. La microscopie.....	5
I. 2.2. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (P.C.R).....	6
I. 2.3. Les tests de diagnostic rapides.....	6
II. Les <i>Plasmodium</i>	6
II. 1. Systématique	6
II. 2. Cycle biologique	7
III. Les anophèles	8
III.1. Systématique.....	8
III.2. Biologie.....	9
IV. La lutte contre le paludisme	9
IV.1. La lutte antiparasitaire	9
IV.1.1. Le traitement chimiothérapeutique curatif.....	9
IV.1.2. La chimiothérapie préventive	10
IV.1.3. La thérapie vaccinale	10
IV.2. La lutte anti-vectorielle.....	12
IV.3. Nouvelles stratégies : bloquer le développement du parasite chez le vecteur	13
IV.3.1. Utilisation de microorganismes bloquant la transmission	13
IV.3.2. Approches utilisant des moustiques génétiquement modifiés	13
IV.3.3. Médicaments bloquant la transmission.....	14
IV.3.4. Vaccins bloquant la transmission (TBV).....	14
V. Biologie de la transmission.....	15
V.1. Gamétocytogénèse	15
V.2. Gamétogénèse et fécondation	15
V.3. Oocinète	16
V.4. Oocyste – sporozoïte.....	17
V.5. Quelques aspects physiologiques importants du développement sporogonique	18
V.6. Facteurs influençant le développement sporogonique.....	19
V.6.1. Facteurs liés au parasite.....	19
V.6.2. Facteurs liés au moustique	20
V.6.3. Facteurs liés à l'homme	21

VI. Le vaccin bloquant la transmission pour lutter contre le paludisme	21
VI.1. Evolution du concept des TBV	21
VI.2. Principe et mode d'action	22
VI.3. Les atouts dans la recherche de vaccins bloquant la transmission	23
Chapitre 2 : Objectifs de l'étude, design et méthodologie générale.....	25
I. Objectifs de l'étude	25
I.1 Contexte.....	25
I.2. Problématiques	25
I.3. Objectifs	26
II. Design de l'étude	27
III. Spécimens biologiques et processus d'obtention	28
III.1. Système de laboratoire : <i>P. berghei</i> - <i>An. stephensi</i>	28
III.2. Système vectoriel naturel : <i>Plasmodium falciparum</i> - <i>Anopheles coluzzii</i>	28
III.2.1. Le parasite	28
III.2.2 Moustiques vecteurs.....	32
IV. Les candidats vaccins à tester.....	33
IV.1. Nature et origine du sérum anti-Pfs25 de personne immunisée	33
VI.2. Nature et origine des anticorps issus de souris immunisées	34
V. La technique d'infections expérimentales	35
V.1. Description du dispositif expérimental	35
V.2. Le protocole d'infection expérimentale	36
V.2.1. Gorgement des moustiques	36
V.2.2. Technique de dissection des estomacs de moustiques	37
VI. Méthodes d'évaluation des candidats TBV	38
Chapitre 3 : Evaluation de l'efficacité de principaux candidats vaccins	
bloquant la transmission en conditions semi-naturelles	39
Introduction	39
I. Matériel et Méthodes.....	40
I.1. Infections expérimentales pour tester le sérum humain anti-Pfs25.....	40
I.2. Infections expérimentales pour tester les anticorps de souris immunisées	41
I.3. Analyses génétiques des isolats naturels de <i>P. falciparum</i>	42
I. 3.1. Extraction de l'ADN des isolats de <i>Plasmodium</i>	42
I. 3.2. Génotypage des souches à l'aide de la technique des microsatellites	43
I. 3.3. Séquençage des gènes <i>Pf25</i> et <i>Pf230</i>	45
II. Résultats.....	48
II.1 L'efficacité du sérum humain anti-Pfs25 en conditions semi-naturelles.....	48

I.1.1. Blocage et réduction de la transmission par le sérum de personne immunisée..	48
II.1.2. L'efficacité du sérum anti-Pfs25 en fonction du niveau de l'infection	50
II.2. L'efficacité d'anticorps issus de souris immunisées.....	51
II.2.1. L'Efficacité comparée des 5 anticorps	51
II.2.2. Confirmation de la faible efficacité de 3 anticorps	52
II.2.3. Mesure approfondie de l'efficacité des anticorps Pfs25 et Pfs230.....	53
II.2.4. Effet du titre d'anticorps sur la réduction et le blocage de la transmission.....	55
II.3. Résumé de l'efficacité des candidats vaccins	55
II. 4. Une diversité parasitaire sans impact sur l'efficacité des candidats TBV	57
II.4.1. La structure génotypique de l'infection n'affecte pas l'activité des anticorps..	57
II.4.2 une absence de polymorphisme des gènes <i>Pf25 et Pf230</i>	59
III Discussion.....	60
III.1. Efficacité du sérum humain anti-Pfs25 sur des isolats naturels de <i>P. falciparum</i> ...	60
III.2. Efficacité des anticorps issus de souris immunisées.....	61
III.2.1. Vaccins à base de virus recombinant	61
III.2.2. Faible efficacité des anticorps anti-AgAPN1 et anti-Pfs48/45	61
III.2.3. Pfs25 et Pfs230, deux candidats vaccins prometteurs.....	62
Conclusion 1	64

Chapitre 4 : Relations entre la densité en gamétoocytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV65

Introduction	65
I. Matériel et méthodes	67
I.1. Expériences avec le système naturel : <i>P. falciparum</i> – <i>An. coluzzii</i>	67
I.2. Expériences avec le système <i>P. berghei</i> – <i>An. stephensi</i>	68
I.2.1. Infection des souris et production des gamétoocytes.....	68
I.2.2. Infection expérimentale des moustiques.....	70
II. Résultats.....	72
II.1. Système naturel : <i>P. falciparum</i> - <i>An. coluzzii</i>	72
I.1.1. Résultats globaux	72
I.1.2. L'infectivité de <i>P. falciparum</i> chez <i>An. coluzzii</i> est positivement corrélée à la densité gamétoocytaire chez les humains.	74
II.2. Système de laboratoire : <i>P. berghei</i> - <i>An. stephensi</i>	76
II.2.1 Résultats généraux.....	76
II.2.2. Les fortes infections parasitaires des souris, un obstacle au développement sporogonique de <i>P. berghei</i> chez <i>An. stephensi</i>	77
II.2.3. L'environnement biochimique est la principale cause de l'inhibition	78
II.2.4. L'inhibition de l'infectivité a lieu en phase précoce de la sporogonie.....	79
II.2.5 L'efficacité de l'anticorps <i>13.1</i> dépend de l'infectivité des parasites	81
II.3. Relations intensité - prévalence - efficacité des TBV	85

III. Discussion.....	87
III. 1 La technique de dilution de gamétocytes, une innovation en matière d’infections expérimentales	87
III.2. L’inhibition, facteur de confusion avec l’efficacité des TBV	89
III.3. L’intensité de l’infection, un paramètre important pour évaluer les TBV.....	90
Conclusion 2.....	91
Chapitre 5 : Niveau de transmission naturelle homme-moustique : conséquences sur l’évaluation des TBV.....	92
Introduction	92
I. Matériel et Méthodes.....	93
I.1. Evaluation de l’immunité naturelle bloquant la transmission	93
I.2. Evaluation de l’efficacité des TBV en présence de l’immunité naturelle	93
I.3. Evaluation du niveau de transmission sur le terrain.....	94
I.3.1. Mesure du niveau d’infection dans la population humaine	94
I.3.2 Mesure du niveau d’infection au sein des vecteurs majeurs sur le terrain	95
II. Résultats.....	97
II.1. Efficacités de TBV/immunité naturelle	97
II.1.1. L’immunité naturelle réduit le niveau d’infection à <i>Plasmodium</i> chez les vecteurs	97
II.1.2. Interactions entre activité des TBV et l’immunité naturelle des patients.....	99
II.2. Niveau de l’infection chez les hommes et chez les anophèles.....	101
II.2.1. Le niveau d’infection à <i>Plasmodium</i> dans la population humaine.....	101
II.2.2. Niveau d’infection à <i>Plasmodium</i> chez les vecteurs sur le terrain.....	105
II.2.3. Niveau de transmission homme – moustiques sur le terrain	107
III Discussion.....	108
III.1. Relation Immunité - efficacité des candidats TBV.....	108
III.2. Du niveau de transmission homme-moustique sur le terrain.....	109
III.3. Extrapolation de l’efficacité des candidats TBV en conditions naturelles	109
III.3.1. Synthèse de l’efficacité des candidats TBV en conditions semi-naturelles... 109	
III.3.2. Les candidats Pfs25 et Pfs230 : une efficacité prometteuse sur le terrain	110
Conclusion 3	112
Conclusion générale et perspectives.....	113
Références bibliographiques.....	117
Annexe.....	129

Liste des tableaux

Tableau I : Détails relatifs aux marqueurs microsatellites	45
Tableau II : Récapitulatif des amorces utilisées pour amplifier les gènes <i>Pf25</i> et <i>Pf230</i>	46
Tableau III: Récapitulatif des données sur les expériences testant le sérum anti-Pfs25	49
Tableau IV : Récapitulatif de l'efficacité des anticorps Pfs25 et Pfs230.....	54
Tableau V : Récapitulatif du génotypage des isolats de <i>Plasmodium</i> Burkina Faso	58
Tableau VI: Récapitulatif de la procédure de dilution de gamétocytes	71
Tableau VII : Récapitulatifs des infections <i>P. falciparum</i> - <i>An. coluzzii</i>	74
Tableau VIII : Récapitulatif des infections <i>P. berghei</i> - <i>An. stephensi</i>	76
Tableau IX: Synthèse des expériences pour mesurer l'efficacité des anticorps <i>13.1</i>	83
Tableau X: Récapitulatif des expériences pour mesurer l'immunité de l'homme.....	98
Tableau XI : Récapitulatif de l'efficacité des anticorps avec et sans l'immunité naturelle ...	100
Tableau XII: Récapitulatif du niveau d'infection à <i>Plasmodium</i> au sein des vecteurs sauvages	106
Tableau XIII: Concordance entre l'infection à <i>Plasmodium</i> dans la population humain et chez les vecteurs sauvages.....	108
Tableau XIV : Doses d'anticorps nécessaires en fonctions des faciès épidémiologiques	112

Liste des figures

Figure 1 Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i> ,	8
Figure 2: Répertoire d'antigènes à potentiel vaccinal contre le paludisme.	11
Figure 3 Description schématique de l'oocinète	17
Figure 4: Schématisation de la dynamique de <i>P. berghei</i> chez le moustique.....	24
Figure 5: Carte des différentes faciès épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso et localisation des sites d'étude.....	30
Figure 6: Processus d'identification de porteurs de gamétocytes.....	31
Figure 7 : Production des moustiques en insectarium	33
Figure 8: Protocole schématique de l'immunisation des souris	35
Figure 9: Dispositif utilisé pour réaliser les infections expérimentales.....	36
Figure 10: schéma général d'une infection expérimentale.....	37
Figure 11: Diagramme d'amplification du gène <i>Pf25</i> et <i>Pf230</i>	46
Figure 12: Diagramme schématisant la réaction de séquence	46
Figure 13: Distribution du nombre d'oocystes dans les expériences testant le sérum anti-Pfs25 au Burkina Faso.....	48
Figure 14: Relation entre l'efficacité du sérum anti-Psf25 et l'intensité de l'infection.....	50
Figure 15 : Comparaison de l'efficacité des anticorps en termes de distribution d'oocystes.....	52
Figure 16 : Distribution d'oocystes au sein des moustiques gorgés sur les anticorps à faible efficacité.	53
Figure 17: Relation entre l'efficacité des anticorps et leur concentration dans le sang.....	55
Figure 18: Représentation graphique de l'efficacité des candidats TBV	56
Figure 19 : profil de séquences nucléotidiques d'un fragment du gène <i>Pf25</i>	59
Figure 20: Description schématique d'une infection expérimentale avec dilution de gamétocytes.....	68
Figure 21: Description schématique de l'infection des souris pour produire les gamétocytes.....	69
Figure 22 : Photos illustratives de l'état d'infection des estomacs d' <i>An. coluzzii</i>	73
Figure 23 : Relation entre la densité de gamétocytes chez l'homme et leur infectivité chez le moustique.	75
Figure 24: Relation entre la gamétocytémie de <i>P. berghei</i> WT chez la souris et l'infectivité chez <i>An. stephensi</i>	77
Figure 25 : Relation entre infectivité des gamétocytes dilués utilisant du sang infecté chauffé ou non infecté comme diluant.	79
Figure 26: Relation entre densités de gamétocytes de <i>P. berghei</i> GFP et leur infectivité chez <i>An. stephensi</i>	80
Figure 27: Distribution des oocystes par séries de dilutions chez des <i>An. stephensi</i> exposés a <i>P. berghei</i> en présence ou non d'anticorps bloquant la transmission	82
Figure 28: Relation entre l'efficacité de l'anticorps 13.1, TRA (A) et TBA (B), et la gamétocytémie. 84	
Figure 29 : Relation intensité-prévalence (Churcher <i>et al.</i> 2012), estimée à partir de 277 expériences d'infections expérimentales de moustiques par des <i>Plasmodium</i> ou SMFA.....	86
Figure 30 : Présentation graphique du village de Soumouso.....	96
Figure 31: Distribution du nombre d'oocystes mettant en évidence l'immunité naturelle de l'homme.	98
Figure 32 : Impact de l'immunité de l'homme sur la sporogonie de <i>P. falciparum</i> chez <i>An. coluzzii</i> ..	99
Figure 33 : Distribution d'oocystes illustrant l'interaction entre immunité naturelle et induite.	100

Figure 34 : Prévalence de l'infection à <i>Plasmodium</i> suivant les 12 mois de l'année.....	102
Figure 35 : Distribution de la densité de <i>Plasmodium</i> dans la population humaine.....	103
Figure 36 : L'analyse détaillée des infections à gamétocytes dans la population d'étude	104
Figure 37 : Distribution du nombre d'oocystes au sein des anophèles sauvages.	106
Figure 38 : Description globale de l'intensité de l'infection au sein des vecteurs sauvages.	107
Figure 39 : Analyse comparative entre les intensités de l'infection au laboratoire et en conditions naturelles.....	110
Figure 40: Analyse graphique pour extrapoler l'efficacité des candidats TBV sur le terrain	111

Sigles et Abréviations

ACT: Artemisinin-based Combination Therapy

AgAPN1 : *Anopheles gambiae* aminopeptidase N

AMA: Apical merozoite antigen

ANKA: Anvers/Kasapa

DAPI: Diamidino-phenylindole

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Fig. : Figure

FITC: fluorescein isothiocyanate

GFP: green fluorescent protein

GFP: Green fluorescent parasite

i.m.: intramusculaire

IFA: immunofluorescence assay

MSP: merozoite surface protein

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

Pf: *Plasmodium falciparum*

Pfs25: *Plasmodium falciparum* surface protein of 25 kDa

Pfs230: *Plasmodium falciparum* surface protein of 230 kDa

Pfs28: *Plasmodium falciparum* surface protein of 28 kDa

Pfs48/45: *Plasmodium falciparum* surface protein of 48 and 45 kDa

pi/h/an : piqure par homme et par an

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TBA: Transmission Blocking Activity

TBV: Transmission Blocking Vaccine

TRA: Transmission Reduction Activity

WHO: World Health Organization

Sélection d'articles

Articles spécifiques au sujet de thèse

1. **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 *Plasmodium falciparum* isolates that have diverse genetic backgrounds. *Infect Immun* **81**, 1984-9.
2. Churcher T.S., Blagborough A.M., Delves M., Ramakrishnan C., Kapulu M.C., Williams A.R., Biswas S., **Da D.F.**, Cohuet A. & Sinden R.E. (2012) Measuring the blockade of malaria transmission-an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int J Parasitol* **42**, 1037-44.
3. **Da D.F.**, Diabaté A., Mouline K., Lefèvre T., Awono-Ambene H.P., Ouédraogo J.B., Dabiré K.R.; *Anopheles rufipes* remains a potential malaria vector after the first detection of infected specimens in 1960 in Burkina Faso; *Journal of Infectious Diseases & Therapy* (accepté)
4. Kapulu M. C., **Da D. F.**, Miura K., Blagborough A. M., Churcher T. S., Williams A. R., Goodman A. L., Sangare I., Turner A. V., Cottingham M. G., Nicosia A., Straschil U., Tsuboi T., Gilbert S. C., Long C. A., Sinden R. E., Draper S. J., Hill A. V. S., Cohuet A., and Biswas S.; Comparative Assessment of Viral-Vectored Transmission-Blocking Vaccine Candidates against *Plasmodium falciparum*. *Science Translational Medicine* (soumis).

Autres articles issus du programme élargi, stratégies de blocage de la transmission

1. Sangare I., R. Dabire, Yameogo B., **Da D. F.**, Michalakis Y. and Cohuet A.; Environment dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. *Proceedings of the Royal Society B* (soumis)
2. Yerbanga R. S., Lucantoni L., Ouédraogo R. K., **Da D. F.**, Yao F. A., Yaméogo K. B., Churcher T. S., Lupidi G., Tagliatela-Scafati O., Gouagna L. C., Cohuet A., Christophides G. K., Ouédraogo J. B. and Habluetzel A.; Transmission blocking activity of *Azadirachta indica* and *Guiera senegalensis* extracts on the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* field isolates in *Anopheles coluzzii* mosquitoes (soumis).

Communications scientifiques

Dari F. Da, Andrew M. Blagborouggh , Luc ABATE , Ibrahim Sangaré, Bienvenue K. Yaméogo , Jean Bosco Ouédraogo, Robert E. Sinden, Yimin Wu, Anna Cohuet (2011). **Malaria transmission-blocking vaccines: effectiveness versus intensity of infection.** Poster à l'Assemblée Générale de l'unité MIVEGEC, 28-29 Juin 2011 à Montpellier / France

Dari F. Da, Andrew M. Blagborouggh, Luc Abate, Ibrahim Sangaré , Bienvenue K. Yaméogo, Jean Bosco Ouédraogo, Robert E. Sinden, Yimin Wu, Anna Cohuet (2012). **Malaria transmission-blocking vaccines: effectiveness versus intensity of infection.** Poster, Journées des Sciences de la Santé de Bobo, Mai 2012 Bobo-Dioulasso/Burkina Faso

Melissa C. Kapulu, **Dari F. Yannick**, Sumi Biswas, Kazutoyo Miura, Andrew M. Blagborough, Andrew R. Williams, Simon J. Draper, Anna L. Goodman, Alison V. Turner, Alfredo Nicosia, Takafumi Tsuboi, Yimin Wu, Sarah G. Gilbert, Anna Cohuet, Robert E. Sinden, Adrian V. Hill (2012). **Comparative Assessment of Transmission Blocking Malaria Vaccine Candidate Antigens Using an Adenovirus-MVA Prime-Boost Regime.** Présentation orale à la 61^e conférence de l'ASTMH 11 – 15 Novembre 2012, Atlanta / USA

Dari F. DA, Melissa Kapulu, Jean Bosco Ouedraogo, Robert Sinden, Adrian Hill, Sumi Biswas, Anna Cohuet (2012). **Efficacy of Transmission Blocking Vaccine candidates in Burkina Faso** Présentation orale à la 61^e conférence de l'ASTMH 11 – 15 Novembre 2012, Atlanta / USA

Dari F. Da, Serge R.Yerbanga, Ibrahim Sangaré, Bienvenue K. Yaméogo, Jean Bosco Ouédraogo, Anna Cohuet (2013). **Malaria epidemiology: gametocyte carriers, the recurrent obstacles in the disease eradication.** Présentation orale à la conférence du "Réseau Ouest-Africain de Recherche en Santé", 5-7 Mars 2013 Ouagadougou / Burkina Faso

Dari F. Da, Melissa C. Kapulu, R. Serge Yerbanga, Ibrahim Sangaré, Bienvenue K. Yaméogo, Thomas S. Churcher, Andrew M. Blagborough, Jean Bosco Ouédraogo, Robert E. Sinden, Adrian V. Hill⁴, Sumi Biswas, Anna Cohuet (2013). **Efficacy of malaria transmission-blocking vaccines in natural epidemiological context.** Présentation orale, à la conférence de "Multilateral Initiative on Malaria" 6-11 Octobre 2013 Durban / South Africa

Dari F. DA, Melissa C. Kapulu, Serge R. Yerbanga, Ibrahim, Sangaé, Bienvenue K. Yaméogo, Thomas S. Churcher, Andrew M. Blagborough, Jean Bosco Ouédraogo, Robert E. Sinden, Adrian V. Hill, Sumi Biswas, Anna Cohuet (2013). **Malaria Plasmodium gametocytes densities in Burkina Faso, implications for implementation of transmission-blocking interventions.** Présentation orale à la 62^e conférence de l'ASTMH 13–17 Novembre 2013, Washington / USA

Résumé

La transmission du *Plasmodium* responsable du paludisme, de l'homme au moustique, a été identifiée comme étant un des maillons les plus faibles de la chaîne qui maintient le cycle du parasite. Interrompre cette étape de la transmission devrait contribuer à limiter l'impact du paludisme. Dans cette optique, l'utilisation de vaccins bloquant la transmission (TBV) est une stratégie de lutte ciblant les formes sexuées et diploïdes du parasite chez le moustique, et est perçue de nos jours comme une stratégie prometteuse à même de contribuer au contrôle de la maladie. Plusieurs antigènes ont été identifiés comme potentiels candidats vaccins et en particulier Pfs25 a fait l'objet d'un essai clinique de phase 1 prometteur. Cependant l'adjuvant a provoqué des allergies chez certains participants. Plus récemment, une nouvelle formulation des molécules vaccinales a été réalisée en utilisant des virus recombinants comme vecteurs d'antigènes et l'immunogénicité de cette formulation a été testée chez des souris. Le sérum humain issu de l'essai clinique ainsi que les anticorps spécifiques obtenus de l'immunisation des souris ont montré une efficacité contre les *Plasmodium* de cultures NF54. Toutefois, une investigation sur l'efficacité de ces TBV sur le terrain reste essentielle. Dans ce document, nous rapportons l'efficacité de cinq candidats TBV évalués en incluant plusieurs variables. Des infections expérimentales ont été réalisées en gorgeant des femelles d'*An. coluzzi* avec du sang de personnes infectées par *Plasmodium falciparum* en présence et en absence des anticorps spécifiques. Puis l'efficacité des candidats TBV a été évaluée en termes d'activité bloquant la transmission (TBA, effet sur la prévalence d'infection des moustiques) et d'activité réduisant la transmission (TRA, effet sur l'intensité de l'infection des moustiques). Des cinq candidats TBV, deux (Pfs230 et Pfs25) ont montré une très bonne efficacité sur les isolats naturels de *P. falciparum* indépendamment de leur profil génétique. Par ailleurs, l'efficacité s'est avérée dépendante du titre d'anticorps et de l'intensité de l'infection chez les moustiques. Comme l'intensité de l'infection semblait être un paramètre important, nous avons, grâce à la méthode de dilution de gamétocytes, étudié son impact sur l'efficacité des candidats TBV. La relation a été modélisée et a montré que la TBA de chaque candidat, paramètre important pour estimer l'impact en termes de transmission, pourra être prédite à partir de la TRA, pour une intensité d'infection donnée, correspondant à un contexte épidémiologique de transmission palustre sur le terrain. Vue l'importance de l'intensité de l'infection, nous l'avons estimée sur le terrain au sein des vecteurs sauvages afin de prédire l'efficacité des candidats TBV en conditions naturelles de transmission palustre. Les intensités observées sur le terrain, bien qu'élevées par rapport à celles mentionnées dans la littérature, restent significativement inférieures à celles obtenues par infection expérimentale. A ce niveau d'infection, nous avons estimé que des titres d'anticorps de 125µg/ml et 250µg/ml respectivement de Pfs230 et Pfs25 suffiraient à bloquer le développement de parasite. Ces deux candidats vaccins s'avèrent donc particulièrement prometteurs pour briser le cycle de transmission du paludisme à long terme. Toutefois, l'efficacité de ces vaccins sur le terrain sera déterminée par leur capacité à stimuler le système immunitaire des hommes pour produire des anticorps à la dose requise pour impacter efficacement la prévalence d'infection palustre.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, *Anopheles coluzzii*, vaccin bloquant la transmission, infections expérimentales.

Abstract

To transmit *Plasmodium* to human, *Anopheles* female mosquito must ingest gametocytes from a first infected human. Target and disrupt this life cycle of the parasite in the mosquito vector, has been demonstrated to contribute to reduce the incidence of disease. Transmission-blocking vaccines (TBV) are one of these new concepts aiming at impeding the parasite sexual development. To date, they are viewed as a promising strategy for breaking the parasite transmission and an important component for achieving malaria elimination and eradication. Several antigens from parasites or mosquitoes surface proteins were identified as potential vaccine candidates. Phase 1 clinical trial conducted for Pfs25 antigens was promising but has been stopped because of adverse event observed in some volunteers. More recently, the leading TBV candidates were differently formulated using recombinant viral vectors to immunized mice. The anti-Pfs25 immune human serum and antibodies specific purified from mice showed efficacy to limit *Plasmodium* NF54 strain transmission to mosquitoes. However, their effectiveness in the field conditions still need to be investigated. In this report we aimed at assessing the efficacy of 5 vaccine candidates against field isolates parasite in natural setting of malaria transmission in Burkina Faso. Direct Membrane Feeding Assays were carried out by exposing *Anopheles coluzzii* females to gametocyte-infected blood from infected patients, and the specific antibodies from TBV were tested at different concentrations added to the infected blood. The vaccine efficacy was evaluated as the percentage of infected mosquito reduction (Transmission Blocking Activity TBA) and the percentage of parasite intensity reduction (Transmission Reduction Activity TRA).

Two of 5 TBV, Pfs25 and Pfs230 showed strong efficacy against natural isolates of *Plasmodium*, independently of their genetic background. In contrast, this efficacy depended on both antibody titer and infection intensity in the control mosquito group. We investigated to assess the relation between vaccine efficacy (TRA and TBA) and intensity of infection, using gametocytes dilution method. A model revealed that the TBA can be predicted from the TRA. For each vaccine candidate, the TRA is constant at a given antibody concentration and thus, is more informative. In contrast, the TBA is more important to conclude about vaccine efficacy for a given intensity of infection which can be assimilated with an epidemiological context in the field. Therefore, the infection intensity in the wild mosquito vectors was assessed in the field to access the efficacy of TBV in the natural condition. A meta-analysis revealed that Pfs230 and Pfs25 antibodies could completely interrupt *Plasmodium* transmission for the titers roughly estimated at 125 μ g/ml and 250 μ g/ml respectively, regarding the parasite load observed in the field.

Our study demonstrated that *Pfs25* and *Pfs230* antigens are valuable candidates for transmission blocking strategies against malaria. An important challenge for transmission blocking vaccine will now be to enhance their immunogenicity in order to reach the required antibody titers in human that will block the transmission of parasites in accordance to the intensity of transmission in natural settings

Key words: *Plasmodium falciparum*, *Anopheles coluzzii*, Transmission-blocking vaccine, Direct Membrane Feeding Assays.

Introduction

Le paludisme (du latin paludis, «marais»), aussi appelé malaria (de l'italien, « mauvais air »), est une maladie infectieuse provoquée par un parasite du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre des femelles de moustiques du genre *Anopheles*. C'est une des plus redoutables parasitoses sévissant depuis des siècles, principalement en zone tropicale. Jusqu'à nos jours, la lutte contre ce fléau repose essentiellement sur la chimiothérapie ciblant le parasite chez l'homme à l'aide des médicaments antimalariques, ainsi que sur des actions visant à réduire la densité et longévité des anophèles vecteurs. Après des centaines d'années d'efforts pour contrôler, voire éradiquer le paludisme, il demeure toujours à l'échelle mondiale un véritable problème de santé publique. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 216 millions le nombre de cas annuels de paludisme dans le monde avec 655.000 décès, dont 86% des cas concernent les enfants de moins de 5 ans (WHO 2012). Cette endémie apparaît comme la plus importante cause de mortalité en Afrique sub-saharienne, où sont localisés 81% des cas et 91% des décès. Au Burkina Faso, le paludisme constitue le premier motif de consultation et d'hospitalisation avec respectivement 36,2% et 54,94% en 2012 (Ministère-Santé 2012). L'impact du paludisme sur le plan économique affecte le monde entier avec environ 12 milliards de dollars alloués chaque année à la lutte contre cette endémie (Greenwood *et al.* 2005). Ainsi, cette maladie est perçue comme une source de pauvreté et de retard pour le développement des pays endémiques (Sachs & Malaney 2002; Chima *et al.* 2003 ; Greenwood *et al.* 2005).

La persistance de la maladie est en partie due à des mécanismes de résistance développés par les parasites face aux médicaments et par les vecteurs face aux insecticides. En raison de l'efficacité partielle des moyens classiques de lutte contre la maladie (résistance de parasite aux antipaludiques et des moustiques aux insecticides), la recherche d'alternatives est d'actualité, visant aussi bien le parasite que le vecteur. Dans ce contexte, la transmission du parasite de l'homme au moustique vecteur a été identifiée comme étant un des maillons les plus faibles, peut-être le plus sensible, de la chaîne qui maintient le cycle du parasite (Lavazec *et al.* 2007). Une des approches pour interrompre cette chaîne de transmission vise à mettre au point des vaccins contre les stades du parasite dans le moustique (Charoenvit *et al.* 1997). Il consiste à immuniser les personnes en zone d'endémie palustre à l'aide d'antigènes du parasite spécifiquement exprimés dans le moustique ou d'antigènes du moustique, pour

bloquer le développement sexué du parasite dans le moustique. Ces vaccins sont dits « bloquant la transmission » (ou TBV pour Transmission Blocking Vaccine). Cette stratégie est prometteuse et des progrès significatifs ont d'ores et déjà débouché sur des essais cliniques. C'est dans ce contexte que nous avons initié l'étude intitulée « **Evaluation expérimentale de l'efficacité des candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme au Burkina Faso** ».

Organisation de la thèse

Ce document, une synthèse de nos travaux de thèse, est structuré en 5 différents chapitres. Le premier chapitre présente une synthèse générale des connaissances actuelles sur le paludisme. Le second chapitre présente les objectifs et le design de l'étude, ainsi que la méthodologie générale. Le chapitre 3 se focalise sur l'évaluation de l'efficacité de principaux candidats vaccins bloquant la transmission en conditions semi-naturelles. Le chapitre 4 décrit les relations entre la densité en gamétocytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV. Le chapitre 5 aborde le niveau de transmission naturelle homme-moustique et ses conséquences sur l'évaluation des TBV. Enfin, le manuscrit est terminé par une conclusion générale faisant la synthèse globale des travaux et des perspectives de recherches.

Chapitre 1 :

Généralités

Chapitre 1 : Généralités

I. Le paludisme

I. 1. Signes cliniques de la maladie

Cliniquement, plusieurs qualifications de l'infection palustre existent. Ainsi, on distingue **le paludisme asymptomatique**, défini par la mise en évidence du parasite dans le sang sans manifestation clinique, et **le paludisme maladie** associant la présence de parasites à des signes cliniques. Les symptômes les plus classiques sont essentiellement les accès fébriles intermittents, les céphalées, et quelques fois des vomissements. En fonction du degré de manifestations (défini par l'OMS), la maladie est qualifiée de **paludisme simple** à **paludisme grave**.

I. 2. Le diagnostic biologique

Dans tous les cas présumés de paludisme, le diagnostic biologique est nécessaire pour confirmer l'infection à *Plasmodium*. Ce diagnostic est basé sur la mise en évidence du parasite, ou de ses métabolites ou encore des anticorps induits par l'infection.

I. 2.1. La microscopie

Son principe est basé sur la mise en évidence du parasite dans le sang du patient. Le mode opératoire consiste à prélever le sang du patient pour réaliser une goutte épaisse (GE) et un frottis mince sur une lame de microscope. Après fixation du frottis mince au méthanol, la lame est colorée dans une solution de Giemsa 10%. Ce réactif a la propriété de se fixer sur le cytoplasme du parasite pour donner une coloration bleue et sur son noyau pour donner une coloration rouge. La lecture se fait au microscope optique à fond clair à l'objectif X100. La microscopie permet en outre d'identifier l'espèce de *Plasmodium* et d'estimer la densité parasitaire (nombre de parasites/ μ l) dans le sang du patient. La microscopie demeure le test de diagnostic de référence avec un seuil de détection d'environ 50 parasites par microlitre de sang (Moody 2002a).

I. 2.2. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (P.C.R)

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la détection d'une séquence spécifique d'acides nucléiques. Elle permet une détection inter ou intra spécifique de *Plasmodium* avec un seuil inférieur à 5 parasites par microlitre de sang (Moody 2002a). Cependant son coût plus élevé que celui de la goutte épaisse et les moyens techniques qu'elle requière limitent sa diffusion comme technique de routine.

I. 2.3. Les tests de diagnostic rapides

Pour simplifier le diagnostic biologique du paludisme, les tests de diagnostic rapides (TDR) par immuno-chromatographie sur bandelette ont été développés (Moody 2002a; Moody & Chiodini 2002b). Précédemment, le principe de ces tests était basé sur la détection d'anticorps sériques anti-*Plasmodium* produits à la suite de l'infection. Cependant certains anticorps sériques persistent dans le sang après l'infection occasionnant souvent des faux positifs (Khairnar *et al.* 2009). Ces dernières années des améliorations ont été réalisées, et le principe s'appuie sur la mise en évidence des antigènes parasitaires exprimées à la surface des hématies infectées (Berry *et al.* 2009). Les TDR sont très simples à réaliser et vont probablement devenir des outils indispensables dans le diagnostic du paludisme.

II. Les *Plasmodium*

II. 1. Systématique

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire de l'embranchement des *Apicomplexa*, de la classe des *Sporozoa*, de l'ordre des *Haemosporida*, de la famille des *Plasmodidae* et du genre *Plasmodium*. Ce genre compte plus d'une centaine d'espèces capables de parasiter les batraciens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères ; cependant, seules cinq espèces sont identifiées comme étant impliquées dans les pathologies humaines. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*. De ces cinq espèces, *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la plus virulente. Elle est responsable de plus de 90% des formes cliniques potentiellement mortelles.

II. 2. Cycle biologique

Le cycle biologique des *Plasmodium* pathogènes pour l'homme exige deux hôtes : l'homme comme hôte intermédiaire chez qui, se succèdent des phases de répliation asexuée, et l'anophèle femelle comme hôte définitif chez lequel s'opère la reproduction sexuée (Fig. 1).

- **Chez l'homme**

Appelé développement schizogonique, la reproduction asexuée est subdivisée en 2 phases :

- La phase hépatique ou pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire : l'homme est infecté lors de la piqûre d'une femelle anophèle qui lui inocule les sporozoïtes. Après une trentaine de minutes, les sporozoïtes, véhiculés par le sang, parviennent au niveau du foie. Dans les hépatocytes, ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires qui, après quelques jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang.

- La phase érythrocytaire : Une fois les mérozoïtes libérés dans le sang, ils pénètrent dans les érythrocytes, subissent une maturation en trophozoïtes, puis en schizontes érythrocytaires et conduisent à la destruction des érythrocytes libérant 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ce cycle érythrocytaire se poursuit de façon synchrone à partir de ces nouveaux mérozoïtes. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée ou gamétocytogénèse. Il en résulte la formation de gamétocytes mâles et femelles qui assureront la reproduction sexuée du parasite chez le moustique vecteur.

- **Chez l'anophèle femelle**

Les gamétocytes ingérés par le moustique lors de son repas sanguin chez un sujet infectieux se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent en un œuf libre ou zygote qui évolue en une forme mobile, l'oocinète. Ce dernier quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisent des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes sont les formes infestantes, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors d'un prochain repas sanguin sur un sujet humain (confère la section « biologie de la transmission » pour plus de détails).

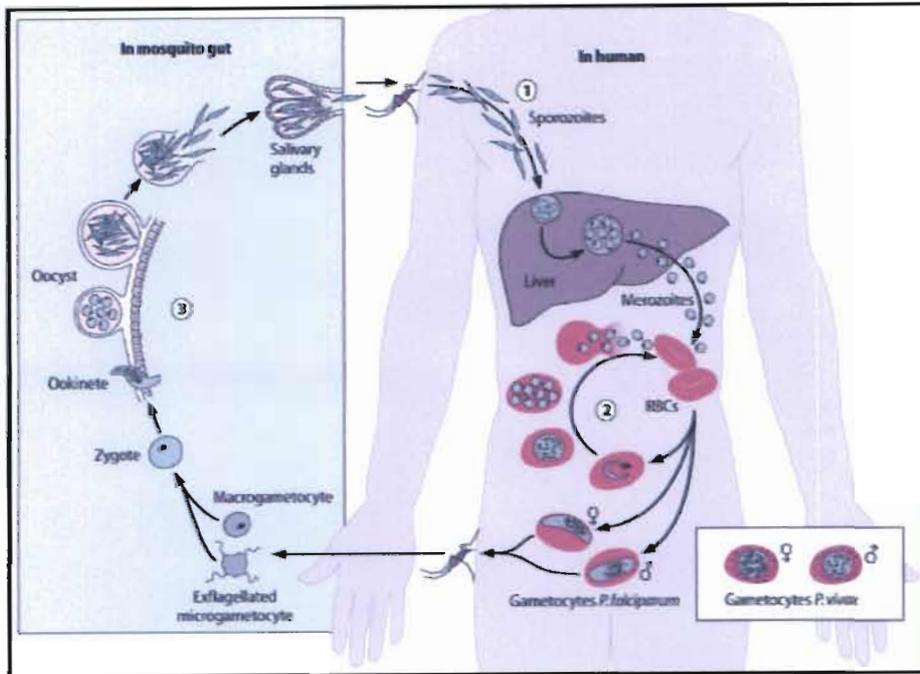


Figure 1 Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*, (Figure modifiée de (Bousema & Drakeley 2011b))

III. Les anophèles

III.1. Systématique

La transmission du parasite à l'homme est assurée par un moustique dont la systématique se présente comme suit : embranchement des *Arthropoda*, classes des *Insecta*, ordre des *Diptera*, famille des *Culicidae*, genre *Anopheles*. On dénombre aujourd'hui au moins 484 espèces d'anophèles parmi lesquelles 68 sont considérées comme des vecteurs de *Plasmodium* humains dans le monde (Harbach 2004). Cette systématique est en constante progression, suivant les nouvelles découvertes génétiques. Récemment, les formes moléculaires M et S du complexe *Anopheles gambiae* ont été érigées en taxons distincts : *An. coluzzii* pour la forme M et *An. gambiae* pour la forme S (Coetzee *et al.* 2013). En Afrique sub-saharienne, on dénombre 6 vecteurs principaux *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili s.l.*, *An. moucheti* et une vingtaine de vecteurs d'importance locale et/ou secondaire. Tous ces vecteurs majeurs, à l'exception d'*An. moucheti*, ont été trouvés au Burkina Faso, repartis selon les zones climatiques et environnementales du pays (Diabate *et al.* 2004; Dabire *et al.* 2012).

III.2. Biologie

La biologie des anophèles vecteurs repose principalement sur les conditions climatiques notamment la pluviométrie, la température, mais aussi sur la nature du sol et la végétation. Leur cycle de vie est caractérisé par la succession de deux phases.

➤ Le stade aquatique ou pré-imaginal : Les anophèles femelles pondent dans l'eau, des œufs fécondés. De chaque œuf éclot une larve qui se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. On distingue quatre stades larvaires appelés L1, L2, L3, L4 et séparés par trois mues larvaires. Le stade larvaire se termine avec la formation d'une forme intermédiaire appelée nymphe.

➤ Le stade imaginal : Au bout de quelques jours, la nymphe effectue une mue particulière, la nymphose conduisant à l'imago, la forme adulte du moustique. Les mâles se nourrissent uniquement de jus sucrés, de nectars et d'autres exsudats végétaux tandis que les femelles se nourrissent, en plus, de sang. Les produits de la digestion du sang sont en effet nécessaires à la maturation des œufs (Mack *et al.* 1979a, 1979b). Ainsi, de part ce besoin nutritif, l'anophèle femelle pique des hôtes vertébrés. C'est lors de ce repas de sang qu'elle peut ingérer ou injecter des parasites.

IV. La lutte contre le paludisme

En raison de l'ampleur désastreuse de la maladie, plusieurs stratégies de lutte sont utilisées, principalement par deux approches : d'une part la lutte contre le parasite par des mesures curatives et préventives, et d'autre part la lutte contre le vecteur, visant à réduire la densité et longévité des vecteurs et le contact homme-vecteur.

IV.1. La lutte antiparasitaire

IV.1.1. Le traitement chimiothérapeutique curatif

Face à la baisse d'efficacité des traitements monothérapeutiques liée à la résistance du parasite aux molécules antipaludiques usuelles, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA, en anglais ACT : Artemisinin-based Combination Therapy) ont été recommandées par l'OMS comme traitement de première intention pour le paludisme simple

(WHO 2002). Il s'agit de deux molécules à effet complémentaire : un dérivé de l'artémisinine très efficace mais avec une très courte demi-vie (l'artéméther, l'artésunate ou dihydroartémisinine) combiné avec une autre molécule à longue demi-vie mais à action lente (telle que l'amodiaquine, la luméfantine, la pipéraquline ou la pyronaridine). Cependant, des cas d'échecs thérapeutiques aux CTA ont été rapportés dans certaines zones endémiques, notamment au Cambodge et en Thaïlande (Dondorp *et al.* 2010).

IV.1.2. La chimiothérapie préventive

De plus en plus, mais dans certaines conditions de transmission, l'OMS recommande la chimiothérapie préventive.

- **La chimioprophylaxie antipalustre** : il s'agit de l'utilisation de médicaments antimalariques à doses sub-thérapeutiques, à des intervalles de temps donnés pour les voyageurs non immuns devant séjourner en zone d'endémie palustre.

- **Le traitement préventif intermittent** basé sur l'administration régulière à des intervalles de temps déterminés de doses thérapeutiques de médicaments antimalariques à des sujets sans tenir compte de la présence ou non de parasites, en zone et/ou période de forte transmission.

IV.1.3. La thérapie vaccinale

Un vaccin efficace contre le paludisme serait une avancée majeure pour l'éradication de la maladie. Cependant, sa mise au point s'avère très compliquée. Ceci est en partie lié aux différentes formes que prend le parasite au cours de son cycle, et au polymorphisme observé pour la plupart des antigènes (Mahajan *et al.* 2005). A ce jour, aucun vaccin efficace n'est disponible mais plusieurs candidats vaccins ciblant des antigènes de différents stades parasitaires sont en cours d'évaluation. La figure 2 répertorie et regroupe par stade parasitaire les différents antigènes susceptibles de constituer des candidats vaccins (Tongren *et al.* 2004). Trois phases du développement parasitaire sont ainsi ciblées par les vaccins en cours d'élaboration :

- la phase pré-érythrocytaire pour bloquer l'infection humaine par les moustiques infectants ;
- la phase sanguine (mérozoïte) pour éliminer les parasites et bloquer l'infection des hématies;
- la phase sexuée pour interrompre le cycle de transmission et limiter la propagation de la maladie. Ces derniers, appelés vaccins bloquant la transmission font l'objet de cette thèse.

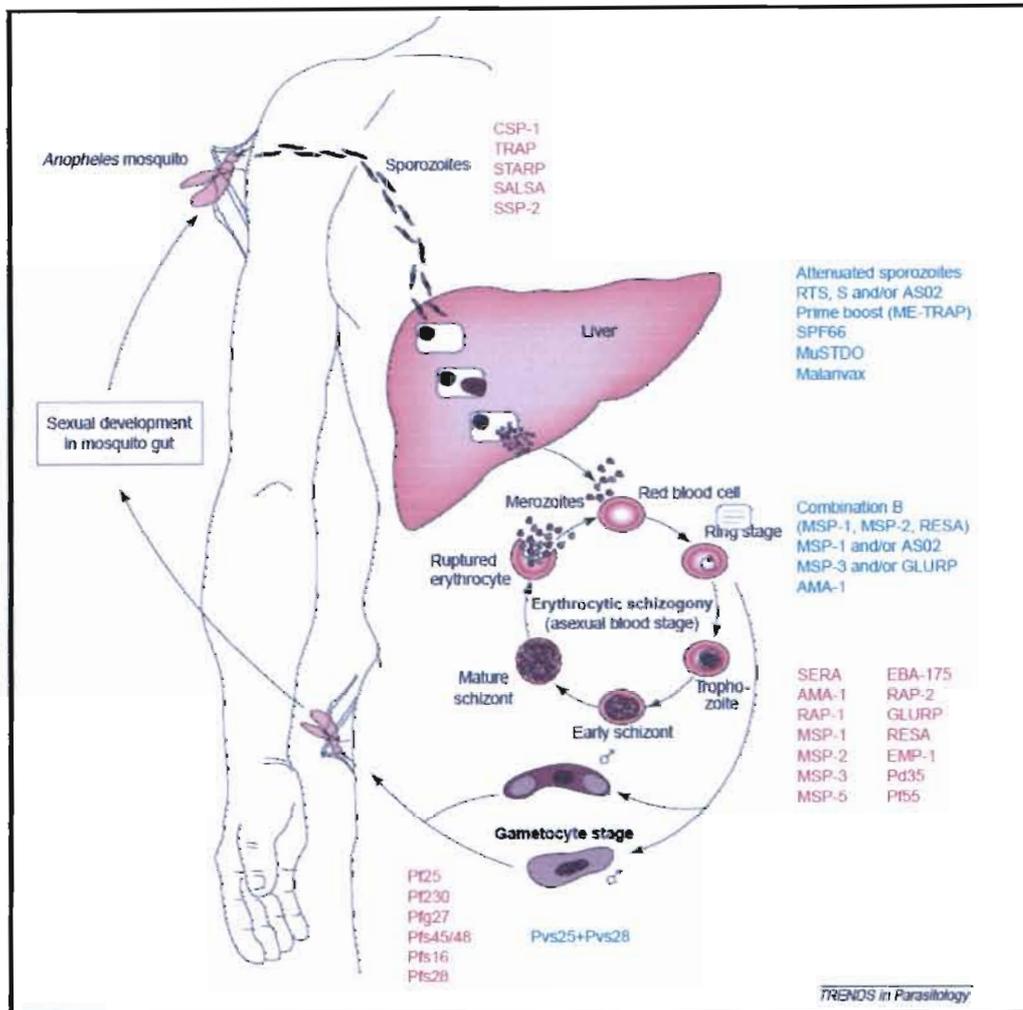


Figure 2: Répertoire d'antigènes à potentiel vaccinal contre le paludisme. Suivant les stades du *Plasmodium*, plusieurs molécules antigéniques ont été identifiées comme candidats vaccins (désignées en rouge). Les désignations en vert sont les vaccins en cours d'essais cliniques. (Thera *et al.* 2011).

Parmi les candidats vaccins en cours d'évaluation, le vaccin RTS,S/AS basé sur la protéine de surface circumsporozoite (CSP) est le plus avancé. Actuellement, il est en essai clinique de phase 3 dans 7 pays africains y compris le Burkina Faso (une équipe de l'IRSS). Les premiers résultats révèlent une efficacité de 57% chez les enfants de 5 à 17 mois (Agnandji *et al.* 2011) et 35% en moyenne chez les nouveaux nés de 6 à 12 semaines (Agnandji *et al.* 2012), et les résultats définitifs sont attendus pour 2014. Un autre candidat vaccin, FMP2.1/AS02A, est une protéine recombinante (FMP2.1) basée sur l'antigène 1 de la membrane apicale (AMA-1). Ce vaccin est actuellement en phase 2 d'essai clinique au centre du Mali, à Bandiagara. Les résultats de la phase 1 montrent une bonne immuno-tolérance et une immunogénéicité chez les volontaires vaccinés (Thera *et al.* 2011).

IV.2. La lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle se base sur l'indice de transmission RO défini comme le nombre de nouveaux cas d'infection attendus à partir d'un cas humain infectant, formulé par l'équation suivante (Macdonald *et al.* 1956).

$$RO = \frac{ma^2 \cdot p^n}{-\ln p} * bc * \frac{1}{r} \quad \text{Avec} \quad \frac{ma^2 \cdot p^n}{-\ln p} = \text{Capacité vectorielle} ; bc = \text{compétence vectorielle}$$

(m : densité de vecteurs ; a : nombre de repas journalier pris sur homme ; p : taux quotidien de survie d'une population ; n : durée du développement sporogonique ; bc : facteurs génétiques, susceptibilité du vecteur ; r : taux de négativation de l'hôte ou $1/r$ = durée de la période infectieuse pour les moustiques).

Réduire totalement ou partiellement une des composantes de l'indice de transmission revient à diminuer ou à stopper la transmission du paludisme.

En pratique, la lutte anti-vectorielle consiste à établir des barrières physicochimiques, par l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) ou de répulsifs sous formes d'aérosols ou de crèmes, réduisant ainsi le contact entre l'homme et le vecteur.

En parallèle, plusieurs stratégies de lutte ont été élaborées pour réduire la densité de moustiques : la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations, l'épandage de larvicides dans les gîtes ou l'assainissement des cadres de vie. L'utilisation des insecticides a été très efficace dans le passé et a même permis l'élimination du paludisme dans certaines parties du monde. Mais de nos jours la résistance accrue des vecteurs aux différents insecticides compromet l'efficacité de cet outil de lutte (Badolo *et al.* 2012; Namountougou *et al.* 2012), d'où la nécessité de trouver autres moyens de lutte beaucoup plus efficaces.

Une autre approche en cours d'étude pour lutter contre les vecteurs est la technique de l'insecte stérile (SIT) pour limiter la reproduction (Helinski *et al.* 2008; Munhenga *et al.* 2011). Le principe est de lâcher dans la nature des anophèles mâles rendus stériles par des produits chimiques ou par des radiations ionisantes (Helinski *et al.* 2006). Ces mâles lâchés en masse devront rentrer en compétition sexuelle avec les mâles sauvages. Les femelles anophèles ne s'accouplant en général qu'une seule fois dans leur vie, l'accouplement avec un mâle stérile engendrera une chute de la taille de la population. Cette technique qui a connu des succès dans la lutte contre les glossines vecteurs de la trypanosomiase (Vreysen *et al.* 2000) est toujours en étude pour les anophèles.

IV.3. Nouvelles stratégies : bloquer le développement du parasite chez le vecteur

Les résistances accrues du parasite à la chimiothérapie et du vecteur aux insecticides compromettant le contrôle du paludisme, la communauté scientifique s'est orientée vers d'autres alternatives pour la lutte contre le paludisme. Ainsi, le concept de bloquer la chaîne de transmission homme – moustique est apparu, avec l'idée d'éliminer le parasite chez le moustique. Connue sous l'appellation d'Intervention Bloquant la Transmission (TBI pour Transmission Blocking Intervention), cette approche ancienne connaît un regain d'intérêt actuellement face au succès limité des autres stratégies. Les interventions bloquant la transmission peuvent être de plusieurs formes.

IV.3.1. Utilisation de microorganismes bloquant la transmission

Il a été rapporté que certains microorganismes de la flore intestinale du moustique, principalement des bactéries et microchampignons, ont une activité inhibitrice sur le développement des *Plasmodium* par des mécanismes encore peu connus (Dong *et al.* 2009; Fang *et al.* ; Hughes *et al.* 2011; Cirimotich *et al.* 2011a; Cirimotich *et al.* 2011b; Boissiere *et al.* 2012). Des études cherchent à évaluer les interactions entre microorganismes pour éventuellement exploiter leurs potentiels de blocage du parasite comme stratégie de contrôle biologique. En pratique, il s'agirait de sélectionner, produire et introduire de tels microorganismes dans les gîtes larvaires naturels dans l'optique d'obtenir des moustiques sauvages intégrant cette microflore capable de bloquer le développement parasitaire. Cela permettrait alors de diminuer la transmission vectorielle (Beard *et al.* 1998).

IV.3.2. Approches utilisant des moustiques génétiquement modifiés

Le concept de moustique génétiquement modifié vise à mettre au point des moustiques réfractaires aux infections à *Plasmodium*, en se basant sur l'insertion de gènes d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur dans le génome du moustique. Ces gènes seraient sélectionnés pour leur capacité à générer des moustiques réfractaires à l'infection plasmodiale et leur effet limité sur la valeur sélective (fitness) du moustique. Le transgène devra être exprimé dans les tissus adéquats (l'intestin, corps gras ou glandes salivaires,) pour cibler le parasite durant son développement (Ito *et al.* 2002; Yoshida & Watanabe 2006; Chen *et al.* 2007). Des études ont montré la faisabilité à l'échelle du laboratoire (Sumitani *et al.* 2013), mais la question cruciale

demeure la diffusion des transgènes dans les populations naturelles de moustiques, considérant les contraintes liées à l'éthique, à l'écologie, à la génétique et la biologie évolutive du système vecteur/parasite.

IV.3.3. Médicaments bloquant la transmission

Une autre approche de la stratégie bloquant la transmission est la recherche des médicaments pouvant interrompre le développement sporogonique du parasite. Il s'agit en l'occurrence des molécules pharmaceutiques ou dérivés naturels de plantes qui agissent sur les formes sexuées ou diploïdes des parasites (gamétocytes, gamètes, zygotes, oocinètes, oocystes) pour rompre le cycle de la transmission. De nos jours, des progrès significatifs ont été réalisés avec l'identification de plusieurs molécules à potentiel de blocage (Ponsa *et al.* 2003; Wells *et al.* 2009). Il a été dit que les ACTs et certaines molécules notamment la primaquine agissent également sur les gamétocytes, (Butcher 1997 ; Pukrittayakamee *et al.* 2004; White 2008; Kiszewski 2011). Bien que des travaux soient en cours dans ce domaine, il n'existe pas encore de médicaments disponibles bloquant véritablement la transmission (Kiszewski 2011).

IV.3.4. Vaccins bloquant la transmission (TBV)

Le concept de vaccin bloquant la transmission tire son origine des travaux de Carter et Gwadz sur la transmission du paludisme chez les oiseaux (*Plasmodium gallinaceum*) (Carter & Chen 1976; Gwadz 1976). Indépendamment l'un de l'autre, ces deux auteurs ont montré que des poulets vaccinés avec des gamètes de *Plasmodium* développaient une immunité qui bloquait le développement sporogonique du parasite chez le moustique. A l'issue de ces observations, plusieurs travaux ont été développés sur les aspects immunologiques du paludisme humain ainsi que d'autres modèles, afin d'identifier les antigènes parasitaires responsables de cette immunité limitant la transmission (Rener *et al.* 1983; Carter & Kaushal 1984; Kaslow 1997). Le vaccin bloquant la transmission a pour principe de stimuler chez les humains la production d'anticorps anti-*Plasmodium* ou anti-moustique capables de bloquer le développement du parasite chez le moustique pour ainsi rompre la transmission du paludisme. Cette stratégie constitue l'objet de cette thèse. En raison de l'origine des TBV étroitement liée au développement sporogonique de *Plasmodium*, il nous est apparu nécessaire de décrire la biologie de la transmission des parasites de l'hôte vertébré au moustique afin de présenter les différents candidats vaccins à tester.

V. Biologie de la transmission

V.1. Gamétoctogénèse

Les gamétoctes sont les formes sexuées de *Plasmodium* qui assurent la transmission du parasite de l'hôte vertébré au moustique. Ils proviennent de la différenciation des formes asexuées des parasites sanguins par gamétoctogénèse. Certains auteurs parviennent à la conclusion que la gamétoctogénèse intervient suite à des conditions stressantes de l'environnement du parasite dans l'hôte humain (Dyer & Day 2000; Baker 2010; Bousema & Drakeley 2011b). Ce stress serait généré par de fortes charges en parasites asexués (Bruce *et al.* 1990a), l'anémie de l'hôte, les traitements à dose sub-curative ainsi que certains antimalariques à action lente (von Seidlein *et al.* 2001). Cette différenciation aboutit à la formation de gamétoctes mâles (ou microgamétoctes) et femelles (ou macrogamétoctes), et seuls ceux ayant acquis une maturité fonctionnelle au terme d'un phénomène dit de « capacitation » peuvent infecter les anophèles (Boyd 1949).

V.2. Gamétoctogénèse et fécondation

Quelques minutes après leur ingestion par le moustique au cours d'un repas sanguin chez un individu infecté, les gamétoctes intracellulaires émergent des hématies et entament une phase de changements morphologiques et physiologiques, la gamétoctogénèse (Sinden 1983). Encore appelée activation, elle est principalement induite par la chute de température lors du passage du sang de l'homme à l'estomac du moustique et la présence de l'acide xanthurénique produit par l'estomac du moustique (Billker *et al.* 1997; Billker *et al.* 1998). A ces facteurs déterminants s'ajoute également la variation de pH, entre le sang chez l'hôte humain et le sang ingéré (Billker *et al.* 2000). L'activation des macrogamétoctes consiste en une modification morphologique aboutissant à la formation d'un volumineux macrogamète d'aspect globulaire. En revanche, la gamétoctogénèse chez les microgamétoctes implique trois réplifications du génome et aboutit à la formation de huit microgamètes par fission, décrite par le terme d'exflagellation (Carter & Nijhout 1977). A la fin du processus, les gamètes mâles nagent activement grâce à leur flagelle dans le bol alimentaire à la rencontre de gamètes femelles. Environ une heure après le repas sanguin, la fécondation intervient par la fusion des deux gamètes et l'appariement des deux génomes parentaux pour former un œuf diploïde ou zygote (Sinden 1999a). La fécondation peut être croisée (lorsque ces génomes sont différents)

ou une autofécondation a lieu si les génomes sont identiques (c'est-à-dire provenant d'un même clone). Cependant, le processus qui gouverne la rencontre des gamètes est un aspect de la fécondation encore très peu connu. A l'état actuel des connaissances, on ignore encore s'il s'agit d'un phénomène aléatoire ou d'un tropisme suite à des sécrétions chimiques attractives (Robert *et al.* 1995; Haji *et al.* 1996).

V.3. Oocinète

Le zygote issu de la fécondation, entame sa différenciation par un bourgeonnement en un point qui deviendra une extrémité antérieure d'un complexe apical de l'oocinète. Cette métamorphose transite par des stades intermédiaires dits "forme ronde" et "stade retort", tous observables par immunofluorescence (Gouagna *et al.* 1999). A environ 12-17 heures après le repas sanguin à 27°C, l'oocinète mature de *P. falciparum*, présente une forme allongée semblable à celle d'une banane, avec une polarité antéropostérieure et est muni d'un complexe locomoteur (Fig. 3). De tous les stades parasitaires intra-stomacaux, l'oocinète mature est sans doute le plus vulnérable du fait d'un environnement enzymatique hostile et de la traversée des deux barrières physiques, la membrane péritrophique et l'épithélium stomacal (Yeates & Steiger 1981; Billingsley & Rudin 1992; Sinden 2004a). En effet, l'estomac du moustique est le siège d'une intense activité protéolytique dont le pic se situerait entre 24 -30 heures après le repas de sang, coïncidant avec la fin de formation des oocinètes (Gass & Yeates 1979a). Pour se maintenir et poursuivre son développement, l'oocinète devra dépasser cette étape. Alors, grâce à plusieurs procédés incluant l'action d'enzymes lytiques adaptées, il traverse la membrane péritrophique et l'épithélium stomacal, et se loge entre les cellules épithéliales de l'estomac et leur lame basale où il se différenciera plus tard en oocyste. A ce jour, les mécanismes moléculaires régissant cette traversée restent encore très discutés. Toutefois, plusieurs molécules membranaires de l'estomac du moustique ont été identifiées comme récepteurs, reconnus par l'oocinète, lui permettant de se fixer et de déclencher une sécrétion enzymatique destinée à lui frayer un passage (Kadota *et al.* 2004; Baton & Ranford-Cartwright 2005a, 2005b; Kariu *et al.* 2006). Un exemple de protéine membranaire de l'estomac du moustique est l'AgAPN1 (*Anopheles gambiae* aminopeptidase N) actuellement perçue comme un potentiel antigène candidat dans la mise en œuvre du vaccin bloquant la transmission TBV (Dinglasan *et al.* 2007a). Cet antigène fait partie des candidats vaccins à tester dans notre travail.

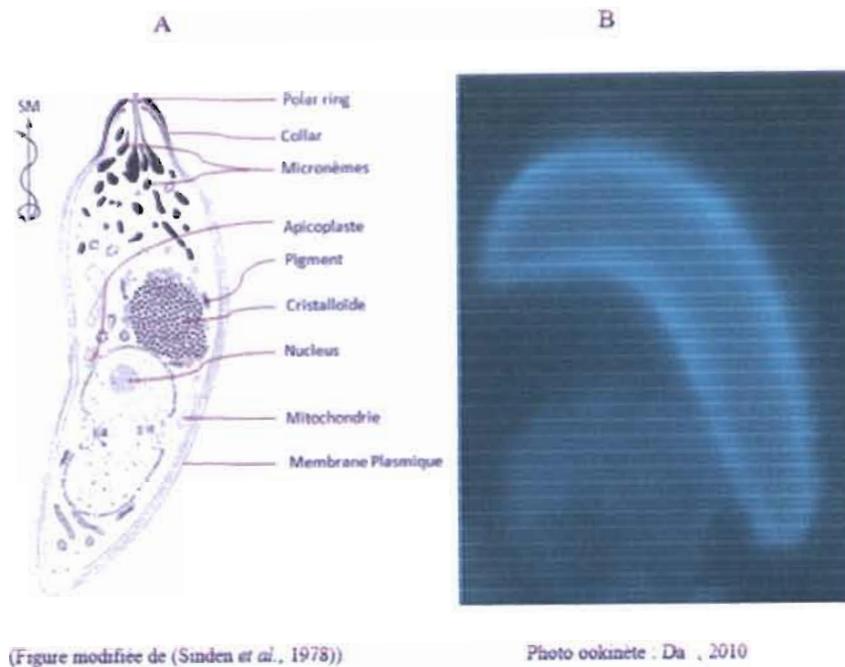


Figure 3 Description schématique de l'ocinète
 (A) l'ultra-structure et (B) photographie de l'ocinète de *P. berghei* GFP. SM = sens du mouvement

V.4. Oocyste – sporozoïte

Au cours de sa traversée, l'ocinète parvient à des sites de reconnaissance et de fixation sur la membrane basale (Warburg & Miller 1991; Vlachou *et al.* 2006) qui induiraient le signal pour l'arrêt de sa progression (Vlachou *et al.* 2005). Ainsi logé entre l'épithélium stomacal et la lame basale, l'ocinète perd sa mobilité et forme une structure sphérique protégée par une membrane souple, l'oocyste. Ce dernier devient le siège d'une duplication génomique qui se renouvelle sans isolement par des structures membranaires : c'est un syncytium issu de 13 divisions mitotiques devant aboutir à la formation d'environ 8000 sporozoïtes par oocyste ($2^{13} = 8192$) (Vaughan *et al.* 1992). Ainsi, logé contre la paroi stomacale, l'oocyste grossit régulièrement en prélevant des nutriments dans l'hémolymphe, principalement les produits de digestion de l'hémoglobine ingérée lors du repas sanguin (Mack *et al.* 1979a, 1979b). La membrane s'amincit au fur et à mesure que l'oocyste se développe jusqu'à atteindre un diamètre de l'ordre de 20 à 60 μ au bout de 9 à 15 jours, selon la température extérieure (Sinden & Croll 1975). Dans l'oocyste, des secteurs cytoplasmiques appelés sporoblastes apparaissent, dans la périphérie desquels se différencient les sporozoïtes résultant chacun d'un noyau cellulaire du syncytium. A maturité, l'oocyste libère les sporozoïtes dans l'hémocèle et

ceux-ci circulent dans tout le corps du moustique. Certains pénètrent dans les glandes salivaires pour se loger dans les acini d'où ils seront injectés lors d'un prochain repas sanguin

V.5. Quelques aspects physiologiques importants du développement sporogonique

Le développement sporogonique de *Plasmodium* est couplé à un ensemble de phénomènes structuraux et physiologiques très complexes, notamment la synthèse par le parasite, des protéines indispensables pour la survie et le développement du parasite. Parmi de nombreuses protéines mentionnées dans la littérature, seules celles ayant un intérêt connu dans la mise en œuvre de TBV contre *P. falciparum* seront décrites dans cette partie.

- Dès la gamétocytogénèse chez l'homme, le parasite s'implique dans une activité intense de synthèses protéiques indispensables à son développement. Des protéines de surface (Pfs pour *Plasmodium falciparum* Surface-protein), au nombre desquelles Pfs48/45 et Pfs230, ont été identifiées sur les gamètes de *P. falciparum* (Carter *et al.* 1984; Vermeulen *et al.* 1985a; Scherf *et al.* 1992). Elles sont synthétisées pendant la gamétocytogénèse comme antigènes internes non fonctionnels chez les gamétocystes, et apparaissent sur la surface seulement à partir des stades gamètes. Leur structure et leur importance pour le parasite ont été rapportées dans plusieurs études. La protéine Pfs230, est impliquée dans le processus d'exflagellation des gamètes mâles (Eksi *et al.* 2006). Bloquer l'activité de cette protéine revient à inhiber l'exflagellation des microgamètes, et par conséquent, à rompre le processus de fécondation. De même, il a été démontré que la protéine Pfs48/45 est indispensable pour la fertilité des microgamètes (van Dijk *et al.* 2001; van Dijk *et al.* 2010). Ces protéines antigéniques induisent une réponse immunitaire humorale chez des sujets porteurs de gamétocytes avec la production des anticorps anti-*Plasmodium* (Kumar & Carter 1984; Carter & Mendis 1991). Dans plusieurs travaux, il a été démontré que les anticorps résultant de cette immunité inhibent ou bloquent le développement du parasite chez le moustique (Gouagna *et al.* 2004; Bousema *et al.* 2011a). Ainsi, de part leur fonction vitale et leur caractère immunogène, les antigènes Pfs230 et Pfs48/45 ont été identifiés comme des candidats vaccins bloquant la transmission et font partie des protéines testées au cours de notre travail.

- Après la fécondation, alors que le zygote perd les protéines spécifiques du stade gamète, l'oocinète synthétise et exprime à sa surface de nombreuses protéines dont Pfs25 et Pfs28. Ces deux dernières, les plus abondantes à la surface de l'oocinète de *P. falciparum* (Kumar & Carter 1984) sont indispensables à sa formation et la protège contre les sécrétions

acides dans le bol alimentaire (Kaslow *et al.* 1988; Tomas *et al.* 2001). Elles jouent également un rôle important dans l'adhésion et la traversée de l'épithélium stomacal en se fixant sur un ligand, la calreticuline et interviennent plus tard dans la transition de l'oocinète en oocyste (Tomas *et al.* 2001; Rodriguez Mdel *et al.* 2007). La séquence pratiquement invariable du gène *Pf25* et les multiples fonctions de la protéine Pfs25 ont fait de cet antigène une molécule d'intérêt pour la formulation de vaccins bloquant la transmission (Sinden 1998). C'est un néo-antigène non exprimé chez l'hôte vertébré ; théoriquement il n'est donc pas soumis à une pression immunitaire chez l'homme. Cependant l'homme peut être immunisé vis-à-vis de cet antigène et générer les anticorps spécifiques à celui-ci si il est artificiellement mis en contact par vaccination. Cette possibilité a été testée dans plusieurs études utilisant des anticorps monoclonaux marqués anti-Pfs25 qui se sont révélés efficaces en se fixant sur les antigènes, inhibant ainsi ses fonctions (Carter *et al.* 2000; Rodriguez Mdel *et al.* 2007). L'efficacité de ce candidat vaccin a été évaluée au cours de nos travaux de thèse.

V.6. Facteurs influençant le développement sporogonique

Le développement sexué du *Plasmodium* chez l'anophèle est un processus dynamique qui fait intervenir plusieurs composantes incluant à la fois les conditions environnementales, le parasite, l'homme et le moustique (Sinden 1983; Sinden *et al.* 1996; Sinden 1998). Leurs interactions créent un cadre favorable ou hostile, dans lequel le parasite doit évoluer. Nous avons souhaité intégrer notre étude dans un contexte proche des conditions naturelles. Il nous a donc paru nécessaire d'aborder le système vectoriel dans son ensemble ainsi que certains des facteurs naturels susceptibles de l'affecter.

V.6.1. Facteurs liés au parasite

Un certain nombre de facteurs liés au parasite ont été identifiés pour expliquer le rendement du développement sporogonique. Une condition primordiale de l'infection d'une femelle d'anophèle par *Plasmodium* est l'âge des gamétocytes : seuls les gamétocytes mûres sont capables d'infecter le moustique (Lensen *et al.* 1999). Ensuite, la relation entre densité gamétocytaire et l'infectivité des moustiques a été longtemps très discutée sans pour autant aboutir à un consensus. Ceci est certainement dû à l'usage de différents systèmes biologiques (parasite - vecteur) et aux conditions expérimentales très variables. Se référant au système

biologique *P. falciparum-An. gambiae*, les fortes gamétocytemies sont celles qui réussissent le mieux à infecter les moustiques pour bon nombre d'auteurs (Boudin *et al.* 1989; Vaughan *et al.* 1994; Gouagna *et al.* 1998). Cependant, la relation réelle entre la densité de gamétocytes et leur infectivité demeure toujours une question à élucider. En dehors de l'âge et la densité de gamétocytes, leur sex-ratio module également le succès de l'infection (Paul *et al.* 2002; Reece *et al.* 2008; Mitri *et al.* 2009). Habituellement, ce ratio présente une prédominance de gamétocytes femelles ; un déséquilibre qui est biologiquement compensé au stade gamète par la production de 8 microgamètes par gamétocyte mâle, alors que les gamétocytes femelles produisent chacun un macrogamète. La condition optimale d'infectivité serait celle d'un gamétocyte mâle pour 3 à 6 femelles (Robert & Boudin 2003). Par conséquence, une importante disparité de ce ratio entre les sexes, pourrait affecter négativement le succès de l'infection. Aussi, les interactions génétiques entre espèces parasite/moustique sont susceptibles d'affecter le développement sporogonique du parasite (Lambrechts *et al.* 2005; Harris *et al.* 2010). Enfin, la mixité de l'infection (infections mixtes *versus* clonales) et la distribution agrégée des gamétocytes dans le bol sanguin pourraient influencer l'infectivité des parasites (McKenzie & Bossert 1997; Pichon *et al.* 2000; Reece *et al.* 2008; Nsango *et al.* 2012).

V.6.2. Facteurs liés au moustique

Tous les moustiques du genre *Anopheles* ne sont pas aptes à transmettre le paludisme. La transmission requière une coadaptation entre vecteur et parasite, d'où la notion d'**espèces réfractaires** et d'**espèces susceptibles ou espèces compétentes** définies par Kilama et Craig (Kilama & Craig 1969). En effet, la compétence vectorielle est la permissivité du vecteur pour le parasite. Elle peut dépendre de différentes interactions : lors de son développement chez le moustique, le *Plasmodium* se heurte aux barrières physiques, (membrane péritrophique, épithélium stomacal, épithélium des glandes salivaires), et aux mécanismes de défense humorale ou cellulaire mis en place par le moustique. Cette réaction immunitaire, dans ses différentes composantes, diffère selon les individus au sein de la même espèce et est en partie responsable de la chute du nombre de parasites observée lors de la transition oocinète-oocyste. Ces composantes immunitaires, très étudiées, incluent la mélanisation/encapsulation (Collins *et al.* 1986; Paskewitz *et al.* 1988; Paskewitz & Riehle 1998) et la production de molécules antiparasitaires telles que les lectines/agglutinines (Vernick *et al.* 1995; Richman *et*

al. 1996). Les récentes avancées technologiques ont permis d'identifier des facteurs génétiques qui contrôlent l'immunité du moustique (Christophides *et al.* 2002; Osta *et al.* 2004; Michel *et al.* 2005; Riehle *et al.* 2006) ainsi que les mécanismes moléculaires ou cellulaires développés par celui-ci pour neutraliser le parasite. En somme, le système de défense développé par le moustique affecte considérablement le rendement parasitaire du cycle sporogonique. Aussi, le niveau de transmission varie d'une espèce susceptible à une autre selon la capacité vectorielle (voir encadré page 12). De part sa compétence vectorielle et capacité vectorielle, *An. gambiae* a été identifié comme le vecteur le plus important dans la transmission de paludisme en Afrique (Fontenille *et al.* 2003; Fontenille & Simard 2004).

V.6.3. Facteurs liés à l'homme

Plusieurs facteurs humains, dont l'immunité humorale ou cellulaire, ainsi que des facteurs génétiques, influencent le développement du parasite au sein du moustique. En effet, après le repas sanguin, les gamétocytes se libèrent des érythrocytes et se retrouvent dans le bol alimentaire au contact de l'environnement immunitaire et cellulaire des hôtes. Les antigènes de surface parasitaire deviennent accessibles aux anticorps naturels humains (anti-Pfs230, anti-Pfs48/45) également absorbés par le moustique pendant la prise du repas de sang. Les réactions immunologiques qui en résultent, affectent le parasite en réduisant son aptitude à se développer (Gouagna *et al.* 2007). L'effet de ces anticorps sur le parasite constitue l'immunité naturelle bloquant la transmission, origine du concept TBV. Certains facteurs génétiques notamment les formes drépanocytaires de l'hémoglobine, favorisent la formation des gamétocytes chez les personnes, et facilitent le développement sporogonique (Robert *et al.* 1996; Gouagna *et al.* 2010).

VI. Le vaccin bloquant la transmission pour lutter contre le paludisme

VI.1. Evolution du concept des TBV

Après une trentaine d'années de recherche sur les TBV, plusieurs antigènes notamment les protéines de surface du parasite et de l'estomac du moustique ont été identifiées, comme molécules à potentiel vaccinal (Tomas *et al.* 2001). Cependant, l'approche des TBV a longtemps été confrontée à un scepticisme du fait que ce type de vaccin ne protège pas

l'individu contre l'infection contrairement aux vaccins classiques (Hill 2011). Ce concept était de ce fait moins attractif pour les investisseurs qui espéraient à terme commercialiser un vaccin pour les voyageurs internationaux (Hill 2006). Cependant, avec les objectifs d'éradication et d'élimination du paludisme annoncés en 2007, il y a eu un remaniement substantiel des priorités dans les programmes de recherche sur le paludisme, y compris la redéfinition des priorités relatives entre les différents types de vaccins (Greenwood 2008). L'introduction des nouvelles approches de lutte a ainsi suscité un engouement de la communauté scientifique vers le concept de TBV. La mise au point d'un tel vaccin pourrait constituer une approche prometteuse et susceptible de participer à la stratégie actuelle de contrôle du paludisme.

VI.2. Principe et mode d'action

Les protéines antigéniques de part leur localisation et leur stade d'expression, sont très peu (ou pas) accessibles par le système immunitaire de l'homme en conditions naturelles. Le principe des vaccins bloquant la transmission est que ces antigènes formulés sous forme de molécules immunogènes et administrés à l'hôte humain, stimulent le système immunitaire de celui-ci. Il produit alors des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène utilisé. Contrairement à l'action des vaccins classiques, la personne immunisée contre l'antigène génère des anticorps qui ne la protègent pas contre une nouvelle infection. Cependant, à l'issue d'une infection de cette personne par le *Plasmodium*, il pourrait se former les gamétocytes (formes transmissibles aux moustiques). Lors d'un repas sanguin du moustique sur ce sujet vacciné portant les parasites, les anticorps anti-*Plasmodium* sont ingérés en même temps que les gamétocytes. Lorsque ces antigènes apparaissent à la surface du parasite chez le moustique, ils deviennent alors accessibles aux anticorps absorbés qui reconnaissent et se fixent aux protéines antigéniques. Cette fixation inhibent ou bloquent certaines fonctions physiologiques indispensables de ces protéines, rompant ainsi le cycle de transmission du parasite à un nouveau sujet. Les vaccins bloquant la transmission sont donc dits être des vaccins altruistes de par leur mode d'action.

VI.3. Les atouts dans la recherche de vaccins bloquant la transmission

Le nombre limité de parasites : Sous la pression immunitaire des deux hôtes au cours du développement parasitaire dans le moustique, et des barrières physiques à traverser par le parasite, le nombre de parasites subit un goulot d'étranglement et atteint son plus bas niveau au stade oocyste (Sinden 1999b) (Fig.4). En conséquence, plutôt que d'avoir à éliminer des milliards de parasites érythrocytaires asexués circulant dans l'hôte humain, le vaccin bloquant la transmission aura, d'un point de vue quantitatif, à empêcher la formation des quelques oocystes dans le moustique (en général moins de 10) (Sinden 2010a).

Des antigènes peu polymorphes : En plus de la chute drastique du nombre de parasites, des investigations ont montré que la plupart des protéines antigéniques identifiées pendant la sporogonie sont très peu (ou pas) polymorphes (Williamson & Kaslow 1993; Hafalla *et al.* 1997; Escalante *et al.* 1998; Niederwieser *et al.* 2001). Ceci suscite l'espoir de pouvoir couvrir une large population de parasites avec un seul vaccin.

Efficacité du vaccin, simple à évaluer : c'est le seul vaccin pour lequel il est aisé d'évaluer dans le vecteur naturel, l'efficacité des anticorps induits chez l'hôte intermédiaire (l'homme). En effet, pour un individu immunisé, l'efficacité des anticorps peut être testée directement à partir de son sang s'il est lui-même infecté, ou indirectement en utilisant son sérum pour le tester en combinaison avec des parasites de diverses origines (Sinden 2010a ; Bousema *et al.* 2013). Ceci lève l'un des principaux obstacles au développement de vaccins anti-*Plasmodium*, notamment les limites liées à l'éthique.

Protection de toute une population : Bien que le vaccin bloquant la transmission seul ne protège pas directement la personne vaccinée, il protège cependant toute la communauté environnante contre l'infection palustre en bloquant la transmission homme-moustique (Sinden 2010a). Il se révèle donc être un outil promoteur pour limiter la propagation du paludisme.

Limitation des parasites chimio-résistants : En éliminant les parasites chez le moustique, le TBV pourrait limiter l'évasion et l'expansion des souches parasitaires résistantes à la chimiothérapie chez l'hôte humain, mais sensibles à l'action des anticorps du vaccin (Dinglasan & Jacobs-Lorena 2008).

Renforcer l'efficacité d'autres vaccins : combiné à d'autres candidats vaccins (phase hépatique ou sanguine), le TBV pourrait agir de façon complémentaire en éliminant les parasites échappant à l'action de ces vaccins classiques chez l'homme. Ainsi, il pourrait potentialiser l'efficacité de vaccins classiques grâce à une co-formulation (Carter 2001).

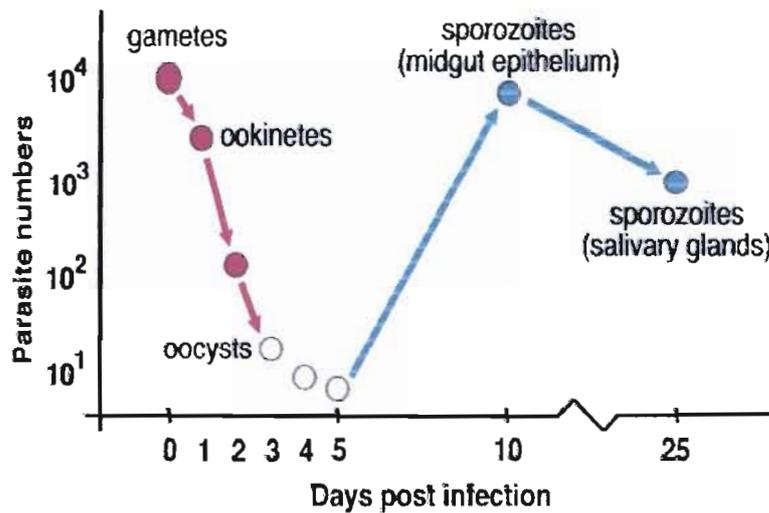


Figure 4: Schématisation de la dynamique de *P. berghei* chez le moustique. Au cours de son développement sporogonique, le *Plasmodium* subit 3 goulots d'étranglements dont les deux plus importants se déroulent lors de la transition de gamète – oocinète et de oocinète – oocyste. En termes de nombre, il atteint le plus bas niveau au stade oocyste avant d'effectuer une intense duplication de son génome pour produire environ 8000 sporozoïtes par oocyte. Les pertes de parasites dans l'hémocèle et lors de la traversée de la membrane des glandes salivaires réduisent ensuite le nombre de sporozoïtes infectieux. (de (Sinden 1999b)) et modifiée par (Blandin & Levashina 2004).

Chapitre 2 :

*Objectifs de l'étude, design
et méthodologie générale*

Chapitre 2 : Objectifs de l'étude, design et méthodologie générale

I. Objectifs de l'étude

I.1 Contexte

Convaincue des multiples avantages que pourraient offrir les TBV dans la lutte contre le paludisme (WHO 2000), d'intenses investigations ont été menées par la communauté scientifique en vue de rendre effectif ce type de vaccin. Parmi les antigènes identifiés comme potentiels candidats vaccins, Pfs25, Pfs48/45, et Pfs230 de *P. falciparum* et AgAPN1 de l'anophèle femelle apparaissent comme les plus prometteurs. En 2007, un essai clinique phase 1 conduit par le 'National Institute of Health' a été effectué sur des volontaires aux USA à l'aide d'un vaccin à base des antigènes Pfs25 et Pvs25 (homologue de Pfs25 chez *P. vivax*) (Wu *et al.* 2008). Cet essai, n'a malheureusement pas été mené jusqu'à terme pour de fortes réactions allergiques observées chez certains individus (réactions liées à l'adjuvant). Néanmoins, il a permis de recueillir des données favorables pour la poursuite de la recherche. Les antigènes testés, quoique peu immunogènes au vu des doses d'antigènes administrées ont, pour la première fois, démontré la faisabilité de la stratégie de la TBV. Les investigations se sont alors focalisées dans la formulation des molécules vaccinales beaucoup plus immunogènes et avec un adjuvant bien toléré. Depuis 2010, un réseau de chercheurs (de « Jenner Institute » et de « Imperial college of London »), a mis au point des candidats vaccins formulés à base d'antigène Pfs25, Pfs230, Pfs48/45 ou AgAPN1 associés au virus de singe (ChAd63) ou 'Modified vaccinia Ankara' (Kapulu *et al.*, soumis). Ces virus recombinants, exprimant les antigènes d'intérêt, se sont montrés immunogènes lorsqu'ils ont été injectés à des souris. Les anticorps purifiés et testés sur des *P. falciparum* de culture NF54 ont révélé une efficacité satisfaisante (Kapulu *et al.*, soumis). Ces succès obtenus au laboratoire constituent des arguments solides qui nourrissent un espoir pour l'effectivité des TBV.

I.2. Problématiques

De nombreuses études sur les candidats TBV se sont déroulées dans des laboratoires du Nord, le plus souvent sur des systèmes modèles éloignés des populations naturelles de parasites, d'hôtes et de vecteurs. La plupart des expériences conduites au laboratoire utilisent le système

P. berghei-*An. stephensi* (un parasite responsable du paludisme chez les rongeurs et un vecteur du paludisme humain en Asie) ou au mieux, des cultures de *P. falciparum* (souches NF54, HB3 et 3D7)-*An. gambiae* (souches de laboratoire). Il convient de souligner qu'il existe d'importantes différences entre le système de laboratoire en conditions expérimentales et le système naturel de transmission du *Plasmodium* à l'homme (Boete 2005; Cohuet *et al.* 2006; Dong *et al.* 2006). La transmission de *Plasmodium* en conditions naturelles est couplée à un bon nombre de paramètres variables peu connus : dans une population humaine disparate (i) infectée par *Plasmodium* à des densités gamétozytaires très variées (ii) viennent se gorger une population de moustiques génétiquement polymorphes (iii), prenant différentes quantités de sang (iv). Chez ces moustiques, les parasites génétiquement variées (v) sont soumis à diverses pressions immunitaires (vi). Les individus d'une population humaine donnée, immunisés contre un antigène généreront sans doute des anticorps à des concentrations variées (vii). Toutes ces composantes interagissent au cours du développement sexué du *Plasmodium*, et soulèvent la question « **Quel serait l'impact de cette diversité naturelle sur l'efficacité des candidats vaccins bloquant la transmission ?** »

I.3. Objectifs

Dans cette étude, l'objectif global a été d'évaluer l'efficacité des candidats vaccins bloquant la transmission dans les conditions naturelles de transmission de *P. falciparum*. Et pour y parvenir, nous nous sommes fixés pour objectifs intermédiaires de :

1. Evaluer l'efficacité des candidats vaccins bloquant la transmission sur les isolats naturels de *P. falciparum* ;
2. Caractériser la variabilité génétique de *P. falciparum* circulant dans la population humaine et la susceptibilité des génotypes sur le vaccin bloquant la transmission ;
3. Caractériser les relations entre la densité en gamétozytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV
4. Evaluer l'effet de l'immunité humaine naturelle bloquant la transmission chez le moustique et ses interactions avec l'efficacité des candidats vaccins ;
5. Evaluer le niveau de transmission de *Plasmodium* dans la population sauvage de vecteurs du paludisme dans le but de prédire l'efficacité des candidats vaccins sur le terrain.

II. Design de l'étude

Cette étude a été une composante d'un projet multicentrique « TransMalariaBloc : Malaria transmission Blocking by vaccines, drugs and immune mosquitoes » financé par l'Union Européenne dans le cadre du FP7-HEALTH-2007-2.3.2-9. Elle a impliqué différents laboratoires partenaires. La présente thèse se place dans le volet concernant les vaccins bloquant la transmission.

Les expérimentations utilisant le système biologique de laboratoire (*P. berghei* ou cultures de *P. falciparum*-*An. stephensi*) ont été effectuées à "Imperial College of London, UK" en collaboration avec "Jenner Institute, Oxford, UK" et "National Institute of Health, USA". Dans ces laboratoires, le travail a principalement consisté à **identifier/sélectionner les candidats vaccins prometteurs, à formuler les molécules vaccinales en utilisant différents vecteurs pour en choisir la meilleure formulation.** Les vaccins formulés ont été utilisés pour une immunisation chez l'homme ou la souris et les sérums/anticorps résultants ont été testés sur les parasites et moustiques de laboratoire.

Pour **tester l'efficacité de ces candidats vaccins** sur les isolats naturels de *P. falciparum*, l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) a développé une plate forme d'infections expérimentales en conditions semi-naturelles.

Enfin, le polymorphisme **génétique des parasites** et leurs éventuels impacts sur l'efficacité des candidats TBV ont été étudiés à l'Institut de Recherche pour le Développement centre de Montpellier (IRD / France).

Cette étude s'inscrit dans un contexte « pré-essai clinique » basé sur des expériences de laboratoire suivant le cycle de développement de *Plasmodium*. Elle utilise du matériel biologique pour former une combinaison hôte vertébré/parasite/hôte vecteur. Cette combinaison restreinte au parasite-vecteur est appelée système vectoriel. Les expériences sont bâties sur la base d'infections expérimentales de moustiques par des parasites, sur lequel on fait intervenir différents anticorps issus des candidats vaccins. Les expressions « système de laboratoire » et « système naturel » sont utilisées pour désigner respectivement la combinaison artificielle vecteur-parasite utilisée au laboratoire (parasite murin avec un moustique vecteur de *Plasmodium* humain) et la combinaison naturelle vecteur-parasite (*P. falciparum*-*An. gambiae*) responsable d'un grand nombre de cas de paludisme humain en Afrique.

III. Spécimens biologiques et processus d'obtention

III.1. Système de laboratoire : *P. berghei*-*An. stephensi*

Les travaux sur le modèle de laboratoire ont été effectués à « Imperial College, London » et ont porté essentiellement sur l'infection d'*An. stephensi* (SDA 500) par les gamétocytes de *Plasmodium* murin : *P. berghei* ANKA 2.34 WT ou *P. berghei* GFP (Sinden *et al.* 2002). *P. berghei* GFP (Green Fluorescent Parasite) est une souche génétiquement modifiée pour la rendre fluorescente et donc facilement détectable au microscope à fluorescence à tout stade de son développement (Janse *et al.* 2006). Les souris de laboratoire de type Tuck Ordinary (TO) d'âge compris entre 4 et 8 semaines ont été utilisées comme hôtes vertébrés pour la production des gamétocytes.

Toutes les souches de parasites utilisées provenaient de la banque de stockage de spécimens biologiques de l'Imperial College, conservées dans des cryotubes, dans de l'azote liquide. Avant utilisation, elles ont été réactivées par chauffage à 37°C puis injectées aux femelles des souris. Le sang infecté de ces souris a servi à réaliser les infections expérimentales des femelles d'*An. stephensi* élevées à l'insectarium.

Les moustiques ont été élevés en insectarium dans des conditions standards : 26 à 29 °C, 45 – 59 % d'humidité relative (RH), en éclairage alterné (12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité chaque jour). Les adultes ont été maintenus entre 25-27 °C, 50–70% d'humidité et nourris au fructose 8% contenant 2–3 mM de l'acide para-amino-benzoïque. Les repas de sang pour le maintien de la colonie sont effectués par gorgement sur des rats. Pour les expériences d'infections par les parasites, des femelles âgées de 3 à 4 jours, ont été sélectionnées.

III.2. Système vectoriel naturel : *Plasmodium falciparum*-*Anopheles coluzzii*

III.2.1. Le parasite

Les gamétocytes ont été recherchés auprès de la population humaine naturellement exposée à l'infection à *Plasmodium*. En amont, les démarches administratives et les prospections parasitologiques au sein de la population humaine ont été effectuées suivant les conditions d'éthique requises.

III.2.1.1 Site d'études

Un aspect innovant de cette thèse est le fait de tester les candidats TBV dans des conditions les plus proches possibles des conditions naturelles de transmission et de chercher à intégrer les variables des populations naturelles. Des infections de moustiques par leurs parasites naturels ont été réalisées à l'Institut de Recherches en Sciences de la Santé (IRSS) à Bobo-Dioulasso, au Burkina Faso. Elles ont nécessité des prospections de terrain et une phase de laboratoire. Bobo-Dioulasso et ses environs sont situés dans le faciès épidémiologique soudanien, le plus important du pays (Fig.5). Un laboratoire de niveau de sécurité conforme y a été installé dans le cadre du projet Transmalariabloc.

Deux localités principales (Soumouso et Dandé) situées à une quarantaine et une cinquantaine de kilomètres de Bobo-Dioulasso, ont servi de terrain pour le recrutement des patients volontaires et les collectes entomologiques. Situé sur l'axe Bobo – Diébougou, Soumouso (11°00'46''N, 4°02'45''W) est inclus dans le district sanitaire de Karangasso Vigué. Cette localité est sillonnée de quelques petits cours d'eau avec des zones marécageuses aménagées en champs de culture maraîchère. *An. gambiae s.s.*, *An. funestus* et *An. nili* sont les principaux vecteurs. Le taux entomologique d'inoculation annuel varie de 64 à 100pi/h/an (piques infectantes par homme et par an), avec un maximum pendant la saison des pluies (Juillet à Novembre) (Gazin *et al.* 1985; Robert *et al.* 1985). Selon des enquêtes parasitologiques réalisées en 2007, *P. falciparum* est l'espèce largement dominante de *Plasmodium* avec une prévalence estimée à environ 40% dans la population d'enfants de moins de 12 ans (Gouagna *et al.* 2010). Dandé (11°34'59" N et 4°33'25" W) le second site d'étude, est situé sur l'axe Bobo – Faramana (frontière du Mali). Le choix de ces deux localités comme terrains d'étude a été motivé par l'endémicité palustre, l'importance de leur population d'enfants, et leur accessibilité quotidienne en toute saison, en partant de Bobo.

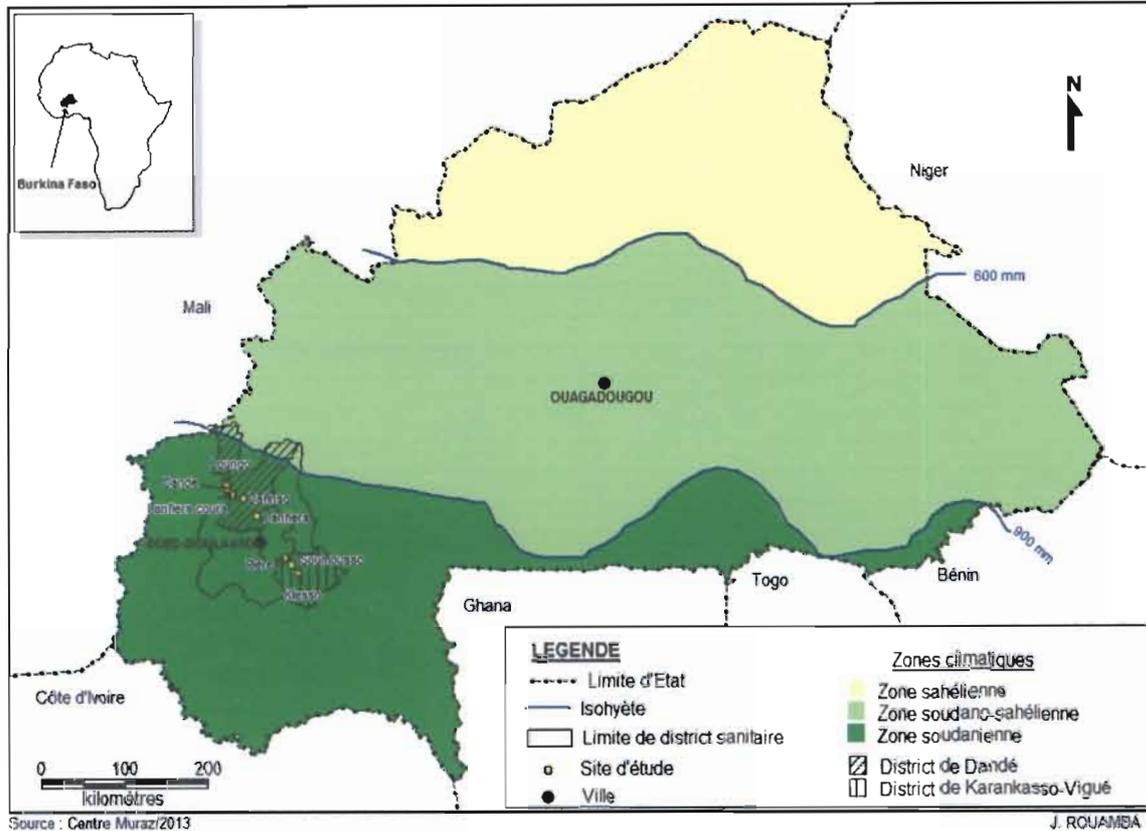


Figure 5: Carte des différentes faciès épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso et localisation des sites d'étude

III.2.1.2. Population de prospection

La recherche de personnes infectées par *Plasmodium* au stade de gamétocytes s'est déroulée au sein d'une population humaine répondant à un certain nombre de critères. Etaient éligibles pour l'étude, les enfants des deux sexes, âgés de cinq à douze ans, habitant les localités citées, ne présentant pas de pathologies cliniques évidentes et dont les parents ou tuteurs ont donné leur accord avec signature d'un consentement éclairé (annexe 1).

III.2.1.3. Dépistage et sélection des porteurs de gamétocytes

La recherche des porteurs de gamétocytes sur le terrain a été organisée de façon alternée dans les deux localités, Dandé et Soumousso avec l'aide d'un guide local chargé de diffuser l'information dans les différents ménages ou à l'école. Pour chaque sortie, des gouttes épaisses de sang ont été réalisées sur une centaine d'enfants volontaires présélectionnés. Au laboratoire, les gouttes épaisses ont été colorées au Giemsa 10% pendant 10 minutes et

examinées au microscopique (objectif x100 à l'huile d'immersion) pour la recherche de *Plasmodium* (Fig.6). Pour chaque cas de mono infection à *P. falciparum* détecté, la densité de gamétocytes ou gamétocytémie a été estimée en comptant le nombre de gamétocytes pour 1000 leucocytes du porteur (gamétocytémie relative). En considérant un nombre standard de 8000 leucocytes/ μ l de sang chez un sujet, la gamétocytémie absolue (gamétocytes par unité de volume) a été déduite par la formule : (gamétocytes compté x 8000) / 1000. Les densités parasitaires pour les autres stades (trophozoites, schizontes, mérozoites) ont été également évaluées pour statuer du traitement chimio-thérapeutique des personnes infectées. Deux ou trois porteurs de gamétocytes, accompagnés du guide (et quelquefois d'un parent quand il le désirait) ont été conduits au laboratoire par session d'infection. Les porteurs de gamétocytes étaient éligibles s'ils répondaient aux critères suivants : sujet asymptomatique, ne présentant pas une co-infection par une autre espèce de *Plasmodium* que *P. falciparum*, ni anémie ni maladie concomitante nécessitant un suivi médical. De plus, les parents des enfants éligibles ont été interrogés sur l'historique d'éventuelle fièvre dans les 24 heures précédentes (traduisant le seuil pyrogénique), et sur d'éventuels traitements (chimiothérapie ou traitement traditionnel) en cours ou dans le mois précédent, susceptible d'influencer le développement sporogonique. Arrivé au laboratoire et après un test de confirmation (goutte épaisse et frottis mince), 10 à 15 ml de sang veineux ont été prélevés aux porteurs de gamétocytes dans des tubes héparinés.



Figure 6: Processus d'identification de porteurs de gamétocytes
Réalisation des gouttes épaisses sur le terrain (A) et lecture au microscope des lames (B) pour la recherche de trophozoites et gamétocytes (C).

III.2.1.4. Considérations éthiques

Ce projet d'étude a été soumis et approuvé par le comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ (accord n° 003-2009/CE-CM). Des correspondances officielles spécifiant le but et le déroulé de l'étude ont été adressées aux autorités administratives des localités choisies. Une campagne d'information a été effectuée au sein des populations des dites localités avant le début de l'étude. A l'issue des recherches de parasites par microscopie, tous les individus infectés au seuil de 1000 parasites par microlitre de sang ont reçu gratuitement dès le lendemain un traitement curatif à base d'artésunate-amodiaquine suivant le protocole en vigueur au Burkina Faso. Pour les cas de parasitémies très élevées (densité parasitaire > 50.000 trophozoïtes par microlitre de sang), des recommandations étaient données au guide de terrain par appel téléphonique aussitôt après la lecture de la lame pour que le patient puisse bénéficier d'un traitement d'urgence au centre de santé. En plus des traitements curatifs, les participants à l'étude (porteurs de gamétocytes) ainsi que leurs parents ont reçu chacun une moustiquaire imprégnée en guise de prise en charge préventive.

III.2.2 Moustiques vecteurs

III.2.2.1 Souche et origine

Une souche locale du complexe *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* (Coetzee *et al.* 2013), a été utilisée comme hôte vecteur pour les infections expérimentales. Cette lignée a été colonisée et maintenue en élevage dans l'insectarium de l'IRSS à partir des femelles collectées dans la localité de Vallée de Kou (d'où l'appellation de souche VK) depuis 2007.

III.2.2.2. Production et maintenance de la souche

Les femelles maintenues en cages et nourries sur lapin et avec du glucose 10%, pondent sur des boîtes de Pétri contenant du coton humide recouvert de papier filtre (Fig.7A). Les pontes, collectées au deuxième jour après les repas de sang, éclosent dans un bac contenant de l'eau de source (Fig.7B). Les larves de stade I issues de l'éclosion sont conservées dans l'eau de source et sont nourries quotidiennement avec de l'aliment conçu pour les poissons d'aquarium (TetraMinBaby®). Dans les conditions standards d'insectarium (28°C±2, Humidité = 80%±10), elles évoluent progressivement par mue en larves de stade II, III pour donner des larves de stade IV au bout de 10 jours environ. Les nymphes résultant des larves de stade IV

sont réparties en lots d'environ 200 individus dans des gobelets remplis d'eau. Ces gobelets sont disposés dans des cages cubiques à cadre métallique de 30 cm d'arrête, recouvertes de tulle moustiquaire à mailles fines (Fig.7C). L'émergence survient 24 à 48 heures plus tard et les imagos libérés s'alimentent sur du coton imbibé de glucose 10%. Les femelles nullipares, sont sélectionnées aux troisième ou quatrième jours après l'émergence, pour les expérimentations.



Figure 7 : Production des moustiques en insectarium

(A) montre les œufs d'anophèles femelle pondus dans une boîte de Pétri contenant du coton recouvert de papier filtre humide ; (B) illustre le traitement des larves issues de l'éclosion des œufs récoltés ; (C) montre les cages contenant les moustiques adultes.

IV. Les candidats vaccins à tester

En guise de vaccin, nous avons testé du sérum de personnes immunisées pour Pfs25, ainsi que des anticorps dirigés contre un antigène d'*Anopheles* (AgAPN1) et contre des antigènes de *Plasmodium* (Pfs25, Pfs230-C, Pfs48/45) issus de souris immunisées.

IV.1. Nature et origine du sérum anti-Pfs25 de personne immunisée

En 2007, un essai clinique en phase 1 soutenu par le 'National Institute of Health' avait été réalisé à « John Hopkins Center for Immunization Research, Washington DC, USA », (Wu *et al.* 2008). Dans cet essai clinique, la molécule vaccinale avait été formulée à partir d'antigènes Pfs25 avec pour adjuvant du « Montanide ISA 51 », une émulsion à base d'huile minérale et de mono-oléate de mannide. La formulation Pfs25/Montanide ISA51 ainsi obtenue avait été administrée à différentes doses (5µg et 10µg) à des volontaires par injection intramusculaire (*im*).

Cet essai, n'a malheureusement pas été jusqu'à terme à cause des réactions allergiques observées chez certains volontaires, dues à l'adjuvant. Néanmoins, le test immunologique (ELISA) avait révélé des doses variables d'anticorps anti-Pfs25 dans le sérum des participants. Les sérums des personnes immunisées, testés sur des *Plasmodium* de culture NF54, avaient révélé une efficacité corrélée avec le titre d'anticorps (Wu *et al.* 2008). Nous avons souhaité évaluer l'efficacité de ce sérum en conditions semi-naturelles contre des isolats de *P. falciparum* et avons pour cela reçu des échantillons de sérum issu de ce premier essai clinique de phase 1 de TBV, dans le cadre d'une collaboration avec le « National Institute of Health ».

VI.2. Nature et origine des anticorps issus de souris immunisées

Au regard des résultats encourageants mais mitigés de l'essai vaccinal de phase 1 pour Pfs25, des investigations se sont focalisées sur la formulation des molécules vaccinales plus immunogènes pour limiter le besoin en adjuvant. Depuis 2008, des chercheurs du Jenner Institute à Oxford, ont procédé à la mise au point des candidats vaccins formulés à base de plusieurs antigènes en utilisant comme vecteur, des virus recombinants (Draper *et al.* 2008; Draper *et al.* 2009; Draper *et al.* 2010; Goodman *et al.* 2011). Cinq antigènes différents dont 4 protéines de surface de *P. falciparum* (Pfs25, Pfs230 et Pfs48/4 et Pfs48/45-natif) et la protéine AgAPN1 du moustique ont été ciblées comme candidats vaccins de choix. Les gènes codant pour ces antigènes ont été d'abord clonés dans des virus (chimpanzee adenovirus vector ChAd63 et modified vaccinia virus Ankara MVA). Puis, ces virus recombinants exprimant les antigènes d'intérêt ont été utilisés pour immuniser des souris de type Balb/c par injection intramusculaire. Le processus d'immunisation des souris et de purification des anticorps a été inclus dans le sujet de thèse en cours d'une étudiante du Jenner Institute (Kapulu *et al.*, soumis). Brièvement, des lots de souris ont d'abord été vaccinés avec une dose de virus recombinant ChAd63 (1×10^8 unités infectieuses) exprimant un des antigènes. Elles ont ensuite reçu 56 jours plus tard une dose rappel avec le virus recombinant MVA (1×10^7 unités infectieuses), exprimant les mêmes antigènes (Fig.8). Au 70^e jour après la date de la première dose, le sang des souris immunisées a été prélevé par ponction cardiaque, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 4 minutes pour obtenir le plasma. Les anticorps purifiés du plasma, principalement les immunoglobulines G (IgG), ont été dosés par test ELISA. Leur fonctionnalité a été évaluée en testant leur capacité à bloquer la transmission de *P. falciparum*

souche NF54 chez *An. stephensi* (Kapulu et al., soumis). Ils se sont révélés efficaces sur cette souche et nous avons voulu tester leur effet sur les isolats naturels de *P. falciparum*. Nous avons cherché en particulier à évaluer en parallèle et dans les mêmes conditions, les candidats TBV les plus prometteurs à ce jour. En effet, tous ces candidats vaccins ont été testés dans le passé, cependant la variabilité des conditions expérimentales ne permettent pas une comparaison directe de leurs efficacités respectives.

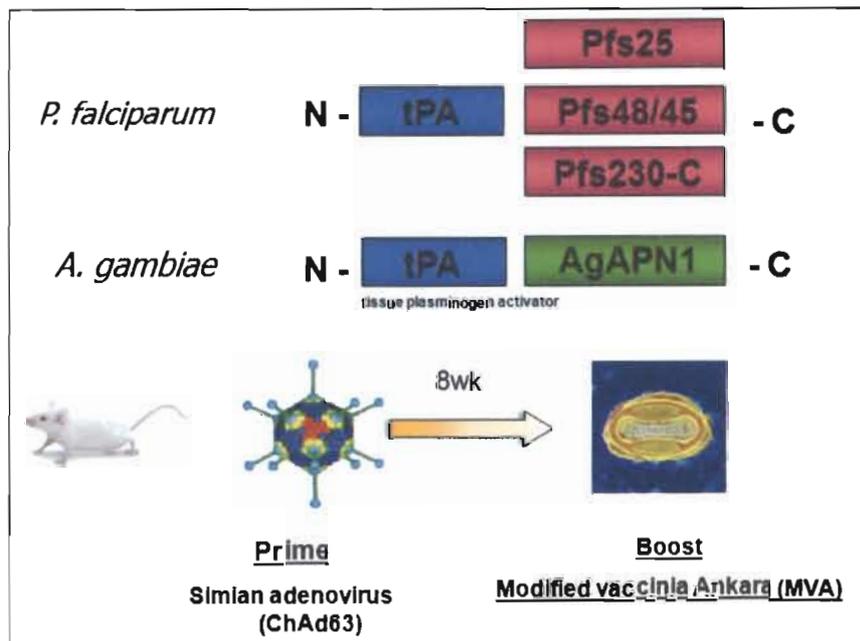


Figure 8: Protocole schématique de l'immunisation des souris

V. La technique d'infections expérimentales

V.1. Description du dispositif expérimental

L'infection expérimentale des moustiques vecteurs par le *Plasmodium* est une technique développée dans les années 1970 (Sinden & Canning 1972; Canning & Sinden 1973; Sinden & Garnham 1973) et consiste à faire gorgier des moustiques sur du sang infecté par des gamétocytes dans le but de provoquer le développement sporogonique du parasite. Cette méthode utilise un dispositif artificiel (Fig.9) permettant de simuler la prise de sang des moustiques proche du gorgement naturel. Le dispositif est constitué d'une série de petites cellules en verre appelées cellules de gorgement (« feeders » en anglais). Chaque cellule est constituée de deux compartiments : le compartiment périphérique muni de deux orifices (conduites d'entrée et de sortie d'eau) (Fig.9A). Les différentes cellules de gorgement, fixées

sur un support métallique, sont reliées entre elles par un circuit de tuyaux connectés à un bain marie (Fig.9B) ce qui permet le maintien de la température à 37°C du sang contenu dans le compartiment central. Une fine couche en plastique transparent, une membrane Parafilm®, momentanément appliquée sous le compartiment central sert d'imitation de la peau humaine sur laquelle viennent gorger les moustiques (Fig.9C).

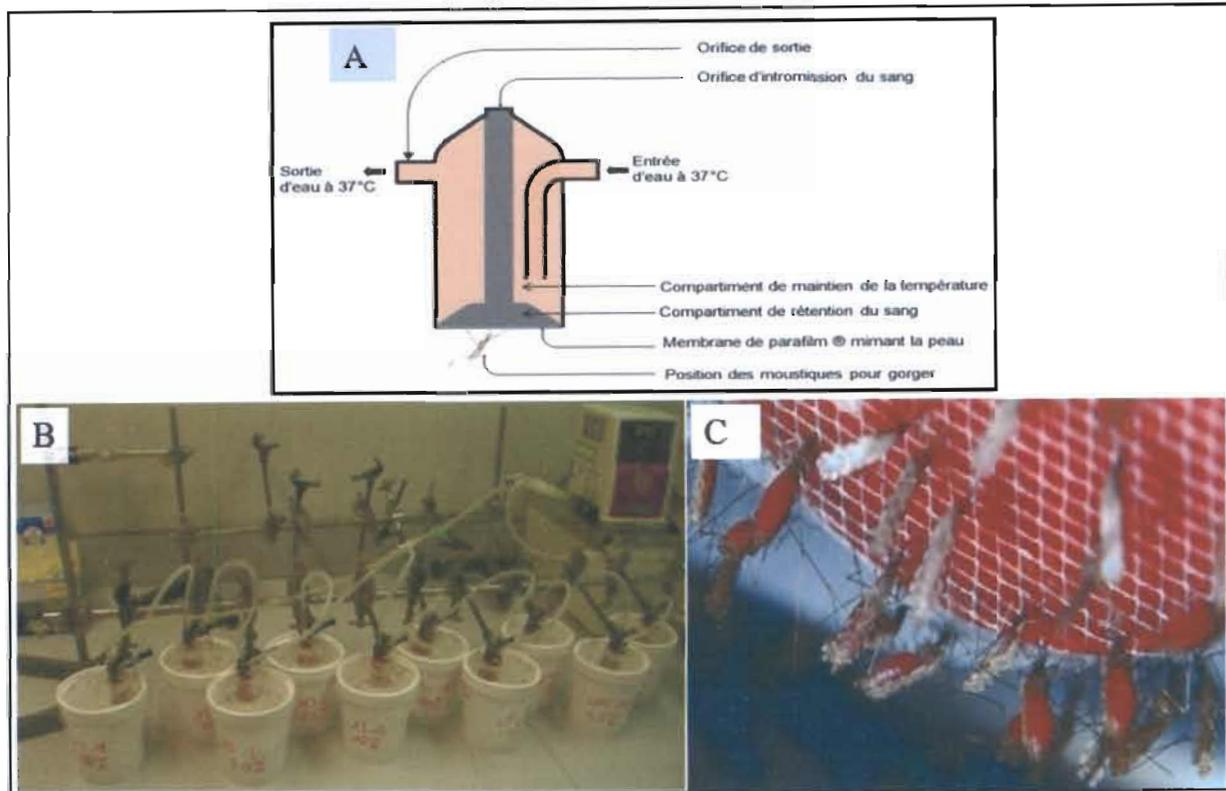


Figure 9: Dispositif utilisé pour réaliser les infections expérimentales
Structure d'une cellule de gorgement (A) et dispositif complet, avec le bain marie, les cellules de gorgement et les gobelets en dessous (B). Les moustiques à l'intérieur des gobelets se gorge à travers la membrane de Parafilm (C) ; le sang dans les cellules de gorgement est maintenu à 37°C grâce au bain thermostaté.

V.2. Le protocole d'infection expérimentale

V.2.1. Gorgement des moustiques

En fonction de la source et de la nature des parasites, plusieurs expressions sont utilisées pour désigner la technique. Le SMFA "Standard membrane feeding assay" a été la technique utilisée ici pour le système de laboratoire (Sinden *et al.* 1996). Il désigne le gorgement des moustiques à l'aide d'une souche de *P. berghei* ou d'une culture de *P. falciparum*. Le DMFA «Direct Membrane Feeding Assay» a été utilisé pour toutes les infections réalisées avec le système *P. falciparum* - *An. gambiae* (Bousema *et al.* 2012b). Le DMFA désigne le gorgement des moustiques sur membrane à partir des gamétocytes issus directement de l'hôte

humain. La démarche expérimentale suit à quelques nuances près un plan général illustré par la figure 10. Les différences résident au niveau du traitement du sang prélevé et le jour de dissection des moustiques selon le système utilisé et les questions spécifiques à traiter. Les anophèles femelles âgés de 3 à 4 jours et affamées (sans glucose) pendant 24H sont conditionnées en gobelets (50 à 80). Chaque gobelet est disposé sous une cellule afin de permettre la prise de sang (Fig.9 B&C). De l'intérieur des gobelets ils se gorgent au travers la membrane de Parafilm pendant 30 minutes. Les moustiques n'ayant pas gorgé ou ayant partiellement gorgé sont retirés. Les individus gorgés sont maintenus et nourris au glucose ou au fructose 10% dans les conditions standards de l'insectarium jusqu'à la dissection pour compter les oocystes.

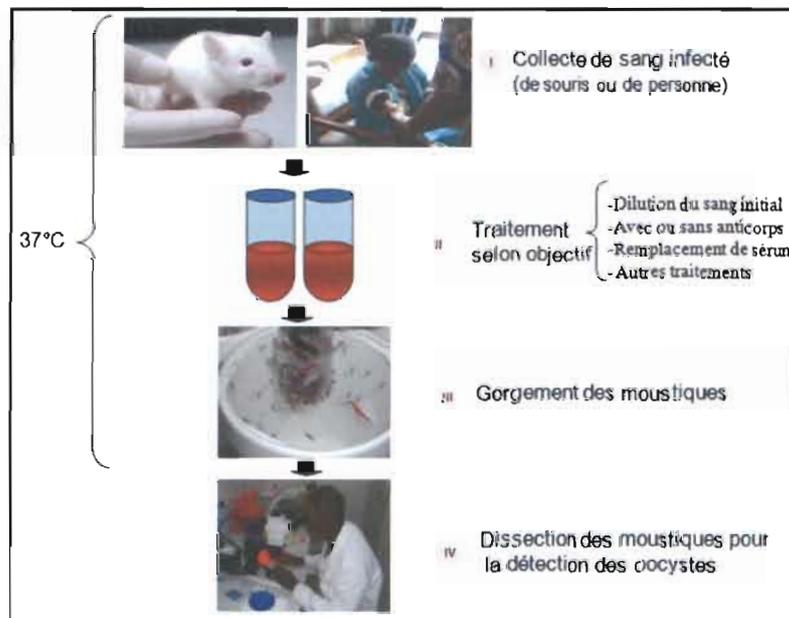


Figure 10: schéma général d'une infection expérimentale.

V.2.2. Technique de dissection des estomacs de moustiques

La dissection s'effectue sous une loupe binoculaire, à l'aide de pinces Dumont n°5 dans une solution de tampon : PBS 1X pour le système *P. berghei-An. stephensi* et du mercurochrome 2% pour le système *P. falciparum-An. coluzzii*. Le moustique est maintenu par une pince au niveau du thorax et l'abdomen est étiré à l'aide d'une seconde pince placée au niveau du 7e 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.

VI. Méthodes d'évaluation des candidats TBV

Pour chaque expérience, des groupes expérimentaux ont été définis. Chaque groupe expérimental (par exemple moustiques gorgés sur du sang infectieux en présence ou non du candidat vaccin) est constitué à partir des moustiques gorgés sur au moins deux 'feeders' différents contenant la même qualité de sang, ceci dans le souci de minimiser d'éventuelles variations liées à la manipulation ou un effet lié au "feeders". A la dissection 7 jours post-gorgement **un effectif d'au moins 30 moustiques** par groupe a été une condition pour valider l'expérience. Pour valider les observations, chaque expérience a été répétée au moins 3 fois.

Pour les expériences validées, trois indicateurs ont été utilisés pour estimer l'infektivité à *Plasmodium* au sein des différents groupes expérimentaux de moustiques. Ces indicateurs sont la prévalence, la distribution des oocystes au sein de chaque groupe expérimental et l'intensité des oocystes. La prévalence de l'infection, désigne la proportion de moustiques infectés (possédant au moins un oocyste sur l'estomac) dans chaque groupe expérimental, alors que l'intensité de l'infection exprime la moyenne arithmétique des oocystes par moustique au sein de chaque groupe.

L'efficacité des candidats vaccins bloquant la transmission a été assimilée à l'activité des anticorps spécifiques des antigènes étudiés, obtenus par l'immunisation de souris ou de l'homme. Cette efficacité a été évaluée en termes d'**Activité Bloquant la Transmission (TBA)** et d'**Activité Réduisant la Transmission (TRA)** (Churcher *et al.* 2012 ; Sinden *et al.* 2012a; Sinden *et al.* 2012b).

Le **TBA** (efficacité sur la prévalence) estime le pourcentage de blocage de la prévalence de l'infection par les anticorps dans le groupe test (en présence du candidat bloquant) par rapport à celle du groupe contrôle (en absence du candidat bloquant).

Le **TRA** (efficacité sur l'intensité) évalue le pourcentage de réduction de l'intensité des oocystes dans le groupe test (en présence du candidat bloquant) par rapport à celle du groupe contrôle (en absence du candidat bloquant).

$$TBA = 100 * \left(1 - \frac{\text{Prévalence groupe test}}{\text{Prévalence groupe contrôle}}\right) \quad TRA = 100 * \left(1 - \frac{\text{moyenne d'oocyste test}}{\text{moyenne d'oocystes contrôle}}\right)$$

Chapitre 3 :

*Evaluation de l'efficacité de principaux
candidats vaccins bloquant la transmission en
conditions semi-naturelles*

Chapitre 3 : Evaluation de l'efficacité de principaux candidats vaccins bloquant la transmission en conditions semi-naturelles

Introduction

Nous avons mentionné dans le design de l'étude, que le sérum humain issu de l'essai clinique ainsi que les anticorps purifiés des souris immunisées avaient montré une bonne efficacité contre les *Plasmodium* de culture NF54. Ces résultats obtenus au laboratoire constituent des arguments solides en faveur des TBV. Cependant, il convient de noter que certains obstacles pourraient compromettre cette efficacité en raison des différents paramètres qui interagissent dans la transmission de *Plasmodium* en conditions naturelles (voir section Généralité/ Problématique). L'efficacité observée sur les parasites de culture, reste donc à être démontrée sur les parasites circulant chez les sujets naturellement infectés.

Aussi, dans le concept de candidats TBV, les antigènes à potentiel vaccinal ont été sélectionnés à partir de parasites de profil génétique bien connu, notamment la souche NF54 de *P. falciparum*. Le choix des candidats a été en partie motivé par le caractère peu polymorphe des séquences nucléotidiques de leurs gènes. Cependant, des auteurs ont rapporté des cas de mutations ponctuelles du gène *Pf25*, entre autres sur des isolats du Brésil, de Papouasie Nouvelle Guinée (Shi *et al.* 1992; Manske *et al.* 2012). D'autres études ont aussi révélé des cas de mutation du gène *Pf230* dans la population sauvage de *Plasmodium* (Williamson & Kaslow 1993; Niederwieser *et al.* 2001). D'autre part, la transmission de *Plasmodium* en conditions naturelles est corrélée par des infections multiclonaux (plusieurs génotypes) récurrentes chez les personnes vivant en zone endémique (Anderson *et al.* 2000; Abdel-Wahab *et al.* 2002; Nassir *et al.* 2005; Soulama *et al.* 2006 ; Nwakanma *et al.* 2008). De tels environnements infectieux constituent un cadre favorable pour la sélection de génotypes capables d'échapper aux actions ciblant leur élimination (Boudin & Robert 2003). En effet, les interactions entre les différentes souches parasitaires chez l'hôte peuvent influencer plusieurs traits d'histoire de vie tels que la virulence et la transmission, et elles peuvent avoir des conséquences sur l'évolution, l'adaptation et la dynamique des populations de pathogènes (Bell *et al.* 2006). Il a été observé chez *P. falciparum*, que la diversité génétique et/ou antigénique engendrait un polymorphisme phénotypique permettant à certains clones de déjouer le système immunitaire de l'homme (Contamin *et al.* 1996; Konate *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999). Pourtant, aucune étude à ce jour, n'a véritablement testé l'effet de

la diversité génétique des infections à *Plasmodium* sur l'efficacité des candidats TBV, ceci constitue toujours une zone d'ombre dans le concept des stratégies de blocage de la transmission.

L'objet de notre étude a été de mesurer l'efficacité des différents candidats TBV, sur les parasites sauvages au sein de leur vecteur naturel, *An. coluzzii*, et de déterminer l'effet de la diversité génétique des populations naturelles de *Plasmodium* sur l'efficacité de ces candidats. Il s'est agi spécifiquement, d'évaluer l'efficacité d'anticorps de souris et sérum humain décrits plus haut dans le système *P. falciparum*-*An. coluzzii*, en tenant compte du niveau de l'infection chez les moustiques et du titre d'anticorps. Puis, nous avons étudié l'effet de la diversité des isolats naturels de *Plasmodium* de différentes zones sur l'efficacité des candidats TBV.

I. Matériel et Méthodes

I.1. Infections expérimentales pour tester le sérum humain anti-Pfs25

Le sérum d'un volontaire ayant participé à l'essai vaccinal (Wu *et al.* 2008) a été testé pour son efficacité à bloquer la transmission homme-moustique d'isolats naturels de *P. falciparum*. Afin d'évaluer l'efficacité de ce sérum sur une plus grande diversité de parasites, les mêmes expériences ont été conduites en parallèle au Burkina Faso et en Thaïlande. Nous avons réalisé les expériences au Burkina Faso alors que les expériences en Thaïlande ont été réalisées en collaboration avec le « Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand ». En Thaïlande, les isolats naturels de *P. falciparum* ont servi à infecter des moustiques vecteurs locaux, *Anopheles dirus*.

La concentration du sérum anti-Pfs25 de personne immunisée, a été estimée à 212 µg/ml (Wu *et al.* 2008). Notre objectif a été de tester son efficacité à 109 µg/ml, concentration estimée dans le sang total de l'individu immunisé avec sérum et cellules sanguine. La démarche expérimentale a consisté à nourrir des moustiques avec du sang infecté d'un individu, en présence et en absence du sérum anti-Pfs25. Ainsi, chez une personne infectée volontaire, un volume de 10 ml de sang veineux a été prélevé dans des tubes héparinés et réparti en volume de 350µL dans 6 tubes Eppendorf 1.5ml préalablement chauffés à 37 °C. Après centrifugation pendant 3 minutes à 3000 r.p.m. à 37°C, le plasma sanguin du porteur a été retiré et le culot a

été suspendu pour lavage dans 350 µl de milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) préchauffé à 37°C, le tout a été mélangé par pipetage, puis de nouveau centrifugé. Après avoir prélevé entièrement le surnageant, le culot a été suspendu d'une part dans 180µl du sérum anti-Pfs25 (pour 3 tubes tests) et d'autre part dans 180 µl de sérum naïf pour l'antigène Pfs25 (pour 3 tubes contrôles négatifs). Les suspensions finales, bien homogénéisées, ont été utilisées pour gorger des femelles *An. coluzzii* au Burkina Faso ou *An. dirus* en Thaïlande. Sept jours après le repas sanguin, les moustiques ont été disséqués dans du mercurochrome (2 %) sous un binoculaire pour détecter et compter les oocystes sous microscope. Les estomacs parasités ont été conservés dans de l'éthanol absolu à -20 °C pour l'analyse moléculaire des souches parasitaires. Pour chaque groupe de moustiques, les indicateurs de l'infection ont été calculés, et l'efficacité du sérum anti-Pfs25 a été évaluée en termes d'activité bloquant la transmission et d'activité réduisant la transmission.

I.2. Infections expérimentales pour tester les anticorps de souris immunisées

Les 5 anticorps obtenus par le « Jenner Institute, UK » ont été testés en aveugle durant les expériences et la démarche a consisté à nourrir des anophèles avec du sang infecté en présence d'anticorps (anticorps test ou anticorps témoin négatif). Une concentration arbitraire d'anticorps a été fixée pour être testée. Le sang prélevé du porteur humain a été d'abord réparti (350µl) dans des tubes de type Eppendorf 1.5ml et centrifugé pendant 3 minutes à 3000 rpm à 37°C pour retirer le plasma autologue. Puis le volume d'anticorps, correspondant à la concentration arbitraire, a été ajouté dans les culots cellulaires du lot test. Le niveau initial du sang a été ajusté avec du sérum AB (issu d'un donneur européen non immun) afin d'obtenir la concentration finale d'anticorps souhaitée tout en maintenant la gamétocythémie initiale. Un anticorps non spécifique pour le parasite, a servi de contrôle négatif. Afin de tester l'effet du tampon de purification des anticorps et de valider la neutralité du contrôle négatif, un deuxième contrôle négatif (plasma autologue remplacé par le plasma AB) a été utilisé. Les suspensions finales ont été utilisées pour gorger des groupes d'*An. coluzzi* de 3 à 4 jours maintenus à jeun pendant les 24 heures précédentes. Sept jours après le repas sanguin, les moustiques ont été disséqués dans du mercurochrome (2 %) sous une loupe binoculaire pour détecter et compter les oocystes sous microscope. Les estomacs parasités ont été conservés dans de l'éthanol absolu à -20 °C pour l'analyse moléculaire des souches parasitaires. Pour chaque groupe de moustiques, les indicateurs de l'infection ont été calculés, puis l'efficacité

du sérum anti-Pfs25 a été évaluée en termes d'activité bloquant la transmission (TBA) et d'activité réduisant la transmission (TRA).

I.3. Analyses génétiques des isolats naturels de *P. falciparum*

Dans le but d'obtenir des données sur la diversité génétique des isolats naturels de *Plasmodium*, et le lien potentiel avec l'efficacité des TBV, nous avons procédé à des analyses moléculaires d'isolats de parasites utilisés pour les expériences. La première approche a consisté à mesurer la diversité des haplotypes lors de l'infection par marqueurs microsatellites, pour détecter un potentiel effet de la multiplicité d'infection sur l'efficacité des TBV. En second lieu, les gènes d'intérêt (*Pf25* et *Pf230*) ont été séquencés pour le diagnostic d'éventuels cas de polymorphisme dans la population parasitaire. Pour couvrir l'ensemble des génotypes parasitaires nous avons effectué l'analyse avec l'ADN des parasites aussi bien au stade sanguin chez l'homme qu'au stade oocyste chez le moustique.

I. 3.1. Extraction de l'ADN des isolats de *Plasmodium*

I. 1.1.1. A partir des papiers confettis de sang infecté

La méthode de chelex-100 (Plowe & Wellems 1995; Dokomajilar *et al.* 2006) a été utilisée pour extraire l'ADN du parasite à partir des papiers confettis imprégnés de sang infecté. Les papiers confettis séchés ont été découpés puis incubés toute une nuit dans une solution de saponine 0.5% pour lyser les érythrocytes maintenus dans les mailles. Après un rinçage dans du PBS 1X, l'ADN a été séparé des autres composants cellulaires par chauffage/ vortexage à 95°C sur du block chauffant, dans une résine de chelex 5%. Enfin, après une centrifugation de 14000 r.p.m. pendant 10 minutes, l'extrait d'ADN a été recueilli par pipetage et conservé à -20°C pour les analyses moléculaires.

I.1.1.2. A partir des oocystes d'estomacs infectés

- Isolement individuel des oocystes

Une question évoquée dans la littérature est l'infection des personnes par plusieurs clones de *Plasmodium* en zone d'endémie palustre (Nassir *et al.* 2005; Nwakanma *et al.* 2008). Il nous semblait utile d'obtenir l'ADN d'oocyste individuel, afin de déceler au mieux les diversités

génétiques des parasites émanant exclusivement des souches ayant infecté les moustiques. Nous avons ainsi procédé dans un premier temps à l'isolement individuel des oocystes selon le protocole décrit par Annan *et al.* (Annan *et al.* 2007). Les estomacs de moustiques infectés conservés dans l'éthanol absolue à -20°C ont d'abord été réhydratés successivement dans l'éthanol 70%, 30% et l'eau distillée stérile. L'estomac réhydraté a été placé dans 10 µl d'eau distillée stérile sur une lame polysine, le tout disposé sur un plateau de microscope inversé, puis nous avons procédé à l'extraction oocyste par oocyste, à l'aide de mandrins munis de munités fines. Une fois détaché de l'estomac, l'oocyste a été recueilli par aspiration capillaire à l'aide d'une pipette pasteur à extrémité préalablement effilée à la flamme et a été ensuite introduit dans un tube de type Eppendorf 0.5ml contenant 10µl d'eau stérile et conservé immédiatement à -20°C pour l'extraction de l'ADN.

- Procédure d'extraction de l'ADN des oocystes

L'ADN a été extrait des oocystes isolés en utilisant le kit Qiagen, suivant le protocole préconisé par le fabricant (annexe 2). Brièvement, les oocystes ont été lysés par la protéinase K dans une solution tampon à 56°C dans un bain marie. Puis l'ADN a été purifié du lysat, avec différents tampons avant d'être élué dans 50µl de tampon AE. Une PCR (Polymerase Chain Reaction) diagnostique a été réalisée (annexe 2) afin d'identifier les échantillons ADN-positifs et à confirmer l'espèce *falciparum* (Fabre *et al.* 2004).

I. 3.2. Géotypage des souches à l'aide de la technique des microsatellites

I. 2.1.1. But et principe de la technique des microsatellites

Le géotypage microsatellite est une technique de biologie moléculaire qui étudie le polymorphisme ou la diversité génétique au sein d'une population grâce à la taille des allèles des marqueurs génétiques neutres appelés microsatellites. Pour notre étude, il s'agissait de dénombrer les clones de *Plasmodium* présents dans le sang des individus infectés utilisés pour les infections expérimentales et ceux ayant infecté les moustiques vecteurs. Cette approche visait à élucider la question d'éventuelles souches de *Plasmodium* sensibles, et d'autre résistantes à l'activité des anticorps issus des candidats vaccins.

I. 2.1.2. Mode opératoire

- L'Amplification des microsatellites

Sept marqueurs microsatellites (Poly α , ARA2, PfPK2, TAA60, TAA109, TAA87 et Pf377) ont été utilisés pour le génotypage (tableau I) comme décrit par (Anderson *et al.* 2000; Razakandrainibe *et al.* 2005; Annan *et al.* 2007). Pour chaque expérience, l'ADN du parasite a été amplifié par une PCR nichée (Nested PCR) pour chacun des sept marqueurs. Les détails des programmes d'amplification sont consignés dans l'annexe 3. Cette variante de la PCR, consiste en une série de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces. Une amorce marquée (fluorochrome spécifique pour chaque marqueur microsatellite) et une amorce standard ont été utilisées pour la deuxième amplification, rendant les produits PCR2 détectables au séquenceur.

- Mélange et dilution des produits d'amplification PCR2

Suivant la coloration du fluorochrome des amorces marquées et la position des allèles sur les chromosomes, les produits d'amplification PCR2 pour chaque échantillon ont été regroupés en deux pools : *A* (Poly α , ARA2, PfPK2 et TAA87) et *B* (TAA109, TAA60 et Pf377) (tableau I). Pour chaque pool, les mélanges (Pool *A* et *B*) ont été dilués au 1/200 dans de l'eau distillée stérile.

- Dénaturation de l'ADN et génotypage

Pour obtenir l'ADN simple brin, les mélanges de chaque pool de produits PCR (ADN double brin) ont été dénaturés dans des plaques : 1 μ l du contenu de pool a été additionné avec 13.9 μ l de formamide et 0,1 μ l de marqueur de taille Genescan-500LIZ pour un volume total de 15 μ l. La plaque ainsi préparée a été chauffée à 95°C pendant 3 à 5 minutes dans un thermocycler, puis refroidie immédiatement sur de la glace dénaturant ainsi l'ADN. Les ADN simples brins obtenus ont été analysés sur un 'Genetic Analyser Applied Biosystem 3130XL' (communément appelé séquenceur) suivant un plan préalablement établi. Après migration, la taille des allèles a été estimée par le logiciel Genescan (Applied Biosystem) par référence au marqueur de taille intégré dans les préparations, et les résultats ont été analysés avec le logiciel GeneMapper4.0 pour identifier des allèles de chaque marqueur et déterminer les différents clones de parasite.

Tableau I : Détails relatifs aux marqueurs microsatellites

* amorces marquées (bleu, jaune, rouge ou vert) utilisés pour la deuxième PCR.

Marqueurs (localisation)	Amorces	Séquences des amorces 5' →3' et couleur de fluorochrome	Taille amplifiée	Pool de produits PCR
Poly α (chromosome 4)	P20 F	AAA ATA TAG ACG AAC AGA	130-186	Pool A
	P20 R1	ATC AGA TAA TTG TTG GTA		
	P20 R*	GAA ATT ATA ACT CTA CCA		
ARA2 (chromosome 11)	P22 F1	GTA CAT ATG AAT CAC CAA	57-84	
	P22 F*	GAA TAA ACA AAG TAT TGC T		
	P22 R	GCT TTG AGT ATT ATT AAT A		
PfPK2 (chromosome 12)	P24 F	CTT TCA TCG ATA CTA CGA	160-207	
	P24 R1	CCT CAG ACT GAA ATG CAT		
	P24 R*	AAA GAA GGA ACA AGC AGA		
TAA87 (chromosome 6)	P25 F1	ATG GGT TAA ATG ACG TAG A	89-119	
	P25 F*	AAT GGC AAC ACC ATT CAA C		
	P25 R	ACA TGT TCA TAT TAC TCA C		
TAA109 (chromosome 6)	P21 F	CTC AAA GAA AAA TAA TTC	70-88	Pool B
	P21 F*	TAG TAA CGA TGT TGA CAA		
	P21 R	AAA AAG GAG GAT AAA TAC AT		
TAA60 (chromosome 13)	P23 F	GAT CTC AAC GGA AAT TAT	92-104	
	P23 R1	TTA TGT TGG TAC CGT GTA		
	P23 R*	TTA TCC CTA CGA TTA ACA		
Pf377 (chromosome 12)	P26 F1	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T	151-194	
	P26 F*	TGT TAA ATC AGG ACA ACA T		
	P26 R	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA		

I. 3.3. Séquençage des gènes *Pf25* et *Pf230*

I. 3.1.1. L'amplification

Pour chacune des protéines antigéniques de surface Pfs230 et Pfs25, l'ADN parasite a été spécifiquement amplifié pour les gènes correspondant *Pf230* et *Pf25*. Les détails relatifs à ces gènes sont consignés dans le tableau II (Niederwieser *et al.* 2001). Le programme de cette PCR est une série de deux amplifications consécutives, et sa particularité est liée à la décroissance progressive de la température d'hybridation à la première amplification (Fig.11). La température d'hybridation de 58°C au premier cycle baisse de 1°C à chaque cycle jusqu'à 48°C au dernier cycle (touchdown PCR ou PCR par essai).

Tableau II : Récapitulatif des amorces utilisées pour amplifier les gènes *Pf25* et *Pf230*

Gène	Amorces	Séquence (5' → 3')	Taille (pb)
<i>Pf25</i>	Pfs25F3	TTCATTCAACTTAGC	588
	Pfs25L1	AAACATAATGCTTAGATT	
<i>Pf230</i>	F	GTGATTTTCAACAGGTTTCG	693
	R	TTTATTATAATCATCATGTCTGC	

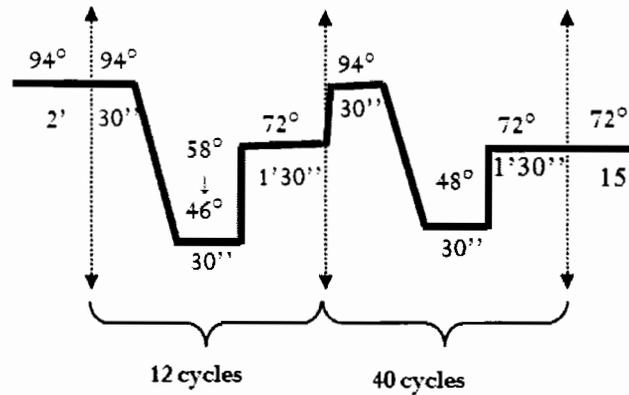


Figure 11: Diagramme d'amplification du gène *Pf25* et *Pf230*

I.3.2.2. Purification des produits PCR et réaction de séquence

Tous les produits d'amplification ont migré par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant du BET. Les produits PCR révélés positifs à la migration ont été ensuite, purifiés grâce à un système de billes magnétiques, le système Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter inc, beverly, Ma) (annexe 4). Cette purification permet de débarrasser de l'ADN des réactifs PCR, pour n'obtenir que les gènes d'intérêts amplifiés. Par la suite, la réaction de séquence a été effectuée à partir de l'ADN purifié suivant le diagramme présenté en figure 12.

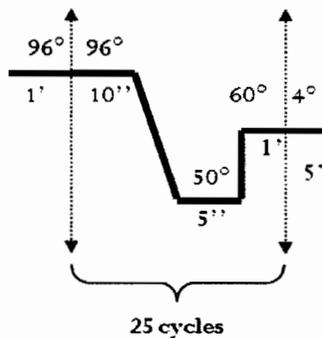


Figure 12: Diagramme schématisant la réaction de séquence

I. 2.3.3. Purification des produits de réactions de séquences et séquençage

Les produits de réaction de séquence ont été à nouveau purifiés grâce un autre système de billes magnétiques, le système Agencourt CleanSeq (Beckman Coulter inc, beverly, Ma) (annexe 4). Les produits d'ADN issus de cette dernière purification ont été passés au séquenceur. Puis, Les résultats ont été analysés avec le logiciel SeqScape v2.5 et les séquences des gènes *Pf25* et *Pf230* de la souche NF54 ont servi de référence (Kaslow *et al.* 1989b; Niederwieser *et al.* 2001).

II. Résultats

II.1 L'efficacité du sérum humain anti-Pfs25 en conditions semi-naturelles

I.1.1. Blocage et réduction de la transmission par le sérum de personne immunisée

L'objectif de l'étude, était d'évaluer l'efficacité d'un sérum humain issu d'une immunisation anti-Pfs25 sur des isolats naturels *P. falciparum*. Les expériences ont été réalisées à concentration constante d'anticorps (109µg/ml), celle obtenue chez le volontaire immunisé, et ont porté sur du sang infecté provenant de 12 porteurs humains dont 7 au Burkina et 5 en Thaïlande. Les densités de gamétoocytes chez les personnes infectées étaient très variées, allant de 32 à 1328 gamétoocytes/µl avec en moyenne 133/µl (IC95% [78 ; 227]) au Burkina contre 409/µl (IC95% [62 ; 2706]) en Thaïlande. Chez les moustiques disséqués, une forte hétérogénéité a été observée dans la distribution des oocystes aussi bien dans les groupes expérimentaux (test & contrôle), que d'une expérience à une autre (Fig. 13). Le tableau III récapitule l'ensemble des données obtenues au Burkina Faso et en Thaïlande ainsi que l'efficacité du sérum exprimée en termes d'activité bloquant la transmission (TBA) et d'activité réduisant la transmission (TRA) de l'infection.

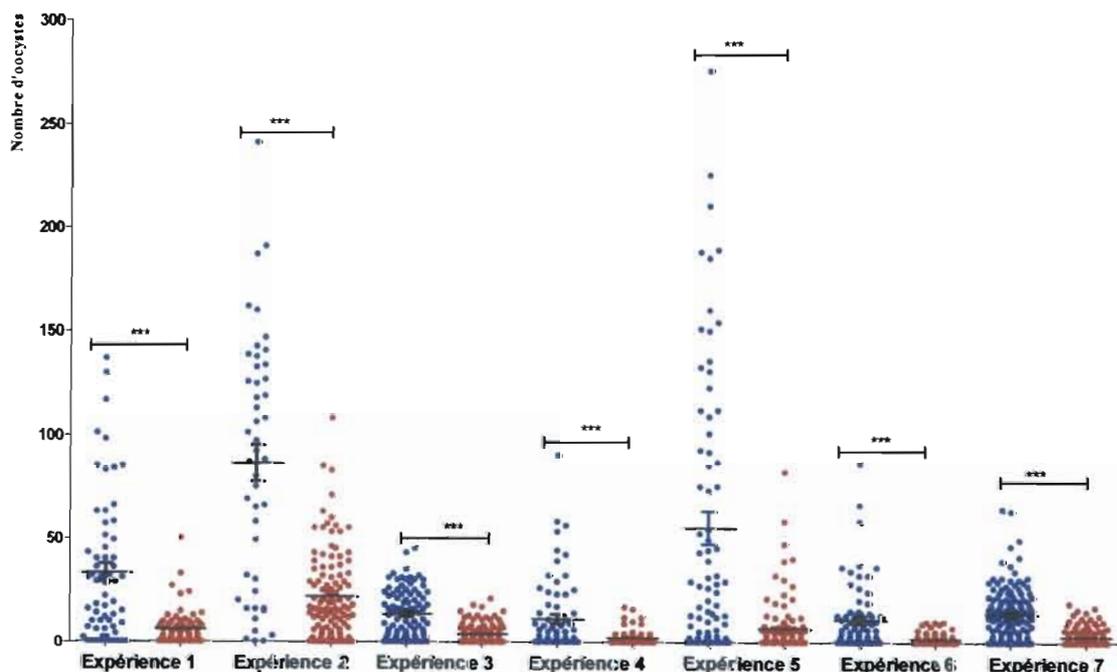


Figure 13: Distribution du nombre d'oocystes dans les expériences testant le sérum anti-Pfs25 au Burkina Faso. Les points représentent le nombre d'oocystes comptés sur les estomacs des moustiques (en bleu pour le contrôle et en rouge pour le test en présence de sérum de personne immunisée). Les étoiles au-dessus des nuages de points indiquent les significativités des tests statistiques (Mann-Whitney test, $P < 0.0001$) entre groupe test et groupe contrôle de chaque expérience.

Tableau III: Récapitulatif des données sur les expériences testant le sérum anti-Pfs25

Pays	D.G.	Prévalence en % (Infecté/Disséqué)		TBA % (IC 95%)	<i>p-value</i>	Intensité Moyenne ; Médiane (EI*)		TRA % (IC 95%)	<i>p-value</i>
		Contrôle	Test			Contrôle	Test		
Thaïlande	336	80,00 (96/120)	14,16 (17/120)	82,5 [72,1 ; 89,0]	<i>0.003</i>	20,1 ; 9 (1-30)	0,7 ; 0 (0-0)	96,9 [88,9 ; 99,2]	<i>0.0021</i>
	720	86,66 (52/60)	56,66 (34/60)	34,8 [14,5 ; 50,3]	<i>0.013</i>	144,1 ; 140 (96-236)	12,9 ; 2 (0-14)	91,8 [66,5 ; 98,0]	<i>0.0097</i>
	32	61,66 (74/120)	14,16 (17/120)	77,4 [59,2 ; 87,5]	<i>0.003</i>	2,6 ; 2 (0-4)	0,3 ; 0 (0-0)	91,2 [56,9 ; 98,2]	<i>0.0190</i>
	1120	85,00 (51/60)	80,00 (48/60)	5,6 [-20,5 ; 26,0]	<i>0.512</i>	149,3 ; 112 (8-246)	97,2 ; 58 (5-166)	33,8 [-67,1 ; 73,8]	<i>0.2827</i>
	1328	94,04 (79/84)	95,45 (63/66)	-1,1 [-15,1 ; 11,2]	<i>0.772</i>	222,9 ; 162 (49-345)	70,0 ; 53 (22-120)	71,0 [-21,7 ; 93,1]	<i>0.0743</i>
Burkina Faso	128	84,13 (53/63)	72,60 (53/73)	14,9 [-7,6 ; 32,7]	<i>0.125</i>	33,4 ; 28 (6-49)	6,3 ; 4 (0-9)	80,6 [58,5 ; 91,0]	<i>0.0059</i>
	184	95,74 (45/47)	85,32 (93/103)	10,5 [-10,4 ; 27,5]	<i>0.181</i>	86,4 ; 88 (24-133)	22,0 ; 16 (5-33)	73,6 [63,6 ; 80,9]	<i>0.0003</i>
	64	86,02 (80/93)	61,46 (59/96)	27,1 [5,2 ; 43,9]	<i>0.034</i>	13,7 ; 13 (3-23)	3,9 ; 2 (0-7)	72,0 [63,9 ; 78,2]	<i>0.0002</i>
	128	61,76 (42/68)	29,51 (18/61)	48,5 [1,2 ; 73,2]	<i>0.047</i>	11,4 ; 3 (0-16)	2,0 ; 0 (0-2)	80,0 [29,2 ; 94,4]	<i>0.0251</i>
	360	78,05 (64/82)	64,42 (67/104)	19,2 [-10,4 ; 40,8]	<i>0.099</i>	54,9 ; 22 (2-92)	6,8 ; 2 (0-7)	87,1 [76,1 ; 93,1]	<i>0.0015</i>
	128	80,00 (60/75)	41,86 (36/86)	48,7 (31,9 ; 61,3)	<i>0.003</i>	11,1 ; 5 (1-14)	1,6 ; 0 (0-2)	84,6 [66,2 ; 93,0]	<i>0.0050</i>
	80	83,33 (110/132)	50,00 (65/130)	40,1 [25,8 ; 51,6]	<i>0.003</i>	14,0 ; 13 (2-21)	2,7 ; 1 (0-4)	80,9 [72,4 ; 86,7]	<i>0.0003</i>

*: Ecart Interquartile (EI) est une mesure de dispersion qui s'obtient en faisant la différence entre le premier et le troisième quartile

D.G. : densité de gamétocytes par microlitre de sang des différentes personnes infectées. Les p-values ont été mesurées entre les valeurs catégorielles en utilisant le test de Chi2 pour les moyennes et le test de Mann Whitney pour les intensités.

II.1.2. l'efficacité du sérum anti-Pfs25 en fonction du niveau de l'infection

Pour 10 des 12 expériences, l'analyse statistique a révélé une réduction (TRA) significative du nombre d'oocystes dans les groupes tests comparés aux groupes contrôles. En revanche, il a été révélé une faible efficacité en termes de blocage de la prévalence de l'infection (TBA). En effet, la TBA a été significative pour seulement 7 des 12 expériences (Tableau III). De plus, une importante fluctuation du TBA en fonction des expériences a été révélée, allant de -1,1 % (efficacité nulle) à 82,5%, suggérant l'implication de facteurs explicatifs. Une analyse de méta-régression (réalisée par M. Fay, NIH) a été effectuée dans le but d'identifier les facteurs expliquant ces variations d'efficacité bloquant la transmission du sérum. En moyenne, 51,2% et 30,1% de TBA ont été obtenues respectivement en Thaïlande et au Burkina. L'analyse de méta-régression révèle que ces différences observées ne sont pas liées aux sites mais sont plutôt associées à la variation de la densité de gamétocytes. En effet, l'intensité de l'infection (moyenne d'oocystes dans le groupe contrôle) dérivant de la densité de gamétocytes a été identifiée comme le facteur potentiellement impliqué. Afin de visualiser l'effet de l'intensité de l'infection, les TRA et TBA ont été présentés dans de graphes, en fonction de la moyenne d'oocystes dans le lot contrôle (Figure 14). Le TRA varie très peu en fonction de l'intensité de l'infection (Figure 14A) alors que le TBA est négativement corrélé à l'intensité de l'infection (Figure 14B). Ces résultats tendent donc à montrer un rôle important de l'intensité de l'infection (nombre moyen d'oocystes dans le lot contrôle) sur l'efficacité de blocage de la transmission. Cet aspect sera détaillé dans le chapitre 2.

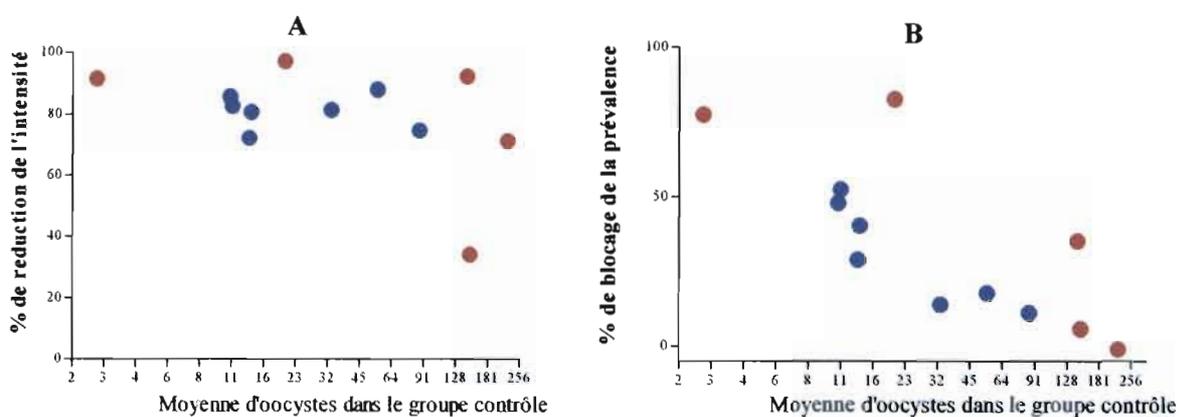


Figure 14: Relation entre l'efficacité du sérum anti-Psf25 et l'intensité de l'infection.

(A) indique la réduction de l'intensité de l'infection (TRA) et (B) la diminution de la prévalence de l'infection (TBA) selon l'intensité moyenne d'infection dans le groupe contrôle de moustiques. Les points en bleu désignent les expériences réalisées aux Burkina Faso et en rouge celles de la Thaïlande.

II.2. L'efficacité d'anticorps issus de souris immunisées

En rappel, 5 anticorps ont été générés chez les souris au « Jenner Institute » et leurs efficacités respectives ont été évaluées sur des *Plasmodium* de culture NF54. Il s'agissait des anticorps dirigés contre les antigènes Pfs25, Pfs230, Pfs48/45 natif et Pfs48/45 de *P. falciparum* et un anticorps spécifique de l'antigène AgAPN1, une protéine de l'estomac d'*An. gambiae*. La différence entre les deux variantes de l'antigène Pfs48/45 réside dans la présence/absence d'un groupement glycosyl à l'extrémité N-terminal de la protéine. A l'état naturel, ce groupement existe sur la protéine (Pfs48/45_{+NGln} ou Pfs48/45 natif), mais dans la construction de la molécule vaccinale il a été jugé nécessaire de le supprimer (Pfs48/45_{-NGln} ou Pfs48/45) afin de mesurer son importance.

Notre objectif était donc d'évaluer l'efficacité de ces anticorps chez le système biologique *P. falciparum* – *An. coluzzii*, en fonction de 3 paramètres : la diversité des parasites ; le niveau d'infection des moustiques et la concentration d'anticorps. Les femelles d'*An. coluzzii* ont été nourries sur du sang infecté par des gamétocytes de *P. falciparum* contenant les anticorps et l'efficacité a été évaluée en termes d'activité bloquant la prévalence de l'infection et d'activité réduisant l'intensité de l'infection.

II.2.1. L'Efficacité comparée des 5 anticorps

En premier lieu, nous avons voulu mesurer l'efficacité de chacun des anticorps. Dans une première expérience comparative, les 5 anticorps ont été testés à la même concentration (500 µg/ml) ajouté à du sang infecté d'un même individu. Cette concentration d'anticorps de 500µg/ml fixée dans l'expérience est proche de celle testée en conditions de laboratoire (650µg/ml) sur la souche NF54 de *Plasmodium*, afin de pouvoir comparer les résultats. Des femelles d'*An. coluzzii* ont été nourries avec le sang infectieux et un des anticorps, elles ont été disséquées 7 jours plus tard pour la détection des oocystes. Le porteur de gamétocyte a généré ici une infection de forte intensité puisque 61,79 oocystes en moyenne (IC 95% [45,04 ; 78,53]) ont été trouvés dans le groupe contrôle. Les résultats montrent une très grande variation dans la distribution du nombre d'oocystes pour les différents anticorps testés (Fig. 15). Une analyse statistique a révélé 3 informations principales :

(i) Les deux lots de moustiques contrôles (gorgés sur du sang avec sérum AB ou anticorps contrôle) montrent des niveaux d'infection similaires aussi bien en termes de prévalence

d'infection (test de Chi 2, $p=0,2991$) qu'en termes d'intensité d'oocystes (Mann Whitney test, $p= 0,1341$) confirmant ainsi la neutralité de l'anticorps contrôle et du tampon de purification sur le parasite.

(ii) Les anticorps dirigés contre les antigènes AgAPN1, Pfs48/45 (toutes les deux variantes) n'ont pas montré d'effet sur la formation des oocystes (Mann Whitney test, $p > 0.1286$).

(iii) Les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont montré une forte activité de blocage de la prévalence de l'infection : respectivement 80% et 100% d'efficacité.

Sur la base de ces analyses directives, nous avons orienté les expériences en deux groupes visant chacun à vérifier les observations (ii) et (iii).

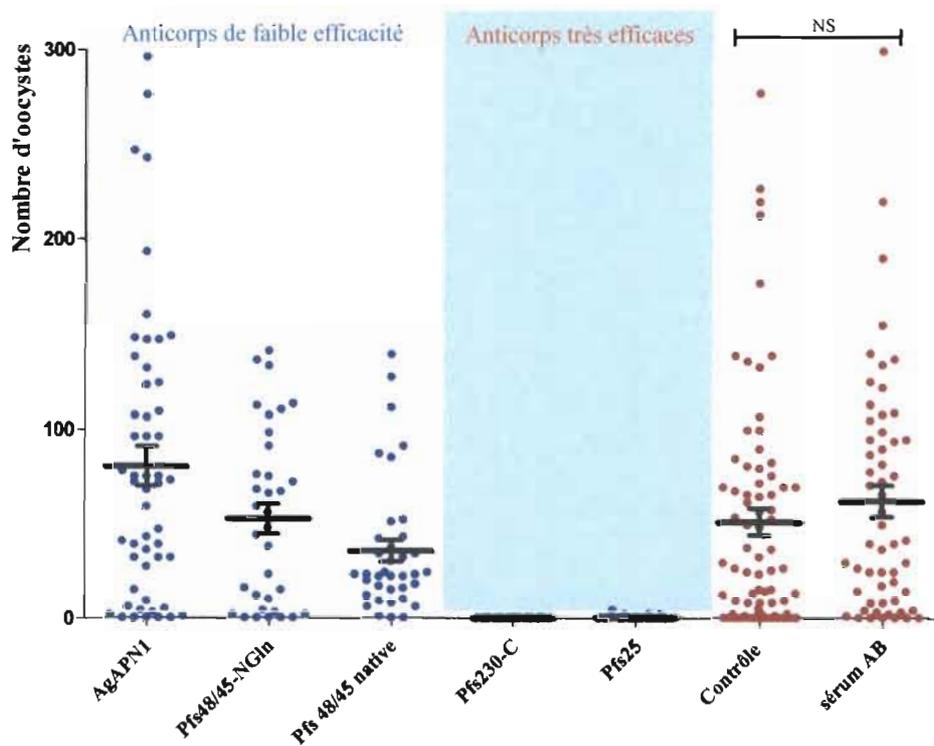


Figure 15 : Comparaison de l'efficacité des anticorps en termes de distribution d'oocystes.

Les points représentent le nombre d'oocystes comptés sur les estomacs des moustiques (en bleu pour les groupes tests et en rouge pour les groupes contrôles). La barre horizontale représente la moyenne. NS : non significatif.

II.2.2. Confirmation de la faible efficacité de 3 anticorps

Les anticorps Pfs48/45 natif, Pfs48/45-NGln, AgAPN1 n'ont pas montré d'efficacité significative lors du premier essai. Afin de comprendre si ce résultat était lié à l'isolat de parasite issu du donneur de gamécyte, une deuxième expérience a été réalisée avec ces

mêmes anticorps à la même concentration (500 µg/ml). Le donneur de sang présentait une densité de 120 gamétocytes/µl de sang. Le contrôle a généré en moyenne 64,15% [50,62 ; 75,70] de moustiques infectés avec 8,54 oocystes en moyenne (IC 95% [5,25 ; 11,69]). Dans cet essai, l'anticorps Pfs48/45 natif a totalement bloqué l'infection. Par contre, Pfs48/45-NGIn a réduit la prévalence de l'infection de 77,73% et réduit l'intensité de 87,18%. Pour AgAPN1, une réduction de 65,47% de l'intensité a été observée, alors que l'effet de blocage sur la prévalence était de 22,06% (Fig.16). Une troisième expérience, effectuée en guise de confirmation, a malheureusement porté sur du sang infecté par plusieurs espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum* et *P. malariae*), ne permettant pas d'apprécier l'action des anticorps spécifiques à *falciparum*. Mais en se résumant à ces deux expériences et à une concentration d'anticorps aussi élevée, il ressort que ces trois anticorps ont une faible activité fonctionnelle sur les isolats naturels de *Plasmodium*.

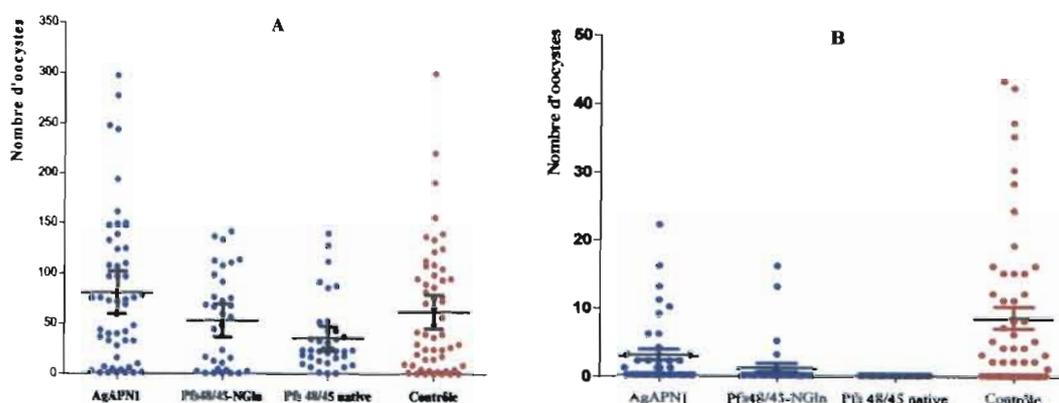


Figure 16 : Distribution d'oocystes au sein des moustiques gorgés sur les anticorps à faible efficacité. Les points représentent le nombre d'oocystes comptés sur les estomacs des moustiques (en bleu pour le contrôle et en rouge pour le test) pour deux expériences pour lesquelles le nombre moyen d'oocystes chez les moustiques contrôles est 61.79 (A) ou 8.54 (B).

II.2.3. Mesure approfondie de l'efficacité des anticorps Pfs25 et Pfs230

Afin d'estimer l'efficacité des deux candidats vaccins en tenant compte de la diversité des isolats de parasites, les anticorps spécifiques de Pfs25 et Pfs230 ont été simultanément testés avec du sang infecté provenant de plusieurs donneurs. Au total, 7 expériences, utilisant chacune un sang infecté et un ou plusieurs titres d'anticorps, ont été réalisées. Pour l'ensemble des expériences, l'efficacité des anticorps a été estimée en termes d'activité blocage de la transmission (TBA) et l'activité réduction la transmission (TRA) (Tableau IV). Selon les expériences, la TBA et la TRA ont été complètes ou non.

Tableau IV : Récapitulatif de l'efficacité des anticorps Pfs25 et Pfs230 en fonction de leur concentration et l'intensité de l'infection

		Expérience 1 (I = 62)		Expérience 2 (I = 8,63)		Expérience 3 (I = 295)		Expérience 4 (I = 5,63)		Expérience 5 (I = 8,47)		Expérience 6 (I = 5,84)		Expérience 7 (I = 0,77)	
		TBA	TRA	TBA	TRA	TBA	TRA	TBA	TRA	TBA	TRA	TBA	TRA	TBA	TRA
Pfs230	500 µg/ml	100%	100%			35.22%	96.55%								
	250 µg/ml			100%	100%	5.61%	59.58%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
	125 µg/ml							73.51%	87.81%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	62,5 µg/ml							57.59%	68.37%	100%	100%	50%	69.07%	100%	100%
	31,25 µg/ml							36.36%	33.45%					27.08%	-12.83%
Pfs25	500 µg/ml	80%	99.37%	100%	100%	100%	100%								
	250 µg/ml			100%	100%	40.41%	95.64%	100%	100%			100%	100%		
	125 µg/ml							80.68%	90.23%						
	62,5 µg/ml							52.27%	59.23%						
	31,25 µg/ml							30.45%	43.65%						

I = Intensité de l'infection dans le groupe contrôle (Moyenne d'oocyste par moustique) ; **TBA** = activité bloquant la transmission ; **TRA** = activité réduisant la transmission

II.2.4. Effet du titre d'anticorps sur la réduction et le blocage de la transmission

Afin de déterminer la relation entre le titre des anticorps et leur efficacité, les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont été testés à différentes concentrations sur le sang infecté du même porteur (expérience 4, tableau IV). Pour une densité de 80 gamétocytes/ μl dans le sang du porteur, nous avons observé une moyenne d'environ 6 oocystes par moustique dans le groupe contrôle. A cette intensité d'infection, une régression linéaire a été effectuée entre les concentrations d'anticorps et leur efficacité. Cette analyse a révélé que pour chacun des deux anticorps, l'efficacité en termes de blocage de la prévalence et de réduction de l'intensité, est positivement corrélée avec leur concentration dans le sang (Coefficient de corrélation $r^2=0,8439$ et $r^2=0.8087$ pour Pfs230 et Pfs25 respectivement) (Fig. 17).

En conclusion, le sérum anti-Pfs25 issu de l'immunisation d'un homme et de titre 100 $\mu\text{g/ml}$, s'était avéré plus efficace en faible intensité d'infection. Ici, pour une intensité fixe, l'anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont montré une efficacité qui augmente avec leur concentration. Ces observations démontrent donc que l'efficacité des anticorps dépend à la fois de leur concentration dans le sang et de l'intensité de l'infection.

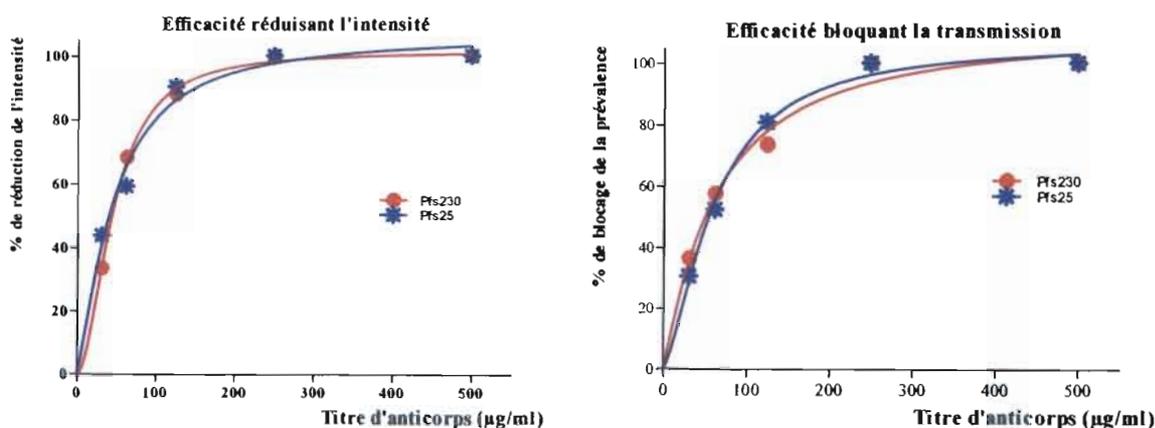


Figure 17: Relation entre l'efficacité des anticorps et leur concentration dans le sang. Pour isolat donné de *Plasmodium*, les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont été testés à différentes concentrations. Les graphes A et B indiquent respectivement l'activité réduisant la transmission et l'activité bloquant la transmission en fonction de leur concentration.

II.3. Résumé de l'efficacité des candidats vaccins

Pour être efficace, un vaccin TBV devra réduire la prévalence d'infection afin d'affecter la chaîne de transmission du paludisme. Il est attendu que réduire seulement l'intensité de l'infection (nombre d'oocystes parmi les moustiques infectés) ne devrait pas impacter la

transmission du paludisme. En effet, un nombre limité d’ocystes, voire un seul, suffit à assurer le caractère infectieux du vecteur ((Vaughan *et al.* 1992, 1994; Vaccines. 2011)). Pour cette raison, l’efficacité du TBV devra se mesurer par son effet sur la prévalence de l’infection chez les moustiques exposés (TBA). Ainsi, nous avons réalisé une synthèse graphique intégrant à la fois le TBA, la concentration d’anticorps et l’intensité de l’infection à partir de toutes les expériences réalisées avec les anticorps de souris (Fig. 18). Ces graphes permettent de visualiser le fait que pour chaque intensité de l’infection, il existe une concentration minimale d’anticorps requise pour un blocage total de la transmission. A titre d’exemple, une intensité de 20 ocystes en moyenne dans le groupe contrôle requiert une concentration d’environ 125µg/ml de l’anticorps anti-Pfs230 pour un blocage total de la transmission du parasite. Ainsi, nous avons défini une zone (nommée zone d’efficacité) correspondant aux différentes combinaisons (titres d’anticorps/intensités de l’infection) pour lesquelles le blocage de la transmission est quasi-total. Nous percevons ici que de telles données pour des anticorps produits chez l’homme permettraient de réaliser des modèles dans le but d’estimer l’efficacité du TBV en fonction du titre d’anticorps obtenu chez les sujets immunisés et les modalités de la transmission.

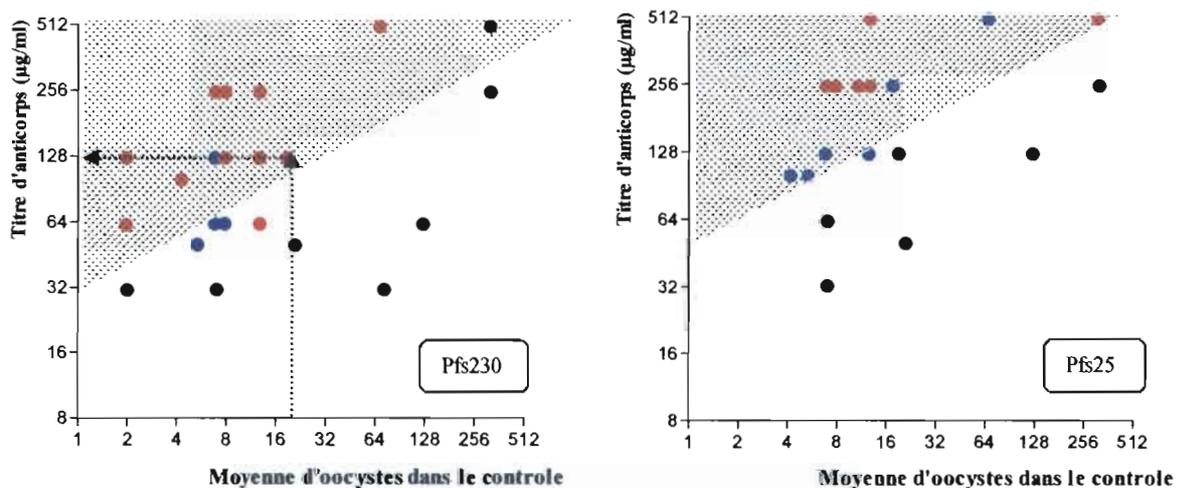


Figure 18: Représentation graphique de l’efficacité des candidats TBV

L’intensité de l’infection dans le groupe contrôle a été placée en abscisse et la concentration d’anticorps en ordonnée. Les différents points indiquent les efficacités correspondant à chaque combinaison concentration d’anticorps / intensité de l’infection. Les couleurs des points correspondent au niveau d’efficacité avec : ● = efficacité < 70%, ● = efficacité 70 % - 99% et ● = 100% d’efficacité. La section marquée en pointillée désigne une zone dite de certitude i.e. à l’intérieur de laquelle toute concentration d’anticorps est susceptible de bloquer l’intensité de l’infection qui lui est associée.

II. 4. Une diversité parasitaire sans impact sur l'efficacité des candidats TBV

II.4.1. La structure génotypique de l'infection n'affecte pas l'activité des anticorps

Au cours de cette étude nous avons observé des efficacités partielles dans certaines expériences aussi bien pour le sérum humain anti-pfs25 que pour les différents anticorps issus de souris. Afin de vérifier si la multiplicité d'infection impacte l'efficacité des TBV, nous avons procédé au génotypage des isolats naturels de *Plasmodium* du stade sanguin et du stade oocystes par la technique des microsattellites. Sur un total de 36 échantillons de sang infecté analysés 34 personnes se sont révélés être infectées par plusieurs clones de *Plasmodium*. Pour 8 des 36 patients les parasites au stade oocyste chez les moustiques infectés, ont été génotypés en parallèle avec ceux du stade sanguin. En assimilant les oocystes issus des moustiques de la même expérience comme étant d'une même population de parasite, nous avons reconstitué l'ensemble des haplotypes ayant infecté ces moustiques. Ainsi, plusieurs haplotypes parasitaires ont été également observés chez les moustiques infectés. Toutefois, l'analyse comparative de génotypes des deux stades de parasite révèle des similitudes comme des différences d'haplotypes dans plusieurs cas (tableau V). Tout compte fait, la combinaison des résultats des deux stades a permis d'identifier l'ensemble d'haplotypes ayant infecté les patients : 5 à 12 haplotypes (tableau V). De cette analyse, il ressort que la quasi-totalité des patients du Burkina Faso sont infectés par différents haplotypes. En revanche, un seule haplotype a été révélé chez 4 patients (sur 5) de la Thaïlande suggérant une infection quasiment monoclonale. Toutefois, les infections à multiples haplotypes n'a pas un impact sur l'efficacité des candidats TBV. En conclusion, en dépit des contrastes observés entre les nombres d'haplotypes dans la population au Burkina et en Thaïlande, les résultats sont restés similaires en termes d'efficacité du sérum anti-Pfs25. Nous avons observé des génotypes parfois différents entre les stades de parasites chez l'homme et les stades oocystes chez le moustique. La présence d'un génotype dans le sang, absent chez le moustique peut être du au fait que les stades sanguin incluent des formes asexuées non transmissibles aux moustiques. La présence d'haplotypes chez les moustiques non identifiés chez l'homme pourrait s'expliquer par la faible densité du génotype chez l'homme difficilement détectable la technique de la PCR. Nous envisageons à l'avenir, d'analyser les génotypes dans les différents groupes de moustiques (contrôles et tests) afin de déterminer une éventuelle sélection.

Tableau V : Récapitulatif du génotypage des isolats de *Plasmodium* Burkina Faso

	Poly α	TAA109	ARA2	TAA60	PfPK2	TAA87	Pf377	Haplotypes	
	NF54	152	83	69	96	168	99	174	1
A	Sang	153, 156, 159, 162, 166	71	63, 72	97, 100, 103, 106	159, 162, 168	91	165, 174, 178	6
	Oocyste	153, 156, 178	71, 74, 80, 83, 86	63, 66, 69, 78	97, 100	162, 165, 175	97, 99, 105, 108	150, 157, 165	
B	Sang	133	74	72	93, 103	162	105	162, 198	9
	Oocyste	137, 139, 142, 150, 153, 159, 168, 181	71, 74, 77, 80, 83, 86	60, 63, 66, 69, 72, 78	97, 100, 103	159, 162, 165, 168, 175,	99, 102, 105, 108, 111, 119	150, 162, 165, 174, 178	
C	Sang	150, 153, 156,	71, 74, 83, 86	63, 66, 78	97, 100, 106	162, 165	88, 91, 99	150, 165, 198,	6
	Oocyste	150, 156, 159, 166	80	66, 69, 78	93, 100	159, 172	99, 105, 108, 111	165, 174, 178, 190	
D	Sang	139, 142, 150, 153, 156, 159, 162, 166, 168, 172, 174	71, 74, 77, 80, 83, 86, 90	60, 63, 66, 69, 78	93, 97, 100, 103, 106	159, 162, 165, 168, 172, 175	102, 105, 108, 114	162, 165, 174, 178, 198	11
	Oocyste	150, 159, 162	74, 80	66, 072	93, 100	162, 172	108,	178,	
E	Sang	130, 150, 153, 156, 159, 162, 166, 174	71, 74, 80, 90	66, 69, 72, 75, 78	93, 97, 100	159, 162, 165, 168, 172, 175	97, 99, 102, 105, 108, 122	162, 165, 174, 178, 190, 198	11
	Oocyste	153, 159, 168, 172, 187	74, 77, 83	63, 66, 69, 72	97, 100, 103, 106	159, 190	102, 105	165, 178	
F	Sang	142, 146, 150, 153, 156, 159, 162, 166, 168	74, 80, 83, 86	66, 69, 72, 75	93, 97, 100, 106	162, 165, 168, 172	102, 117	162, 174, 178, 187, 198	9
	Oocyste	153, 156, 162, 166, 172	71, 74, 80, 83	60, 63, 66, 69, 75	97, 100, 103, 106	159, 162, 165, 168	91, 97, 102, 105, 108, 111	162, 165, 174, 178	
G	Sang	150, 156, 159, 162, 166, 168	74, 77, 80, 83	66, 69, 75	93, 97, 100, 103, 106	159, 165, 168, 172, 190	NA	162, 165, 174, 178	9
	Oocyste	150, 153, 156, 159, 162, 166, 168, 172, 178	71, 74, 77, 80, 83	63, 66, 72, 81, 90	93, 97, 100, 103	162, 165, 168, 172, 175, 181	094, 099, 102, 105, 108, 111, 119	162, 165, 174, 178, 181, 184	
H	Sang	153	71, 74, 77, 80, 83	66, 72, 75	97, 100	162, 165	97, 102, 105	162, 178	5
	Oocyste	150, 153, 156, 172	71, 80, 83	63, 66, 72, 81	100, 103	159, 162, 168, 175	99, 102, 105, 111	162, 165, 178	

II.4.2 une absence de polymorphisme des gènes *Pf25* et *Pf230*

Afin de détecter un lien potentiel entre l'efficacité des candidats vaccins et le polymorphisme des gènes codant pour les protéines cibles Pfs25 et Pfs230, l'ADN parasite du sang et des oocystes, a été amplifié puis séquencés pour ces deux gènes. Pour les parasites dans le sang, trente cinq (35) échantillons d'ADN ont été séquencés pour les gènes *Pf25* et *Pf230*. Nous n'avons pas décelé de mutation parmi les parasites dans le sang. La Figure 19 présente à titre d'exemple le profil de la séquence nucléotidique d'un échantillon pour le gène *Pf25*.

Nous avons émis l'hypothèse qu'il peut exister des variantes rares de parasites qui ne seraient pas détectées par PCR à partir des échantillons de sang car présentes en faible densité par rapport au génotype majoritaire. Nous avons donc séquencé ces gènes depuis les parasites au stade oocyste chez les moustiques. Pour 5 expériences ayant testé l'efficacité du sérum anti-Pfs25, nous avons isolé 495 oocystes d'une cinquantaine d'estomacs de moustiques infectés issus du groupe test et du groupe contrôle. L'ADN issu de ces 495 oocystes a été séquencé pour cet antigène. Les résultats de l'ensemble de séquençage analysés n'ont révélé de mutation ponctuelle. En somme, en dépit de la forte diversité génotypique des parasites, nous n'avons pas décelé de polymorphisme pour les antigènes Pfs25 et Pfs230. Cette observation confirme le faible polymorphisme connu pour ces antigènes (Shi *et al.* 1992 ; Williamson & Kaslow 1993; Niederwieser *et al.* 2001; Manske *et al.* 2012), qui constitue un atout pour l'efficacité des TBV les ciblant.

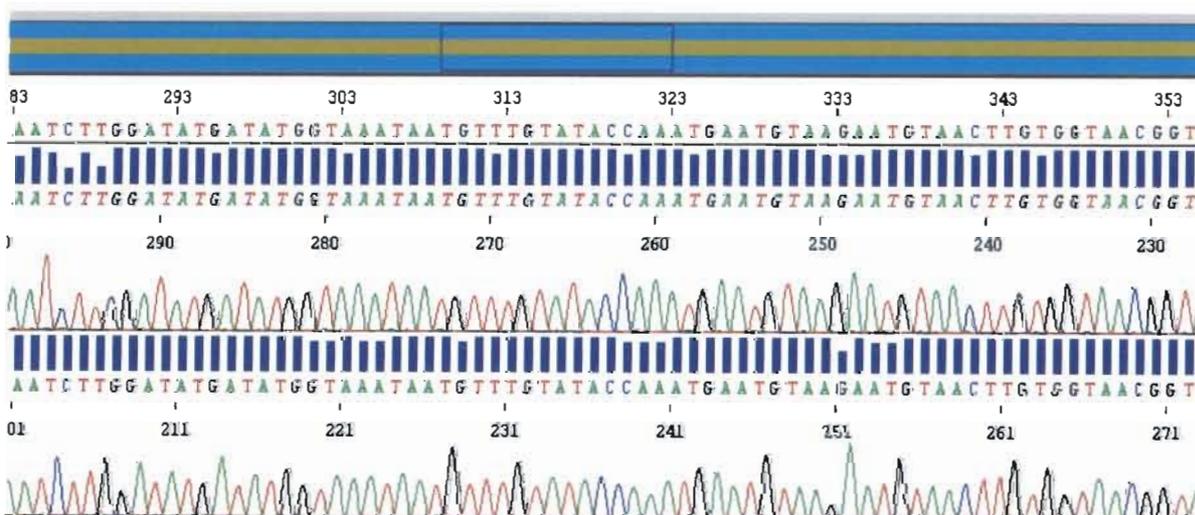


Figure 19 : profil de séquences nucléotidiques d'un fragment du gène *Pf25*.

Les deux séries de pics marqués en couleurs indiquent les signaux des bases le long du brin d'ADN et la longueur des bâtons bleus située au-dessus traduit la qualité du signal. Ces pics sont traduits en nucléotides avec leur position respective sur la séquence.

III Discussion

III.1. Efficacité du sérum humain anti-Pfs25 sur des isolats naturels de *P.*

falciparum

Dans cette étude, nous avons démontré que le sérum de personne immunisée contre l'antigène Pfs25 agit efficacement sur les isolats naturels de *P. falciparum* de deux faciès épidémiologiques différents (Thaïlande et Burkina Faso). En effet, nous avons observé une réduction substantielle de plus de 80% de l'intensité de l'infection (TRA) dans ces deux sites (Bousema *et al.* 2013). Ces résultats similaires s'expliquent en partie par la standardisation du protocole de part et d'autre, mais aussi par le fait que la concentration limitée d'anticorps n'agit que sur une partie des parasites. Le même sérum avait généré une réduction du nombre d'oocystes comprise entre 68 et 83% sur la souche NF54 de *P. falciparum* (Wu *et al.* 2008) ; des résultats qui sont conformes aux nôtres qui traduisent une fois de plus l'activité fonctionnelle des anticorps issus de cet essai vaccinal. L'efficacité du sérum était indépendante de la diversité génétique des isolats de parasites, avec une forte multiplicité d'infection au Burkina Faso et une majorité de mono-infections en Thaïlande. Le gène *Pf25* ne montrant pas de polymorphisme, on peut supposer que la diversité génétique n'affecte pas l'efficacité des anticorps, tant que la cible antigénique n'est pas variable.

En contraste, le blocage de la transmission par le sérum anti-Pfs25 (TBA) s'est avéré limité aussi bien au Burkina qu'en Thaïlande. Nous émettons l'hypothèse que ceci est dû à la forte intensité de l'infection observée dans les expériences au sein des groupes contrôles. En effet, nous avons observé une corrélation linéaire négative entre l'intensité de l'infection et le TBA, or nous avons sélectionné des porteurs humains à forte densité de gamétocytes pour nos expériences, engendrant ainsi des fortes intensités d'oocystes. Ces niveaux d'infection pourraient être probablement supérieurs aux niveaux d'infections naturels, en général moins de 5 oocystes (Sinden 1999b). Ainsi, il est vraisemblable que le sérum serait plus efficace dans des conditions où l'intensité de l'infection serait moindre, comme chez les moustiques naturellement infectés. Ces résultats suggèrent l'importance cruciale d'intégrer l'intensité de l'infection du groupe contrôle dans les mesures de l'efficacité des candidats TBV.

Au cours de ces travaux, nous avons pu tester pour la première fois un sérum humain immunisé pour Pfs25 sur des isolats naturels de *P. falciparum*, mimant ainsi, mieux que jamais fait jusqu'à présent, l'efficacité d'un vaccin TBV ciblant cet antigène. L'efficacité de

ce sérum, limitée en TBA a probablement été sous-estimée en étant testé dans des conditions de fortes intensité d'infection. Néanmoins nos résultats donnent un nouvel élan au concept de TBV qui, à un certain moment était confronté à un certain scepticisme (Hill 2011).

III.2. Efficacité des anticorps issus de souris immunisées

III.2.1. Vaccins à base de virus recombinant

Dans cette étude, 2 des 5 anticorps (anti-Pfs25 et anti-Pfs230) ont montré une grande efficacité alors que les 3 autres (AgAPN1, Pfs48/45 natif et Pfs48/45-NGIn) ont montré une efficacité très limitée vis-à-vis des isolats parasitaires de terrain. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en infections expérimentales avec le système vectoriel du laboratoire, *P. falciparum* NF54 – *An. stephensi* (Kapulu *et al.*, soumis). Il avait été déjà mentionné dans des études précédentes que les vaccins utilisant les virus recombinants comme vecteurs, pouvaient stimuler la réponse immunitaire (Draper *et al.* 2008; Draper *et al.* 2009; Goodman *et al.* 2010; Goodman *et al.* 2011). La grande immunogénicité des antigènes exprimée chez les souris et l'efficacité de certains anticorps à bloquer la transmission confirme que les virus recombinants comme vecteurs d'antigène pourraient être appropriés pour l'établissement de molécules vaccinales. Aussi, des essais cliniques phase I utilisant ces mêmes virus recombinants ont montré qu'ils sont bien tolérés chez l'homme (Sheehy *et al.* 2011; Sheehy *et al.* 2012).

III.2.2. Faible efficacité des anticorps anti-AgAPN1 et anti-Pfs48/45

Les antigènes AgAPN1, Pfs48/45-native Pfs48/45-NGIn se sont montrés très immunogènes lorsqu'ils ont été administrés aux souris, générant une importante quantité d'anticorps (Kapulu, *et al.*, soumis). Pourtant, testés même à forte concentration aussi bien sur les parasites de laboratoire que sur les isolats naturels, les anticorps dérivant de ces antigènes ont été d'un effet minime sur les parasites comparativement aux anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230. Cette faible efficacité peut être due à une faible affinité fonctionnelle des anticorps pouvant s'expliquer par plusieurs raisons.

Pour l'antigène AgAPN1, nos résultats sont en contraste avec ceux publiés précédemment (Dinglasan *et al.* 2007b; Mathias *et al.* 2012). Les auteurs des études précédentes ont monté

que les anticorps dirigés contre l'antigène AgAPN1 étaient susceptibles de bloquer le développement de *P. berghei* et *P. falciparum*. La divergence avec nos résultats pourrait s'expliquer par les épitopes utilisés pour l'immunisation : nos expériences ont utilisé comme antigène la protéine AgAPN1 quasiment entière alors que les expériences menées par l'équipe de Rhoel Dinglasan ont utilisé une partie plus restreinte de la protéine (Dinglasan *et al.* 2007a; Dinglasan *et al.* 2007b). La protéine entière a généré des anticorps spécifiques, mais pourtant moins efficaces (Kapulu, *et al.*, 2013). La différence d'efficacité selon la taille de l'antigène, pourrait être due un accès différent de l'épitope pour les anticorps.

Des deux variantes antigéniques Pfs48/45_{-NGln} et Pfs48/45-natif, seuls les anticorps résultant de l'immunisation par Pfs48/45-natif ont montré une réduction significative et bloquent à 100% la transmission pour un test en conditions de faible intensité d'infection. En rappel, Pfs48/45_{-NGln} et Pfs48/45-natif diffèrent par la présence du groupement glycosyl à l'extrémité N-terminale de la protéine native (Pfs48/45-natif). Ainsi nos résultats mettent en évidence le rôle de cette fonction glycosyl dans l'affinité des anticorps. D'autre part, la formulation d'un vaccin à base de l'antigène Pfs48/45 a longtemps été une limite majeure. En effet, il était difficiles d'exprimer la chaîne peptidique entière et obtenir sa maturation en conformation antigénique (Kocken *et al.* 1993; Outchkourov *et al.* 2008). L'utilisation de virus recombinants a permis de dépasser ces obstacles et fait de cette technique une avancée majeure pour l'expression de candidats vaccins. Cependant, la faible efficacité des anticorps malgré la bonne immunogénicité de Pfs48/45, souligne la nécessité d'une amélioration dans sa formulation. Le caractère polymorphe de cet antigène rapporté dans la littérature (Niederwieser *et al.* 2001) pourrait constituer une barrière supplémentaire pour produire un vaccin efficace sur la base de cet antigène.

III.2.3. Pfs25 et Pfs230, deux candidats vaccins prometteurs

III.2.3.1. Efficacité des anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230

Les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont montré une capacité à bloquer le développement des isolats sauvages de *Plasmodium* au sein de leurs vecteurs naturels. La conformité de ces résultats à ceux observés par Melissa Kapulu sur les spécimens de laboratoire, confirme l'efficacité des anticorps, et soutient la qualité de ces antigènes en tant que candidats vaccins prometteurs (Carter 2001; Eksi *et al.* 2006; Saul 2007, 2008; Sinden 2010a). Nous avons

démontré en conditions semi-naturelles que ces candidats vaccins agissent efficacement sur les parasites sauvages. Ceci confirme des résultats obtenus au Cameroun pour Pfs25 (Mulder *et al.* 1996). En intégrant les variables d'intensité de l'infection et titre d'anticorps dans l'évaluation, les deux anticorps présentent des différences vis-à-vis de leur efficacité. A concentration égale et pour une même intensité d'infection, les anticorps anti-Pfs230 sont plus efficaces que les anticorps anti-Pfs25. Autrement dit, pour obtenir un blocage total d'une intensité d'infection donnée, le titre nécessaire d'anticorps anti-Pfs25 est plus élevé que pour les anticorps anti-Pfs230. Plusieurs hypothèses pourraient concourir à expliquer cette différence d'efficacité. En rappel les protéines antigéniques Pfs230 s'expriment chez les gamètes 30 minutes après le repas sanguin du moustique et Pfs25 24 heures plus tard chez les oocinètes. L'apparition précoce des protéines Pfs230 pourrait favoriser leur accessibilité par les anticorps anti-Pfs230 toujours plus actifs dans le bol alimentaire de moustique comparativement aux anticorps anti-Pfs25 dont l'activité peut être atteinte avant la formation des oocinètes. D'autres paramètres tels que l'affinité des anticorps, leur mode d'action, le nombre de parasites ciblés sont des causes probables de la différence d'efficacité entre ces 2 candidats TBV. Des travaux en cours nous permettront d'apporter des éléments de réponses à cette observation.

III.2.3.2. Nécessité d'un modèle pour évaluer l'efficacité des candidats vaccins

Dans notre étude, nous avons démontré d'une part que l'efficacité des candidats vaccins est négativement corrélée à l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle. D'autre part, nous avons aussi mis en évidence une relation efficacité dose dépendante du titre d'anticorps. A l'issue de ces observations, nous avons fait une analyse graphique simple (intégrant les trois paramètres : intensité de l'infection, concentration en anticorps et efficacité) pour représenter les résultats obtenus pour les deux candidats vaccins Pfs25 et Pfs230. Cette synthèse graphique est une version simplifiée d'un modèle mathématique en cours de réalisation, en collaboration avec de l'Imperial College London, afin de parvenir à un outil performant pour évaluer l'efficacité des candidats vaccins.

En effet, les humains sont d'une part naturellement porteurs de densités variables de gamétocytes occasionnant différentes intensités d'infection chez les moustiques. D'autre part, pour une même dose d'antigène administrée à un groupe d'individus, il en résultera diverses réponses immunitaires engendrant des doses variées d'anticorps, liées à leur sensibilité aux

antigènes. Le modèle envisagé tient compte de ces différentes combinaisons naturelles et présente plusieurs avantages :

- il pourra servir de matrice de comparaison de l'efficacité d'un ou de plusieurs candidats vaccins testés dans un ou plusieurs laboratoires différents. Par notre modèle simplifié par exemple, Pfs230 apparaît plus efficace que Pfs25 (Fig.18).
- il servira également à estimer la dose d'anticorps nécessaire pour bloquer totalement la transmission pour une intensité d'infection donnée, donc pour un profil de transmission dans une région donnée.

Conclusion 1

Le sérum humain anti-Pfs25 qui s'était avéré efficace sur les souches de laboratoire agit efficacement sur les isolats naturels de Plasmodium indépendamment de leur profil génétique, au sein des vecteurs naturels. Cette observation confirme la qualité de ce candidat vaccin leader, lève les scepticismes autour de l'efficacité des candidats vaccins en conditions naturelles et renforce davantage le concept de TBV. Des cinq anticorps de souris testés, deux (anti-Pfs25 et anti-Pfs230) se sont avérés efficaces en conditions expérimentales semi-naturelles. L'immunisation par les virus recombinants s'avère donc être une alternative innovante dans la formulation des candidats TBV. Les efficacités respectives des candidats vaccins Pfs25 et Pfs230 se sont avérées dépendantes de la concentration de l'anticorps et du niveau de l'infection. Cette observation met en lumière le besoin de modéliser la relation entre les 3 paramètres, intensité de l'infection, titre d'anticorps et efficacité, afin d'évaluer avec plus de certitudes les différents candidats TBV. Pour y arriver, il est important de définir clairement au préalable la relation entre la dose infectante, l'intensité de l'infection et efficacité des TBV, un sujet qui constitue l'essentiel de notre chapitre 2.

Les résultats décrits dans ce chapitre ont été valorisés dans un article (Da *et al.* 2013b) publié dans le journal "Infection and Immunity" et un autre (Kapulu *et al.*), soumis dans le journal "Science Translational Medicine" (voir annexe 5).

Chapitre 4:

Relations entre la densité en gamétocytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV

Chapitre 4 : Relations entre la densité en gaméocytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV

Introduction

Au cours du Chapitre 1, nous avons testé différents candidats TBV, de différentes origines et agissant à différents stades de développement du parasite dans le moustique. Les résultats pour tous les candidats montrant une efficacité non nulle, suggèrent que, pour un titre d'anticorps donné, l'efficacité de la TBV sur la proportion de moustiques infectés (TBA) diminue quand la charge parasitaire augmente. La charge parasitaire a été mesurée par le nombre moyen d'oocystes dans les estomacs des moustiques contrôles (non soumis à l'action du candidat TBV). Cette observation peut avoir des répercussions importantes sur l'évaluation des candidats TBV. En effet, on comprend que selon la charge parasitaire à laquelle sont soumis les moustiques, on considèrera un candidat vaccin comme plus ou moins efficace. Pour cette raison nous nous sommes intéressés aux paramètres qui influencent la charge parasitaire chez les moustiques et les conséquences sur l'évaluation des TBV.

Un des principaux facteurs susceptibles d'influencer le succès de l'infection chez les vecteurs est la quantité de parasites infectieux ingérés par le moustique au cours de son repas sanguin, étroitement associée à la densité de gaméocytes de l'hôte. De nombreux travaux ont tenté d'établir une relation entre les densités de gaméocytes chez l'hôte vertébré et les différents stades de développement pour le système *P. berghei* – *An. stephensi* (Sinden *et al.* 2007a; Poudel *et al.* 2008) ainsi que pour le système *P. falciparum* - *An. gambiae* (Gouagna *et al.* 1999; Boudin *et al.* 2004). Cependant, plusieurs facteurs rendent cette relation complexe si bien qu'elle reste aujourd'hui mal établie (Blagborough *et al.* 2013). Par exemple, la gamétocytémie telle qu'estimée par la microscopie implique des imprécisions qui faussent la comparaison de gamétocytémies entre hôtes (Dowling & Shute 1966). En effet, les gamétocytémies sont estimées sur la base du nombre d'hématies ou de leucocytes de l'hôte, or ces paramètres hématologiques sont très variables d'un individu à l'autre (McKenzie & Bossert 2005a; McKenzie *et al.* 2005b). En plus de cette incertitude dans l'estimation de la gamétocytémie, d'autres facteurs varient d'un isolat de parasites à l'autre. Il peut s'agir de la maturité des gaméocytes, le sexe ratio, certains facteurs génétiques et la multiplicité de l'infection (Mitri *et al.* 2009 ; Harris *et al.* 2010; Nsango *et al.* 2012) ; ces facteurs viennent

compliquer davantage l'établissement de la relation entre densité de gamétocytes et succès de l'infection. Ainsi, les relations élaborées sur la base des gamétoctémies estimées de plusieurs patients s'avèrent peu précises.

Déterminer la relation entre la charge parasitaire infectieuse ingérée par les moustiques et le succès de l'infection chez le moustique permettrait d'évaluer l'efficacité des vaccins bloquant la transmission dans des conditions expérimentales contrôlées et permettrait d'établir la relation entre intensité de l'infection et efficacité de l'intervention. Sur le plan technique, une stratégie pour contrôler la variabilité entre isolats de parasites est de diluer les gamétocytes d'un isolat donné en vue d'évaluer avec précision la relation entre densité gamétoctaire et infectivité.

Dans la perspective de l'utilisation de TBV pour lutter contre le paludisme, plusieurs systèmes biologiques artificiels comme naturels ont été utilisés pour appréhender les différents aspects de la transmission. Le système artificiel, *P. berghei* – *An. stephensi*, a été largement utilisé dans de nombreux travaux de laboratoire (Tirawanchai *et al.* 1991; Ramjanee *et al.* 2007; Mlambo & Kumar 2008a) pour ces multiples avantages: il est particulièrement robuste pour les expérimentations au laboratoire et facilite la réalisation de certaines expériences techniquement ou éthiquement impossibles avec le système naturel. Toutefois, l'extrapolation des résultats sur le système naturel ne doit se faire qu'avec précaution en raison des différences profondes entre les deux systèmes (Boete 2005; Cohuet *et al.* 2006; Dong *et al.* 2006). En particulier, la densité de l'infection chez les hôtes vertébrés diffère fortement entre les systèmes naturels et artificiels, le parasite murin donnant des charges parasitaires très élevées. Ainsi, bien que l'utilité du système artificiel soit évidente pour certaines phases d'expérimentation sur les molécules anti-*Plasmodium*, les résultats ne permettent pas une extrapolation directe au système naturel. Dans ce chapitre nous cherchons à établir la relation entre densité gamétoctaire chez l'hôte vertébré et succès de l'infection chez le moustique dans le système naturel *P. falciparum*-*An. coluzzii* et dans le système *P. berghei*-*An. stephensi*. Nous cherchons ensuite à définir les conséquences de cette relation lors de l'évaluation des candidats TBV. Nous avons donc dans un premier temps effectué des dilutions de *P. falciparum* et *P. berghei* et mesuré l'infectivité des différentes charges gamétoctaires chez les moustiques exposés. Dans le système *P. berghei*-*An. stephensi*, nous avons pu combiner ces dilutions avec l'estimation de l'efficacité d'un anticorps bloquant la transmission, homologue de Pfs25 chez le parasite de la souris, Pbs21. Enfin, un modèle

combinant diverses infections expérimentales et mesures de TBV a été établi afin d'estimer la relation entre intensité de l'infection et efficacité des TBV.

I. Matériel et méthodes

I.1. Expériences avec le système naturel : *P. falciparum* – *An. coluzzii*

Pour déterminer l'impact de la charge gaméocytaire du porteur humain sur le développement sporogonique du parasite, nous avons effectué une dilution du sang infecté suivant différentes étapes résumées en figure 20. Chez un porteur de gaméocytes consentant, un volume d'environ 10 ml de sang veineux a été prélevé dans des tubes héparinés. Après une centrifugation pendant 3 minutes à 3000 r.p.m., le plasma sanguin a été retiré et substitué par le même volume de plasma d'un donneur européen non immun de groupe sanguin AB (Mulder *et al.* 1994). Après avoir été mélangé, le sang a été réparti dans deux tubes différents. Le premier tube de sang a été conservé au bain marie à 37°C (sang infectieux) et le contenu du second tube a été aliquoté dans des tubes de type Eppendorf 1.5 ml puis chauffé à 43°C pendant 15 minutes pour inactiver les gaméocytes sans affecter les propriétés hématologiques du sang qui pourraient avoir un impact sur le moustique (sang inactivé) (Sangare *et al.* 2013). Les gaméocytes ayant subi ce traitement sont incapables de poursuivre l'infection (Mendes *et al.* 2008; Mendes *et al.* 2011). Ce sang inactivé a été utilisé comme solvant pour diluer la densité gaméocytaire du sang infectieux pour obtenir des densités gaméocytaires relatives connues. Ainsi, tous les paramètres hématologiques (taux d'hémoglobine, hématocrite, taux leucocytaire) ont été maintenus constants, excepté la densité de gaméocytes infectieux qui variait suivant les facteurs de dilution. Ces solutions sanguines finales ont été utilisées pour gorger des femelles d'*An. coluzzii* de 3 à 4 jours, maintenues à jeun pendant les 24 heures précédentes. Après une trentaine de minutes de repas sanguin, les moustiques non gorgés ont été retirés et les autres ont été maintenus dans les conditions d'insectarium (28°C ±2, 80% ±05 RH), nourris au glucose 10% jusqu'au jour 7 post-infection pour la dissection et le comptage des oocystes.

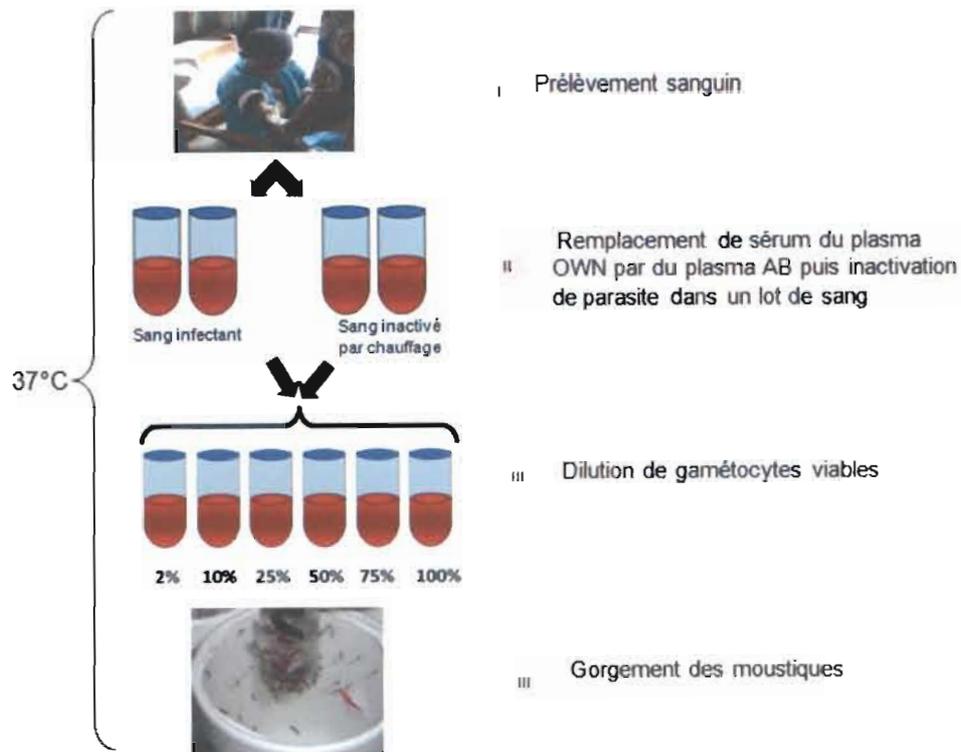


Figure 20: Description schématique d'une infection expérimentale avec dilution de gamétocytes

I.2. Expériences avec le système *P. berghei* – *An. stephensi*

I.2.1. Infection des souris et production des gamétocytes

Ces travaux ont été réalisés à « Imperial College of Londres » et ont utilisé la souche *P. berghei* ANKA 2.34 pour infecter des femelles *An. stephensi* (SDA 500). Les hôtes vertébrés étaient des souris de type Tuck Ordinary « TO » âgées de 4 à 8 semaines (Fig.21). Afin d'optimiser la production de gamétocytes, une hyper-réticulocytose a été provoquée chez les souris en injectant à chacune, un volume de 200µl de phénylhydrazine (PH; 6mg/ml dans du PBS) trois jours avant l'infection (Blagborough & Sinden 2009). Le phénylhydrazine entraîne une hémolyse chez les souris et induit ainsi une production importante de nouvelles hématies dans les jours suivants, une condition favorable pour la gamétocyto-genèse. Trois jours après le traitement au phénylhydrazine, 100 µl de sang parasité par *P. berghei* provenant d'une souris infectée ont été injectés par voie intra-péritonéale à ces souris. Trois jours après cette inoculation, un test d'exflagellation a été effectué pour confirmer l'infection plasmodiale et la maturité des gamétocytes (Blagborough & Sinden 2009). L'opération a consisté à recueillir quelques gouttes de sang de la queue de chaque souris infectée et à les mélanger avec un milieu d'exflagellation. Dix minutes plus tard, la préparation a été observée au microscope à

contraste de phase (x40), et la maturité fonctionnelle des gamétocytes mâles a été confirmée par les mouvements des flagelles des microgamétocytes. Après cette vérification, le sang des souris a été collecté par ponction cardiaque (environ 1,5 ml de sang par souris). Parallèlement, d'autres souris non infectées ont été élevées dans les mêmes conditions nutritionnelles que celles ayant été infectées, dans le but d'utiliser leur sang comme solvant pour la dilution des gamétocytes. Ainsi, le sang de souris non infectées a été d'abord collecté et rassemblé dans un tube contenant de l'héparine, puis le sang des souris infectées (sang infectieux) a été recueilli dans un autre tube, le premier servant à diluer le second

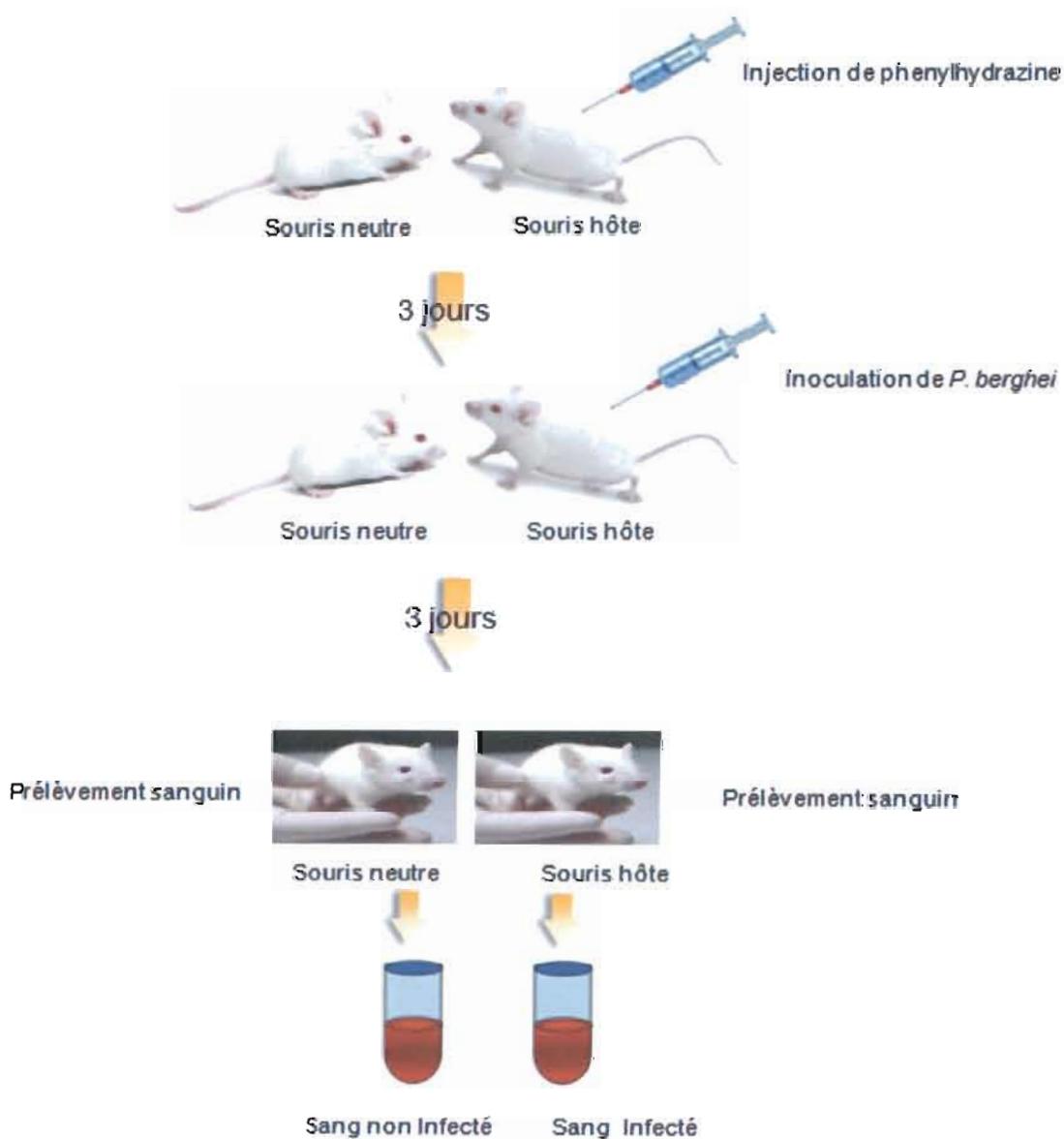


Figure 21: Description schématique de l'infection des souris pour produire les gamétocytes

I.2.2. Infection expérimentale des moustiques

I.2.2. 1. Dilution de la densité de gamétocytes

La dilution visait à étudier deux relations : l'impact de la gamétocytémie sur le développement sporogonique du *P. berghei* et sur l'efficacité d'un anticorps monoclonal 13.1 (Ac.m 13.1) dirigé contre l'antigène Pb21 de *P. berghei* (Tirawanchai *et al.* 1991; Yoshida *et al.* 1999). Ainsi différentes concentrations de gamétocytes ont été utilisées pour infecter des moustiques, en présence ou l'absence de l'anticorps bloquant la transmission. Un anticorps non spécifique à *P. berghei*, UPC10 (Sigma Aldrich) a été utilisé comme contrôle négatif. Sa neutralité sur *P. berghei* avait été précédemment démontrée (Ramjane *et al.* 2007). Ainsi, en plus du rôle de contrôle négatif pour le test d'efficacité de blocage de la transmission par Ac.m 13.1 que jouait ce groupe expérimental, il servait également à mesurer l'impact de la densité de gamétocytes sur le développement sporogonique.

Sur le plan pratique, les fortes densités de gamétocytes produites chez les souris ont été diluées en cascade avec le sang non infecté, afin d'obtenir une série de gamétocytémies de densités relatives connues et précises (les erreurs d'estimation de la densité en gamétocytes ne portant que sur l'échantillon non dilué). Le tableau VI présente les compositions des solutions sanguines préparées pour un volume total de 500µl. Des volumes calculés d'anticorps sur la base de leur concentration initiale ont été d'abord mélangés dans du PBS 1X pour obtenir 100µl dans des tubes Eppendorf sur un thermo-mixer maintenu à 37°C. Les volumes appropriés de sang non infecté de souris ont été ensuite ajoutés aux mélanges précédents. Enfin, nous avons complété les préparations avec les volumes correspondants de sang infectieux. A la fin du processus, 5 aliquotes de sang avec différentes densités gamétocytaires et 25µg/ml d'anticorps ont été obtenus. La densité gamétocytaire de chaque dilution a été déduite de la gamétocytémie initiale mesurée et du facteur de dilution appliqué.

Tableau VI: Récapitulatif de la procédure de dilution de gamétocytes

(Concentration des solutions stocks : Ac.m 13.1 = 25 mg/ml ; UPC10 = 50 mg/ml)

	PBS 1X	Anticorps stock	Sang non infecté	Sang infecté	volume total	% de gamétocytes
	(en μ l)	(en μ l)	(en μ l)	(en μ l)	(en μ l)	(par rapport au sang initial)
13.1	75	25	0	400	500	100%
	75	25	100	300	500	75%
	75	25	200	200	500	50%
	75	25	300	100	500	25%
	75	25	360	40	500	10%
UPC 10	87,5	12,5	0	400	500	100%
	87,5	12,5	100	300	500	75%
	87,5	12,5	200	200	500	50%
	87,5	12,5	300	100	500	25%
	87,5	12,5	360	40	500	10%

1.2.2. 2. Gorgement des moustiques

Les échantillons de sang infectés (préparation décrite dans le tableau VI) ont servi à gorger les femelles *An. stephensi* maintenues à jeun pendant les 24 heures précédentes. Après 30 minutes de repas sanguin, les gobelets de moustiques ont été retirés et maintenus dans des enceintes climatiques à 19-22°C, 50-80 % HR (Humidité relative). Vingt quatre heures plus tard, tous les moustiques ont été immobilisés sur de la glace pour retirer les non-gorgés et les moustiques gorgés ont été replacés dans des enceintes climatiques et nourris au fructose 8 % jusqu'au jour de la dissection.

Ces expériences de dilutions ont montré des résultats inattendus. Pour répondre à de nouvelles questions, des expériences supplémentaires ont été réalisées utilisant *P. berghei* cl507 GFP (Green fluorescent parasite). Cette souche de parasites fluorescents, permet de détecter et de compter les oocinètes sur les estomacs des moustiques 24 heures après le repas sanguin (Ramjane et al. 2007). Pour cette dernière partie, une simple dilution de la densité de gamétocytes (sans anticorps) a été effectuée, et les mêmes souches de moustiques ont été soumises au repas de sang sur les dilutions de gamétocytes.

1.2.2. 3. Dissection des estomacs et comptage des parasites

Onze à treize jours après le repas sanguin, les moustiques ont été disséqués dans du PBS (1X) pour le comptage des oocystes. Pour observer le stade oocinète des parasites fluorescents, les

moustiques ont été disséqués 24 heures après le repas sanguin et les estomacs collectés dans des puits de plaques contenant du PBS 1X. Ces estomacs ont ensuite été immergés pendant 45 minutes dans une solution fixatrice, le para-formaldéhyde 4% (PFA) afin de maintenir les oocinètes sur le tissu du moustique. Après cette phase d'incubation, les estomacs ont été rincés trois fois dans du PBS 1X. Ils ont par la suite été montés entre lame et lamelle, dans une goutte de solution fluorescente «VectaShield Mounting Medium» contenant du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Le montage a été stabilisé avec du vernis à ongles, et les oocinètes ont été compté à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMR au grossissement x63.

II. Résultats

II.1. Système naturel : *P. falciparum* - *An. coluzzii*

I.1.1. Résultats globaux

Notre objectif était d'évaluer l'impact de la densité gamétoctaire sur la transmission homme – moustique pour le système naturel *P. falciparum* - *An. gambiae*. La prospection dans les villages a permis de détecter une gamme variée de densités de gamétoctes dans la population humaine, allant de 8 à 9520 gamétoctes / μ l de sang. Six individus infectés et conformes aux critères d'inclusion, ont été sélectionnés pour les infections expérimentales de moustiques avec dilution de gamétoctes. Au total 1636 femelles d'*An. coluzzii* ont été disséquées 7 jours après l'infection pour la détection et le comptage des oocystes. Le premier fait marquant a été l'aspect très diversifié de l'état d'infection des estomacs, en l'occurrence le fait que certains estomacs étaient très fortement infectés (Fig.22). La densité exceptionnelle de 9520 gamétoctes/ μ l observée chez un patient a généré des infections chez les moustiques par des nombres d'oocystes jusque là non reportés dans la littérature pour *P. falciparum* (Fig. 22B). En exemple sur un des estomacs infectés il a été dénombré environ 4000 oocystes. Par ailleurs, certains moustiques bloquent la formation des oocystes en encapsulant partiellement ou totalement les oocinètes (Fig. 22C, D). Pour l'ensemble des expériences réalisées l'infectivité des moustiques a été évaluée à l'aide de deux indicateurs : la prévalence de moustiques infectés, et l'intensité de l'infection mesurée comme étant le nombre moyen d'oocystes trouvés chez les moustiques exposés. Le tableau VII présente une synthèse de l'ensemble des résultats.

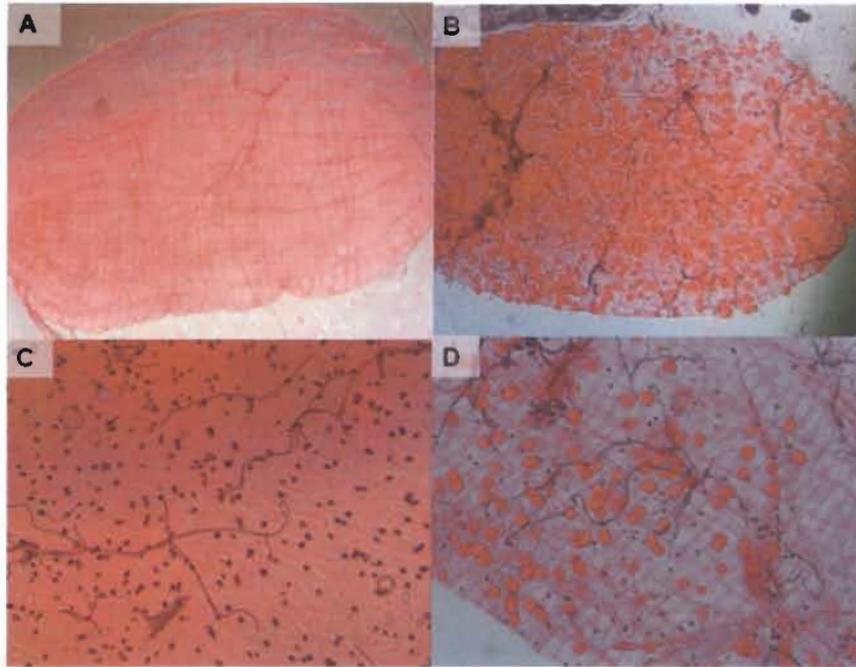


Figure 22 : Photos illustratives de l'état d'infection des estomacs d'*An. coluzzii*.

Une semaine après le gorgement des moustiques sur du sang infecté de personnes, leurs estomacs ont été disséqués pour la detection des oocystes. Ces photos d'estomacs indiquent certains aspects qualitatifs et quantitatifs des oocystes : Les cercles rouges sont des oocystes viables et les points noirs sont les oocinètes melanisés (non viables). Il en resulte plusieurs cas: (A) des estomacs non-infectés, (B) des estomacs hyper-infectés, (C) une totale melanisation des oocystes et (D) une mélanisation partielle.

Tableau VII : Récapitulatifs des infections *P. falciparum* -*An. coluzzii*

	STADE SANGUIN			STADE OOCYSTE	
	Facteur de dilution	DP (/µl de sang)	DG (/µl de sang)	Prévalence (Infectés/Disséqués)	Intensité (moy. d'oocystes ±SEM)
Expérience 1	100%	00	2,400	86,30 (63/73)	227,90±27,5
	50%	00	1,200	86,11 (62/72)	140,30±23,02
	10%	00	240	89,86 (62/69)	21,84±04,23
	1%	00	24	31,51 (23/73)	02,35±00,33
Expérience 2	100%	320	640	80,95 (51/63)	183,30±23,03
	50%	160	320	68,12 (47/69)	42,17±06,10
	10%	32	64	55,77 (29/52)	03,93±00,49
	1%	3,2	6,4	02,04 (01/49)	01,00±00,00
Expérience 3	100%	11,520	9,520	93,33 (43/45)	1235,0±150,3
	75%	8,640	4,144	86,67 (39/45)	859,00±116,2
	50%	5,760	4,760	93,33 (43/45)	670,00±75,60
	25%	2,880	2,384	86,67 (39/45)	183,40±24,02
	10%	1,152	952	82,22 (37/45)	79,73±12,77
	1%	115,2	96	44,44 (20/45)	04,30±00,74
Expérience 4	100%	1,360	600	99,00 (100/101)	292,7±14,25
	50%	680	300	100,00 (50/50)	124,9±08,05
	25%	340	150	94,20 (65/69)	33,46±02,65
	12,5%	170	75	88,33 (53/60)	11,64±01,06
	6,25%	85	37,5	76,67 (46/60)	03,35±00,33
	3,12%	42,5	18,75	34,72 (25/72)	01,32±00,11
Expérience 5	100%	00	120	80,39 (41/51)	18,93±02,23
	50%	00	60	74,55 (41/55)	06,39±00,78
	25%	00	30	57,45 (24/47)	02,93±00,36
	12,5%	00	15	33,33 (18/54)	02,06±00,30
	6,25%	00	8,5	07,41 (04/54)	01,25±00,25
Expérience 6	100%	00	80	88,23 (45/51)	06,52±00,66
	50%	00	40	56,00 (14/25)	03,86±00,71
	25%	00	20	33,33 (12/36)	02,42±00,43
	12,5%	00	10	11,76 (4/34)	01,25±00,25
	6,25%	00	5	03,70 (1/27)	01,00±00,00

DP = Densité parasitaire (stades asexués), DG = Densité de gamétocytes Moy. = moyenne arithmétique, SEM = erreur standard sur la moyenne

I.1.2. L'infectivité de *P. falciparum* chez *An. coluzzii* est positivement corrélée à la densité gamétocytaire chez les humains.

Un modèle linéaire généralisé (GLM) mixte a été effectué afin de mesurer la relation entre la gamétocytemie et infectivité de *P. falciparum* chez *An. coluzzii*, (Churcher *et al.* 2012). Une présentation graphique de la distribution des oocystes a montré une relation positive entre la densité de gamétocytes et l'infectivité (Fig.23A). En conséquence, il apparaît d'une manière générale, une simple relation linéaire entre la gamétocytemie calculée et l'intensité de l'infection (Fig.23B). L'adéquation au modèle linéaire est meilleure quand on analyse par série de dilution (p value $<10^{-8}$). Ceci confirme que comparer l'infectivité issue des

échantillons dilués limite les variations d'infectivité entre isolats de parasites. En termes de prévalence de l'infection, il a été observé une relation en sigmoïde suivant la densité gamétoctaire, pour l'ensemble des expériences (Fig.23C).

En somme, l'infectivité de *P. falciparum* au sein de son vecteur naturel *An. coluzzi* est positivement corrélée à la gamétoctémie observée chez les porteurs humains, aussi bien en termes de prévalence que d'intensité de l'infection.

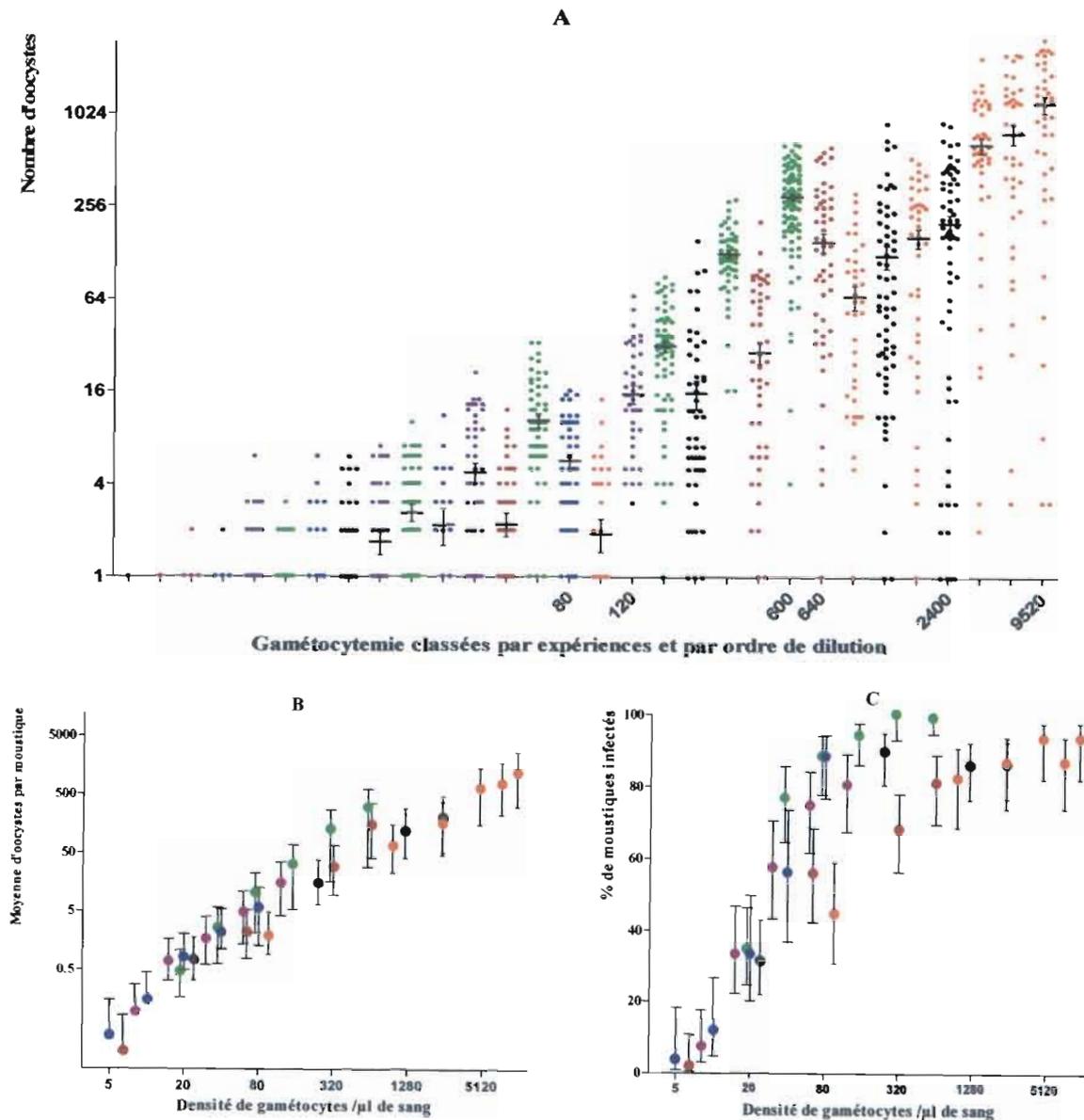


Figure 23 : Relation entre la densité de gamétoctes chez l'homme et leur infectivité chez le moustique. Les points de mêmes couleurs désignent les valeurs du paramètre mesuré pour une même expérience (série de dilutions). (B) et (C) indiquent respectivement la prévalence et de l'intensité de l'infection en fonction de la gamétoctémie. Une échelle logarithmique a été utilisée à cause de l'écart considérable entre les valeurs mesurées : cette échelle ne présentant que seulement les moustiques infectés. Les barres d'erreur associées à chaque point représentent l'intervalle de confiance estimé à 95% (IC95%).

II.2. Système de laboratoire : *P. berghei* - *An. stephensi*

II.2.1 Résultats généraux

Afin d'évaluer l'impact de la densité gamétoctaire sur le développement sporogonique pour ce système de laboratoire, 4 réplicats ont été effectués utilisant chacun un recueil de parasites différent, mais provenant tous de la souche parasitaire (*P. berghei*, ANKA 2.34). Pour chaque réplicat, 5 facteurs de dilution ont été réalisés à partir du sang collecté chez des souris infectées. Les densités gamétoctaires initiales utilisées pour la dilution a été de 689.700 à 1.229.756 gamétoctes / μ l. Un effectif de 783 *An. stephensi* a été disséqué 13 jours après le gorgement pour l'ensemble des expériences réalisées sur ce système. Pour chaque groupe expérimental, l'infectivité des moustiques a été évaluée sur la base des deux indicateurs d'appréciation de l'infectivité : la prévalence et l'intensité de l'infection. Le tableau VIII présente la synthèse de l'ensemble des résultats.

Tableau VIII : Récapitulatif des infections *P. berghei*-*An. stephensi*.

	STADE SANGUIN			STADE OOCYSTE	
	Facteur de dilution	Parasitémie (μ l de sang)	Gamétoctémie (μ l de sang)	Prévalence % (n/N)	Intensité (Moy. d'oocystes \pm SEM)
Expérience 1	100%	3.477.760	689.700	82,35 (14/17)	70,08 \pm 21,30
	75%	2.608.320	509.124	66,67 (08/12)	90,63 \pm 34,07
	50%	1.738.880	345.268	89,29 (25/28)	70,04 \pm 18,48
	25%	869.440	168.872	95,00 (19/20)	196,30 \pm 31,44
	10%	347.776	69.388	100,0 (16/16)	206,10 \pm 41,03
Expérience 2	100%	2.692.756	1.069.244	58,33 (21/36)	33,71 \pm 12,62
	75%	2.019.776	802.560	60,00 (15/25)	17,93 \pm 06,14
	50%	1.346.796	535.040	56,82 (25/44)	16,80 \pm 04,36
	25%	672.980	267.520	71,70 (33/46)	22,00 \pm 04,28
	10%	269.192	102.828	97,14 (34/35)	129,00 \pm 21,69
Expérience 3	100%	2.355.012	1.229.756	09,25 (05/54)	02,00 \pm 00,77
	75%	1.766.468	922.108	10,53 (04/38)	02,75 \pm 01,75
	50%	1.178.760	614.460	42,11 (24/57)	28,57 \pm 08,57
	25%	588.544	307.648	90,00 (54/60)	179,90 \pm 25,65
	10%	235.752	122.892	98,33 (59/60)	159,50 \pm 19,12
Expérience 4	100%	2.705.296	1.110.208	16,13 (05/31)	01,40 \pm 00,24
	50%	1.352.648	55.5104	61,70 (29/47)	23,52 \pm 05,70
	10%	273.372	111.188	10,00 (60/60)	327,60 \pm 24,69
	5%	141.284	55.176	95,00 (38/40)	97,29 \pm 17,12
	2%	54.340	22.572	94,74 (54/57)	56,06 \pm 09,09

n = nombre de moustiques infectés N = nombre de moustiques disséqués ; Moy. = moyenne arithmétique, SEM = erreur standard sur la moyenne

II.2.2. Les fortes infections parasitaires des souris, un obstacle au développement sporogonique de *P. berghei* chez *An. stephensi*

Un modèle linéaire généralisé (GLM) mixte a été effectué afin de mesurer la relation entre la densité de l'infection au stade sanguin et l'infectivité des gamétocytes chez les moustiques (Churcher *et al.* 2012). En rappel, le sang infecté des souris a été dilué avec du sang non infecté dans le processus expérimental.

Nous avons observé une très forte infection des moustiques nourris sur le sang ayant les plus fort facteurs de dilution en termes de prévalence et d'intensité d'oocystes, par rapport aux moustiques gorgés sur le sang infecté non dilué. Considérant les densités gamétocytaires calculées à partir des facteurs de dilutions, l'analyse a révélé une relation négative entre la gamétocytémie et la prévalence de l'infection. Les moustiques sont en quasi-totalité infectés lorsqu'ils sont exposés aux plus faibles gamétocytémies testées ($95 \pm 1.52\%$ entre 27.572 à 125.000 gamétocytes/ μl de sang). La prévalence d'infection décroît au delà des gamétocytémies supérieures à 125.000 gamétocytes/ μl , et atteint presque 0% pour de 1.200.000 gamétocytes/ μl (Fig.24A). Le modèle montre une meilleure adéquation quand on analyse infection par infection (p value $< 10^{-8}$) suggérant donc une variation entre séries de dilutions. L'intensité de l'infection varie en deux phases suivant la densité de gamétocytes : une relation positive de 27.572 à 125.000 gamétocytes/ μl suivie d'une relation négative au-delà de 125.000 gamétocytes/ μl . (Fig.24 B).

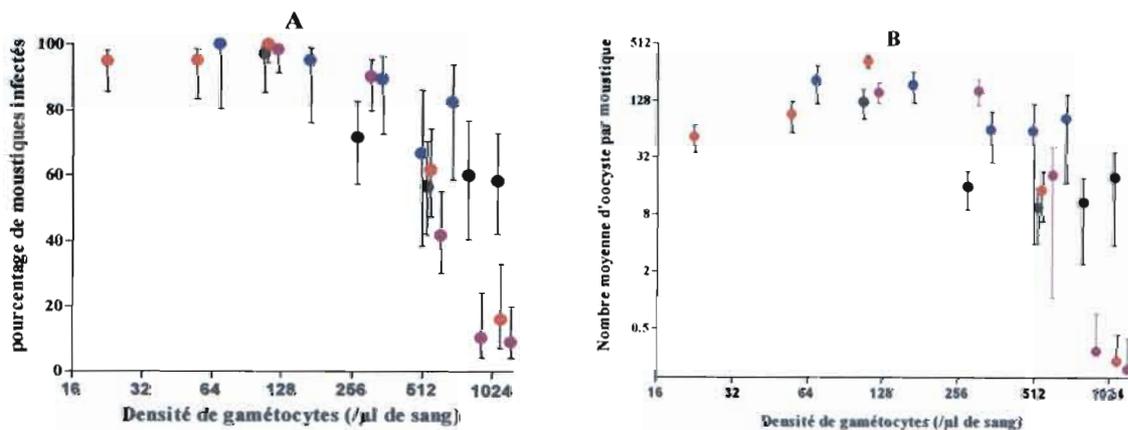


Figure 24: Relation entre la gamétocytémie de *P. berghei* WT chez la souris et l'infectivité chez *An. stephensi*. Dans les 2 graphes, chaque série de points de même couleur représente les valeurs du paramètre calculées pour une même expérience avec différentes gamétocytémies (une série de dilution à partir d'un même sang). (A) indique la prévalence de l'infection i.e. le pourcentage de moustiques infectés (avec l'intervalle de confiance 95%) en fonction de la densité de gamétocytes ; (B) présente l'intensité de l'infection i.e. la moyenne d'oocystes (avec intervalle de confiance à 95%) en fonction de la gamétocytémie.

De l'analyse des indicateurs d'infectivité, deux faits majeurs ont été révélés : Une **relation positive** suivi d'une **relation négative** entre densité de l'infection en gamétocytes au stade sanguin et infectivité chez les moustiques Si la première relation semble logique, la relation négative au delà d'un seuil de densité était inattendue. Elle suggère un effet d'inhibition du développement du parasite. Cette observation a suscité plusieurs interrogations pertinentes : **(i) Quels sont les facteurs responsables de cette inhibition et comment agissent-ils ? (ii) A quel stade du développement parasitaire cette inhibition a-t-elle eu lieu ?**

II.2.3. L'environnement biochimique est la principale cause de l'inhibition

Pour répondre à la question « Quels sont les paramètres responsables de l'inhibition et comment agissent-ils », deux hypothèses ont été formulées.

- La première stipule que l'utilisation du sang non infecté comme solvant modifie la composition biochimique initiale du sang infecté, la rendant favorable au développement sporogonique pour les fortes dilutions.
- La deuxième hypothèse, évoque une obstruction mécanique dans le bol alimentaire chez le moustique due aux fortes charges parasitaires, empêchant la mobilité des microgamètes pour la réalisation de la fécondation.

Afin de tester ces hypothèses, une expérience a été réalisée en effectuant deux dilutions de gamétocytes en parallèle : la première utilisant du sang non infecté comme solvant, et pour la seconde les gamétocytes du même sang infecté ont été inactivés par chauffage à 43°C pendant 15 minutes (Sangare *et al.* 2013). Ces deux types de sang non infectieux ont été utilisés en parallèle comme solvant du sang infectieux. En utilisant le sang chauffé comme diluant, toutes les propriétés biochimiques et hématologiques du sang initial ont été maintenues dans les différentes dilutions, ne laissant varier que la densité des gamétocytes viables. Puis, les moustiques gorgés sur ces différentes dilutions ont été disséqués 13 jours plus tard pour le comptage des oocystes.

Pour les mêmes facteurs de dilution (gamétocytémie égale), l'analyse a révélé une infectivité plus importante dans les groupes de moustiques nourris au sang dilué avec le sang non infecté comparativement à ceux gorgés sur les dilutions effectuées avec du sang infecté chauffé (Fig.25). Cette différence est d'autant plus importante lorsque que les facteurs de dilution sont importants. Ainsi l'infectivité est peu affectée par la dilution pour les moustiques nourris sur le sang dilué par le sang non infecté, ces résultats sont conformes avec les observations

antérieures pour la même fenêtre de gamétoctémies. En revanche, l'infectivité des gamétoctes augmente avec la charge en gamétoctes infectieux (donc est inversement corrélée avec le facteur de dilution) lorsque la dilution est faite avec un sang infecté chauffé (Fig. 25). De ces observations, nous déduisons que l'augmentation de l'infectivité avec la dilution utilisant du sang non infecté est la conséquence de la dilution de toxines dans le sang infecté. En effet le sang non infecté, utilisé pour la dilution, pourrait contribuer à modifier la composition biochimique initiale du sang infecté. Il est fort probable qu'il existait des substances toxiques dans le sang infecté et que ces toxines atteignaient une dose létale pour le parasite. La concentration en toxine serait réduite par la dilution rendant le milieu favorable au développement du parasite. Une autre interprétation possible est que l'ajout du sang non infecté pourrait constituer également un apport de nutriments, plus abondants dans le sang dilué par rapport au sang infecté initial.

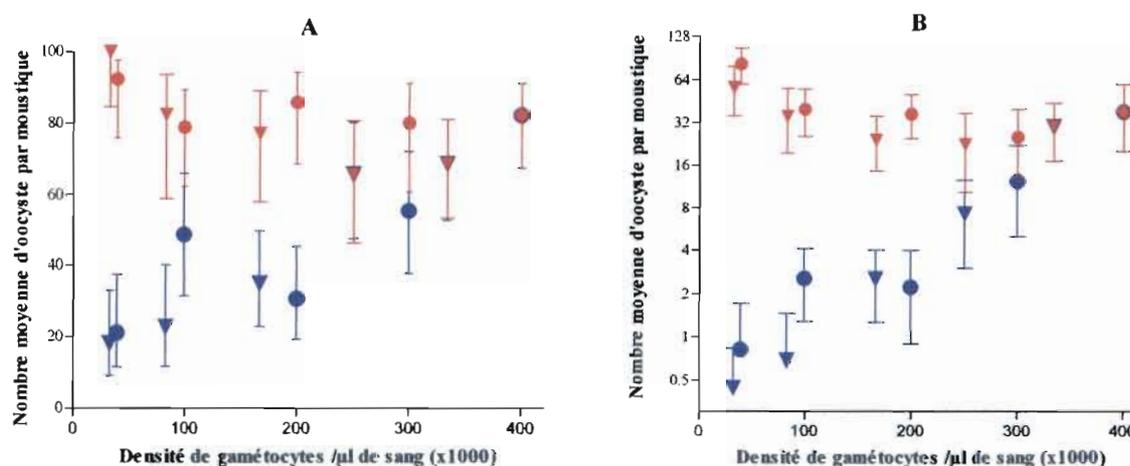


Figure 25 : Relation entre infectivité des gamétoctes dilués utilisant du sang infecté chauffé ou non infecté comme diluant. Du sang collecté de souris infectées par *P. berghei* au stade gamétoctes a été dilué en parallèle aux mêmes facteurs. Des lots de moustiques ont gorgés sur ces deux séries de dilution, et disséqués 7 jours après pour comptage des oocystes. L'infectivité des gamétoctes est présentée en termes de prévalence de l'infection (A) et d'intensité d'oocystes (B) en fonction des gamétoctémies calculées. Chaque symbole (ronds ou triangles) représente un isolat de parasite. Les couleurs représentent le type de sang utilisé pour la dilution : rouge pour les dilutions effectuées avec le sang non infecté et bleu pour les dilutions effectuées avec le sang infecté inactivé par chauffage.

II.2.4. L'inhibition de l'infectivité a lieu en phase précoce de la sporogonie

Pour répondre à la question « à quel stade du développement parasitaire intervient l'inhibition de l'infectivité liée aux fortes gamétoctémies ? », une expérience complémentaire a été réalisée. Des femelles d'*An. stephensi* ont été nourries sur une série de 5 dilutions de sang infecté par les gamétoctes de *P. berghei* GFP (la dilution a été effectuée avec du sang non infecté, conditions dans lesquelles nous avons observé une relation négative entre

gamétocytémie et infectivité). Un premier lot de moustiques a été disséqué 24 heures plus tard pour permettre d'observer les oocinètes, et le second lot 13 jours plus tard pour compter les oocystes. Les relations entre gamétocytémie et intensité de l'infection en oocinètes/oocystes sont présentées sur la figure 26. La relation négative a été une fois de plus, révélée entre la densité en gamétocytes et la formation des d'oocystes ; une relation similaire a été observée pour les oocinètes (Fig.26B). Ainsi, il a été établi pour les mêmes gamétocytémies, une relation positive entre les moyennes d'oocinètes observées après 24 heures et les moyennes d'oocystes formées 13 jours plus tard (Fig.26C). Cette relation positive suggère que l'inhibition du développement du parasite à fortes gamétocytémies a eu lieu avant le stade oocinète.

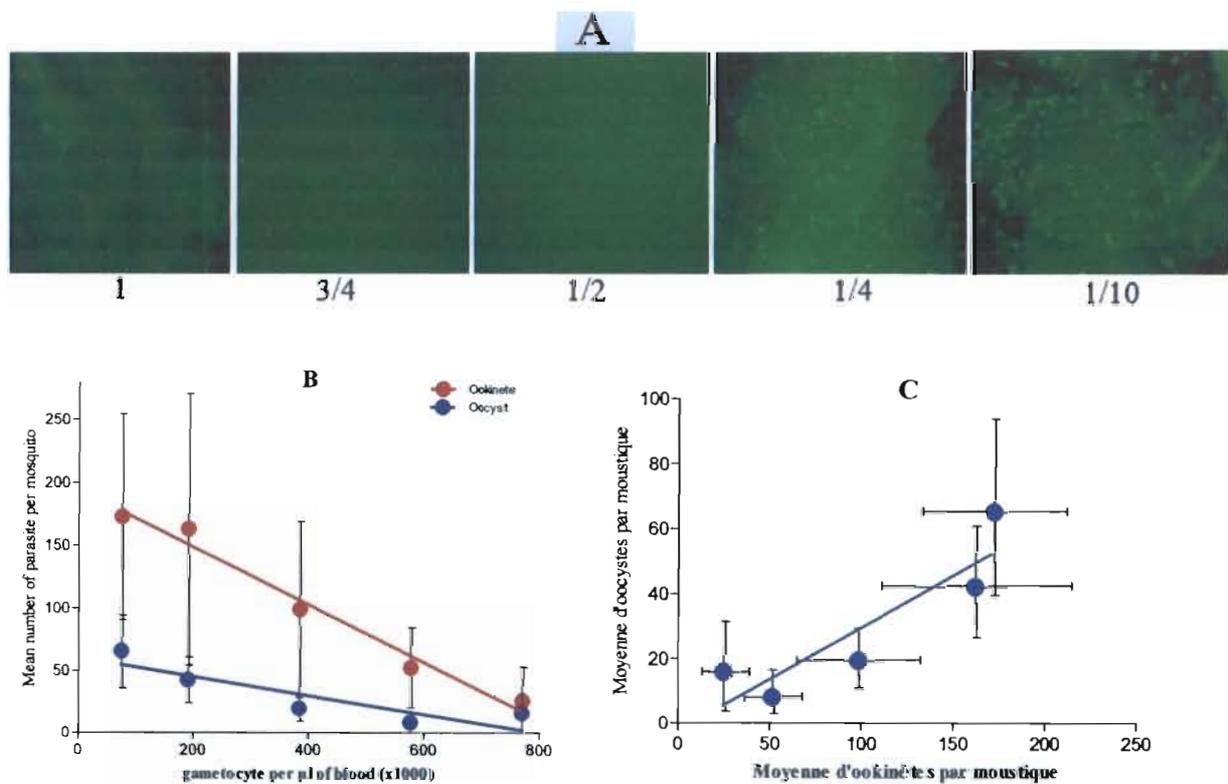


Figure 26: Relation entre densités de gamétocytes de *P. berghei* GFP et leur infectivité chez *An. stephensi*
Des moustiques gorgés sur du sang infecté à différents facteurs de dilution, ont été répartis en deux groupes, puis disséqués à différents stades de développement pour compter les parasites sur les estomacs : oocinète (24 heures après) et oocyste (13 jours après). (A) montre en photo la distribution des oocinètes couramment rencontré dans les groupes de moustiques pour les différents facteurs de dilution. Le graphe (B) indique l'intensité de l'infection en fonction de la gamétocytémie. (C) présente l'intensité des oocystes observés en fonction de l'intensité des oocinètes comptés.

Nos résultats montrent donc que lors d'une infection de *P. berghei* de la souris au moustique, une inhibition de la sporogonie a lieu à fortes charges parasitaires. Cette inhibition intervient au stade précoce de la sporogonie et est liée à un environnement hostile dans le bol alimentaire du moustique.

II.2.5 L'efficacité de l'anticorps 13.1 dépend de l'infectivité des parasites

P. berghei est largement utilisé pour évaluer les candidats TBV en conditions de laboratoire et nous avons cherché à évaluer l'effet de la gamétocytémie chez la souris pour ce parasite sur l'infectivité chez le moustique et sur l'efficacité de candidats TBV. Nous avons mis en évidence ici un effet négatif des fortes charges parasitaires sur le développement sporogonique, qui n'a par contre pas été observé dans le système naturel utilisant *P. falciparum*. Nous avons évalué l'effet d'un candidat TBV en concentration constante de 25µg/ml sur l'ensemble des dilutions effectuées avec le sang non infecté. Cet anticorps est spécifique de l'antigène Pbs21 de *P. berghei* (orthologue de Pfs25 chez *P. falciparum*) s'exprimant au stade oocinète (Ranawaka *et al.* 1994b). Son efficacité déjà connue, permet de mesurer l'effet de la densité de gamétocytes sur son efficacité.

Pour l'ensemble des expériences, la distribution du nombre d'oocystes comparée par groupe test (13.1) et groupe contrôle (UPC10) a montré une réduction significative du niveau d'infection en présence de l'anticorps pour presque tous les réplicats (Fig.27). L'efficacité de l'anticorps 13.1 a été évaluée en termes d'activité bloquant la transmission sur la prévalence (TBA) et d'activité réduisant l'intensité de la transmission (TRA). Le tableau IX récapitule les détails sur l'ensemble des données obtenues ainsi que les analyses statistiques.

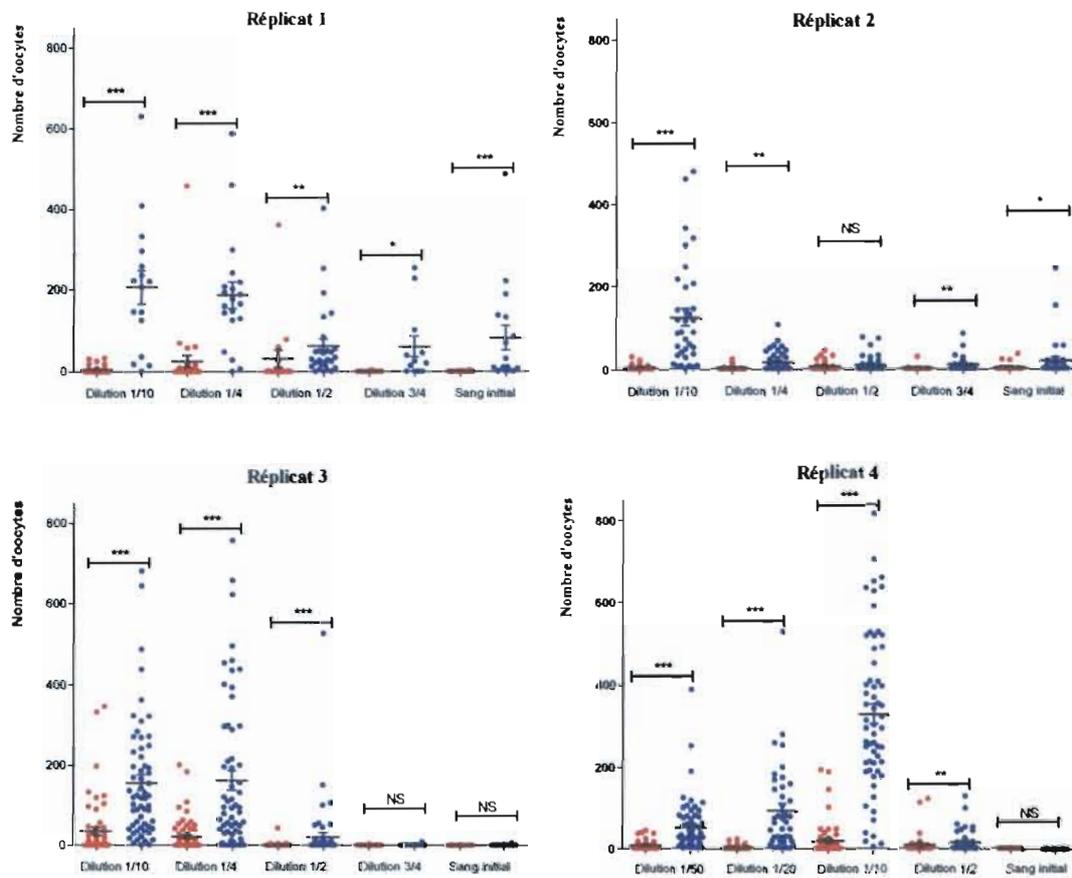


Figure 27: Distribution des oocystes par séries de dilutions chez des *An. stephensi* exposés à *P. berghei* en présence ou non d'anticorps bloquant la transmission
 Les points représentent le nombre d'oocystes comptés sur les estomacs de moustiques gorgés sur sang infecté : avec l'anticorps monoclonal 13.1 en rouge et avec l'anticorps contrôle en bleu. * signifie une différence significative entre lot test et contrôle par le test de Mann-Whitney ($p < 0.05$), NS = différence non significative.

Tableau IX: Synthèse des expériences pour mesurer l'efficacité des anticorps monoclonaux 13.1

	FD	DP (/μl)	DG (/μl)	Prévalence % (infectés / disséqués)		TBA en %	P	Intensité (moyenne d'oocystes ± IC 95%)		TRA en %	P
				13.1	UPC10			13.1	UPC10		
Expérience 1	100%	3 477 760	689 700	21.43 (3/14)	82.35 (14/17)	74.00	<i>0.00244</i>	0,5±00.31	82.24 ±30.73	99.39	<i>0.0001</i>
	75%	2 608 320	509 124	12.50 (1/8)	66.67 (08/12)	81.20	<i>0.05402</i>	0.5±00.50	60.42±25.66	98.93	<i>0.0127</i>
	50%	1 738 880	345 268	52.94 (9/17)	89.29 (25/28)	47.30	<i>0.01672</i>	31.88±21.28	62.54±16.98	82.22	<i>0.0035</i>
	25%	869 440	168 872	70.97 (22/31)	95.00 (19/20)	25.30	<i>0.08024</i>	25.52±14.78	186.5±31.40	94.05	<i>< 0.0001</i>
	10%	347 776	69 388	56.67 (17/30)	100.0 (16/16)	43.30	<i>0.005692</i>	5.83±01.74	206.06 ±41.03	97.17	<i>< 0.0001</i>
Expérience 2	100%	2 692 756	1 069 244	22.73 (5/22)	58.33 (21/36)	61.04	<i>0.01761</i>	3.86±02.06	19.67±07.81	80.38	<i>0.0139</i>
	75%	2 019 776	802 560	18.75 (3/16)	60.00 (15/25)	68.80	<i>0.02299</i>	2.06±01.81	10.76±04.05	80.86	<i>0.0095</i>
	50%	1 346 796	535 040	35.29 (12/34)	56.82 (25/44)	37.90	<i>0.09709</i>	5.97±02.00	9.55±02.77	37.49	<i>0.1216</i>
	25%	672 980	267 520	50.00 (11/22)	71.70 (33/46)	30.30	<i>0.1379</i>	3±01.32	15.78±03.40	80.99	<i>0.0056</i>
	10%	269 192	102 828	51.43 (18/35)	97.14 (34/35)	47.10	<i><0.0001</i>	3.8±01.12	125.29±21.38	96.97	<i>< 0.0001</i>
Expérience 3	100%	2 355 012	1 229 756	02.07 (1/37)	09.25 (05/54)	70.81	<i>0.4191</i>	0.03±00.03	0.19±00.10	84.21	<i>0.215</i>
	75%	1 766 468	922 108	05.77 (3/52)	10.53 (04/38)	45.20	<i>0.6644</i>	0.1±00.06	0.29±00.21	65.52	<i>0.4132</i>
	50%	1 178 760	614 460	15.00 (9/60)	42.11 (24/57)	64.40	<i>0.00228</i>	1.12±00.74	20.77±09.84	73.93	<i>0.0005</i>
	25%	588 544	307 648	55.00 (33/60)	90.00 (54/60)	38.90	<i><0.0001</i>	21.4±05.32	161.9±24.11	86.78	<i>< 0.0001</i>
	10%	235 752	122 892	60.00 (33/55)	98.33 (59/60)	39.00	<i><0.0001</i>	35.62±09.91	156.8±18.99	77.28	<i>< 0.0001</i>
Expérience 4	100%	2 705 296	1 110 208	03.13 (1/32)	16.13 (5/31)	80.63	<i>0.184</i>	0.03±0.003	0.23 ±00.10	86.96	<i>0.0792</i>
	50%	1 352 648	555 104	27.50 (11/40)	61.70 (29/47)	55.43	<i>0.00293</i>	8.3±04.18	14.51±03.88	42.80	<i>0.0034</i>
	10%	273 372	111 188	76.67 (46/60)	100 (60/60)	23.33	<i><0.0001</i>	18.62±5.18	327.6±24.69	94.32	<i>0.0001</i>
	5%	141 284	55 176	38.46 (20/52)	95.00 (38/40)	59.51	<i><0.0001</i>	2.33±00.65	92.43±16.61	97.48	<i>0.0001</i>
	2%	54 340	22 572	47.73 (21/44)	94,74 (54/57)	49.62	<i><0.0001</i>	7.48±01.77	53.11±08.78	85.92	<i>0.0001</i>

FD: facteur de dilution; DP: densité parasitaire par microlitre de sang ; DP: densité gamétocytaire par microlitre de sang ; TBA = Activité bloquant la transmission, TRA = activité réduisant la transmission.

L'efficacité de l'anticorps en termes d'activité réduisant la transmission (TRA), a été de 86.67% IC95% [83%-89%] en moyenne et varie très peu en fonction de la densité gamétocytaire ($p=0.6263$) (Fig. 28A). En revanche, l'efficacité en termes d'activité bloquant la transmission (TBA) sur la prévalence présente une relation avec les densités gamétocytaires issues des dilutions: pour les plus faibles gamétocytemies (entre 27.572 et 125.000 gamétocytes / μL de sang), la TBA montre une relation négative avec la gamétocytemie (Fig.28B) ; ce même intervalle de gamétocytemie correspond à celle où l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle a été positivement corrélée à la densité de gamétocytes. Au-delà des 125.000 gamétocytes/ μL , une relation positive a été observée entre efficacité TBA et gamétocytemie (Figure 28B) et coïncide avec une relation négative entre gamétocytemie et intensité de l'infection dans le groupe contrôle. De ces observations, il apparait donc que le l'efficacité TBA est négativement corrélée à l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle (Fig. 28C). En d'autres termes, plus les moustiques sont infectés par un grand nombre de parasites, moins les anticorps sont efficaces pour réduire la proportion de moustiques infectés.

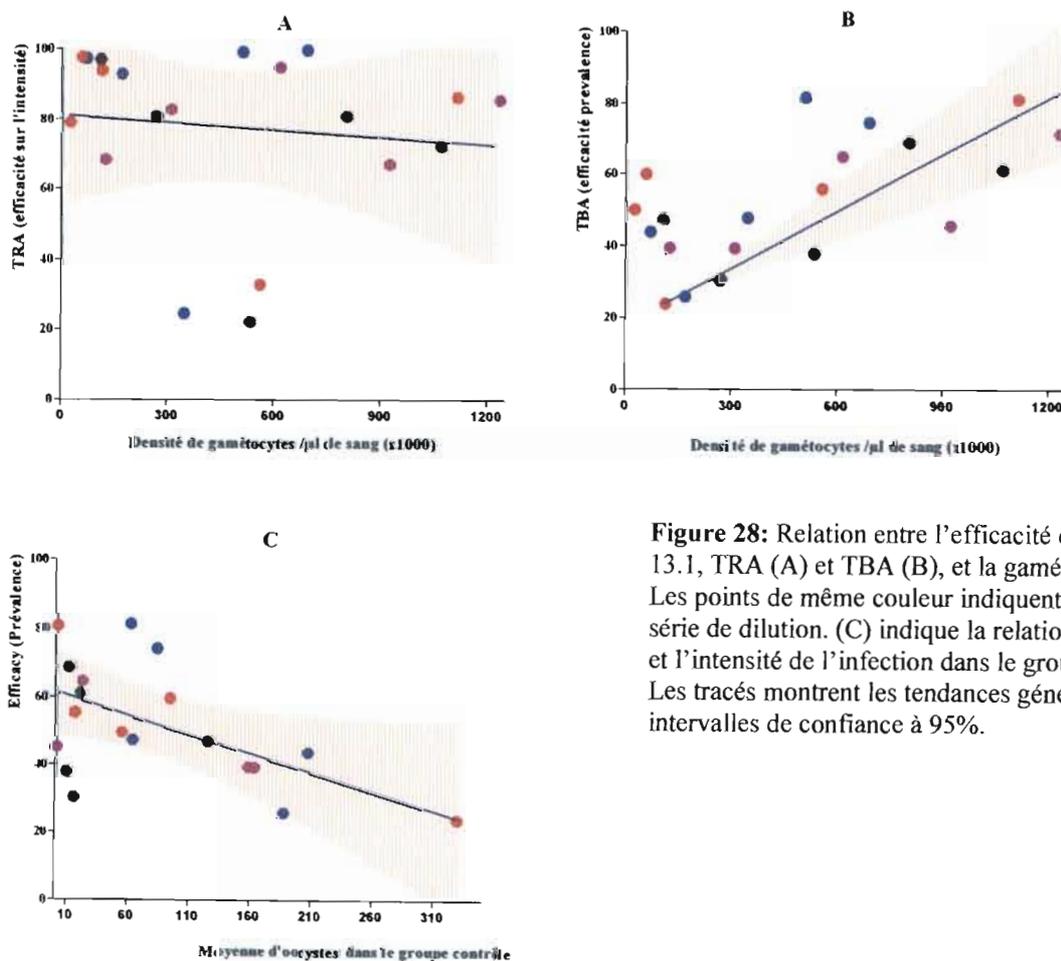


Figure 28: Relation entre l'efficacité de l'anticorps 13.1, TRA (A) et TBA (B), et la gamétocytemie. Les points de même couleur indiquent une même série de dilution. (C) indique la relation entre TBA et l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle. Les tracés montrent les tendances générales avec les intervalles de confiance à 95%.

II.3. Relations intensité - prévalence - efficacité des TBV

Nos travaux ont mis en évidence à plusieurs reprises et dans des systèmes différents, une relation négative entre efficacité du TBV (TBA : efficacité pour bloquer la transmission) et intensité de l'infection dans le groupe contrôle de moustiques. En contraste, la TRA (l'activité réduisant la transmission, c'est-à-dire la diminution du nombre d'oocystes dans les estomacs de moustiques) restait constante pour chaque anticorps testé. Ceci met en lumière qu'un candidat TBV va montrer une TRA constante, mais une TBA qui varie selon l'intensité de l'infection et donc de la dose infectante (densité de gamétocytes dans le sang ingéré). Pour savoir comment interpréter ces résultats, il nous a paru nécessaire d'étudier la relation entre intensité de l'infection (nombre moyen d'oocystes dans les groupes contrôles de moustiques) et prévalence de l'infection (proportion de moustiques infectés parmi les mêmes moustiques). Dans ce but, nos données ont été combinées puis analysées avec d'autres résultats issus d'infections expérimentales. Un modèle définissant les relations entre intensité et prévalence d'une part et d'autre part l'implication de cette relation dans l'évaluation des stratégies de blocage de la transmission a été effectué par Thomas Churcher de "Imperial College London" (Fig. 29). Cette analyse intègre à la fois les données des groupes expérimentaux tests et contrôles, aussi bien du système *P. falciparum*-*An. coluzzii* (ou *P. falciparum*-*An. gambiae*) que du système *P. berghei*-*An. stephensi* (Fig. 29A). Bien que les données proviennent de plusieurs laboratoires différents, il est intéressant de noter que la relation prévalence/intensité semble relativement constante entre les deux systèmes vectoriels. Le meilleur ajustement révèle un modèle en sigmoïde : au delà d'une certaine valeur de l'intensité, la prévalence de l'infection atteint un plateau et demeure constante. Ainsi, ce modèle permet de prédire la prévalence à partir d'une l'intensité observée dans une population de moustiques infectés (exposés au même sang infecté). Aussi, ce modèle peut être utilisé pour déduire la réduction de la prévalence attendue (TBA) pour une réduction intensité (TRA) observée dans des expériences où l'intensité de l'infection varie de 1 à 100 oocystes (Fig. 29B). En effet, dans une population de moustiques infectés à 100 oocystes en moyenne dans le groupe contrôle, on peut s'attendre à une diminution de moins 10% sur la prévalence lorsqu'une intervention réduit l'intensité d'environ 90%. Par contre, pour la même intervention effectuée dans une autre population de moustiques infectés par 5 oocystes en moyenne, on obtiendra une diminution de la prévalence de plus de 50% lorsque cette intervention réduit l'intensité de 90%. De cette logique, bien que le blocage de la prévalence (TBA) soit l'objectif visé dans le concept de TBV, l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle et le TRA qui en résulte,

sont plus informatives pour mesurer l'efficacité des candidats TBV. Cette analyse réalisée dans le cadre d'une collaboration, a été publiée dans "International Journal for Parasitology" (annexe 5).

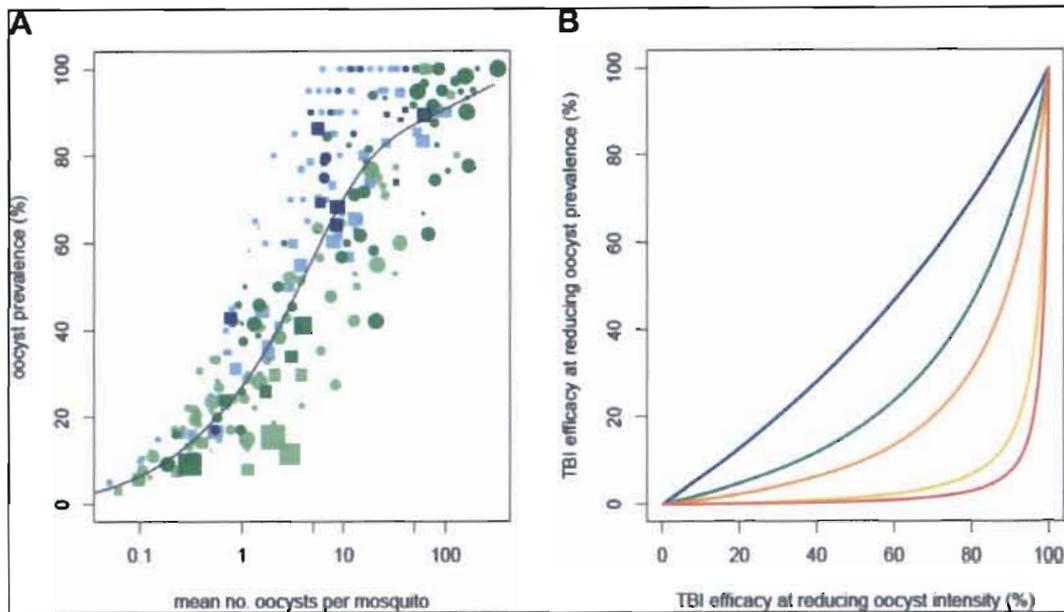


Figure 29 : Relation intensité-prévalence (Churcher *et al.* 2012), estimée à partir de 277 expériences d'infections expérimentales de moustiques par des *Plasmodium* ou SMFA. La couleur des points représente l'espèce parasitaire utilisée (bleu pour *P. falciparum*, vert pour *P. berghei*). La nuance sombre indique les groupes contrôles tandis que la teinte plus claire indique les expériences avec intervention. La forme du point désigne les espèces de vecteurs utilisés, (carré pour *An. coluzzii* ou *An. gambiae*, cercle pour *A. stephensi*). La ligne noire indique le meilleur modèle d'ajustement. (B) Les relations attendues entre l'efficacité contre la prévalence et l'intensité des oocystes lors de l'utilisation des expositions différentes de parasites selon le modèle présenté dans le panneau (A). Les couleurs des lignes indiquent l'intensité moyenne des oocystes dans le groupe de contrôle : 1 (bleu), 5 (vert), 10 (orange), 50 (jaune) ou 100 (rouge).

III. Discussion

III. 1 La technique de dilution de gamétocytes, une innovation en matière d'infections expérimentales

- *Elle permet d'établir la relation gamétocytémie/infectivité avec plus de précision*

Nous avons artificiellement créé une série de gamétocytémies par la technique de dilution. Cette démarche nous a permis de restreindre toutes autres variables afin d'établir avec plus d'acuité la relation entre les densités de gamétocytes et l'infectivité. Pour le système *P. falciparum*–*An. coluzzii*, nous avons observé une relation linéaire positive entre l'intensité de l'infection au sein des moustiques et la série de gamétocytémies artificielles créées par la dilution. Les données s'ajustent mieux au modèle lorsque l'analyse est effectuée par série de dilution. De même, la prévalence de l'infection est positivement corrélée à la densité de l'infection avant d'atteindre un plateau, lequel plateau varie en fonction des isolats de parasites utilisés. Ces observations suggèrent le rôle de facteurs non mesurés ici qui induiraient de la variabilité dans l'infectivité entre séries de dilution. Les différences en infectivité, bien que assez limitées, entre série de dilution peuvent être dues à plusieurs caractéristiques intrinsèques spécifiques aux gamétocytes, comme le sex-ratio, la maturité ou les infections multiclones, mais également aux imprécisions lors de l'évaluation de la densité de gamétocytes. Ces facteurs ont été à l'origine des limitations révélées dans l'élaboration de la relation gamétocytémie-infectivité dans des études antérieures (Ponnudurai *et al.* 1989; Mulder *et al.* 1994; Robert *et al.* 1998; Drakeley *et al.* 1999; Gouagna *et al.* 1999; Boudin *et al.* 2004). Dans notre contexte, la technique de dilution de souches parasitaires a permis de réduire considérablement ces variabilités incontrôlées et de produire, à notre connaissance, des données plus précises pour mesurer l'effet de la densité des gamétocytes sur l'infectivité des moustiques pour le système naturel *P. falciparum*-*An. coluzzii*. Il a été démontré dans des études antérieures la nécessité de prédire l'impact de facteurs humains (Churcher *et al.* 2013) et des densités gamétocytaires (Churcher *et al.* 2010) dans l'évaluation des stratégies de blocage de la transmission du paludisme. La méthode de dilution développée dans notre étude apparaît comme une méthode innovante permettant d'inclure la gamétocytémie comme variable contrôlée dans l'évaluation de candidats TBV.

- *Une méthode pour améliorer l'infectivité de *P. berghei**

Le système *P. berghei*–*An. stephensi*, est largement utilisé comme modèle dans l'évaluation des stratégies de blocage de la transmission du paludisme. Dans cette étude, nous avons voulu mesurer l'effet de la densité de gamétocytes sur le succès de l'infection afin de déterminer l'impact de l'infectivité des moustiques sur l'efficacité des candidats TBV. Nous avons montré que la dilution des gamétocytes à l'aide du sang frais (non infecté) améliore significativement l'infectivité des moustiques par rapport à la dilution de gamétocytes par du sang infecté inactivé par chauffage. Nos résultats corroborent les conclusions d'autres études où il avait été observé *in vitro* une augmentation de la production des oocinètes avec la dilution des gamétocytes (Janse *et al.* 1985; Sinden *et al.* 1985b). Ensemble, ces observations démontrent que les fortes infections parasitaires génèrent un environnement biochimique hostile à la sporogonie du parasite. En effet le métabolisme de la charge parasitaire dans le bol alimentaire pourrait générer des substances qui, à fortes doses inhibent le développement sporogonique. Toutefois, en diluant le sang infecté par du sang non infecté, les doses létales des substances sont également diluées rendant le milieu favorable à la sporogonie. La technique de la dilution apparaît efficace pour accroître significativement le succès de l'infection pour ce système de laboratoire. De plus, cette technique nous a aussi permis de minimiser l'effet d'inhibition comme facteur interférant dans la caractérisation de la relation densité de gamétocytes dans le sang et le l'infectivité des moustiques.

Dans les conditions favorables artificiellement créées, nous avons, à l'instar du système naturel, caractérisé avec plus de précision la relation entre la gamétocytemie de l'hôte et la sporogonie chez le moustique. La corrélation positive révélée entre infectivité et densité de gamétocytes dans l'échelle de 22.500 à 125.000 gamétocytes / μ l nous oriente vers les conditions optimales de croissance du parasite. Ces observations sont en effet conformes aux travaux de Sinden réalisés en 2007 sur ce même système (Sinden *et al.* 2007a). Il convient toutefois de noter que la densité de 125.000 gamétocytes/ μ l grossièrement estimée comme gamétocytemie optimale de l'infection dans nos travaux ne peut pas être généralisée. En effet, cette valeur est susceptible de varier en raison des incertitudes liées à la microscopie, du type de souris utilisées, des souches de parasites et certaines conditions différentes d'un laboratoire à l'autre.

Dans les conditions de nos expérimentations, nous avons montré que l'inhibition de la sporogonie engendrée par les fortes charges parasitaires au delà de 125.000 gamétocytes / μ l, interviennent au stade précoce de la sporogonie (avant le stade oocinète) en bloquant probablement la fécondation ou en inhibant la transformant du zygote en oocinète.

Récemment, les travaux de Pollitt et collaborateurs ont aussi mis en évidence une corrélation négative entre les fortes densités d'oocystes et la quantité de sporozoïtes pour ce même système (Pollitt *et al.* 2013). Fort de ces observations, il convient de dire que les fortes charges parasitaires, à plusieurs stades de la sporogonie, pourraient compromettre le succès des infections à *P. berghei*. De plus ; il convient de s'interroger sur la conséquence de cet effet inhibiteur sur les mesures d'efficacité de molécules anti-*Plasmodium* testées dans ces mêmes conditions.

III.2. L'inhibition, facteur de confusion avec l'efficacité des TBV

Afin de répondre à la question : « la variation d'infectivité (prévalence et intensité) peut-elle influencer l'efficacité des candidats TBV ? », l'activité de l'anticorps monoclonal 13.1 a été testée pour différentes dilutions de gamétocytes. Nos résultats ont révélé que la formation des oocystes est négativement corrélée à la gamétocytémie au delà de 125.000 gamétocytes/ μ l. Aussi, nous avons observé une l'efficacité de l'anticorps positivement corrélée à la gamétocytémie au-delà de 125.000 gamétocytes / μ l. Les conditions expérimentales sont à priori telles que, l'inhibition de la sporogonie liée à un environnement toxique à forte gamétocytémie et l'action des anticorps ont lieu en même temps sur les parasites. Bien que les anticorps agissent au stade ookinete, et l'inhibition avant ce stade, un éventuel effet d'association (effet additif, antagoniste ou synergique) n'est pas à exclure. Par exemple, les candidats vaccins agissant aux stades précoces de la sporogonie (avant le stade oocinète, en occurrence les candidats Pfs230 et Pfs48/45 chez *P. falciparum*) seraient particulièrement susceptibles d'avoir des interactions avec l'inhibition de l'infection liée aux fortes densités de gamétocytes), en occurrence les candidats Pfs230 et Pfs48/45 chez *P. falciparum*. Pour ces TBV, l'effet combiné inhibition- action du TBV pourrait fortement affecter l'interprétation des résultats et conduire à une mauvaise évaluation de ces candidats vaccins, s'ils sont testés avec *P. berghei* et en conditions de fortes parasitémies. Ainsi, dans le cas d'effet additif, antagoniste ou synergique, l'efficacité du candidat vaccin sera sur ou sous-estimée pour sa capacité à bloquer la transmission. Il est donc préférable pour les utilisateurs de ce système vectoriel, d'évaluer l'efficacité des candidats TBV dans des conditions expérimentales favorables à la croissance du parasite afin de garantir la fiabilité des résultats. Ces conditions expérimentales favorables s'obtiennent particulièrement en diluant le sang infecté par le sang

non infecté pour réduire les interférences liées à d'autres facteurs, ou en utilisant des souris de faibles charges parasitaires.

III.3. L'intensité de l'infection, un paramètre important pour évaluer les TBV

Nous avons démontré que les fortes charges parasitaires dans le sang pouvaient dans certaines mesures produire un effet d'inhibition pour le système *P. berghei-An. stephensi*. Ceci pourrait constituer une source d'erreur dans l'évaluation des candidats TBV. De plus, à cause de l'incertitude dans l'estimation des densités gamétocytaires et d'autres paramètres intrinsèques des gamétocytes, la gamétocytémie issue de plusieurs individus apparaît peu convenable pour élaborer une relation précise entre le niveau d'infection et l'efficacité des candidats TBV. Toutefois l'intensité de l'infection au sein des moustiques du groupe contrôle apparaît comme la variable la mieux indiquée pour mesurer l'impact du niveau d'infection sur l'efficacité des candidats TBV. En effet, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre le TBA de l'anticorps et l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle de moustiques.

Ceci met en évidence que le niveau de l'infection a une forte répercussion sur l'efficacité des TBV (Churcher *et al.* 2012). Une meilleure alternative est donc de tester les candidats vaccins sur une large gamme de gamétocytémies appropriées avec une attention particulière sur les intensités obtenues dans les groupes contrôles. De telles démarches offrent l'opportunité d'apprécier l'efficacité d'une molécule en se référant aux conditions expérimentales pour lesquelles le contrôle fournit plus de succès en termes d'infectivité. Aussi, elle pourrait permettre la comparaison des résultats de plusieurs études, voir de plusieurs laboratoires travaillant sur le même sujet (Sinden *et al.* 2012b).

En accordant une importance particulière au niveau de l'infection, nous avons participé à la conception d'un modèle mathématique permettant de prédire la prévalence de l'infection à partir d'une intensité observé (Churcher *et al.* 2012). Ce modèle applicable aux deux systèmes étudiés (parasite humain et murin) permet de comprendre l'impact d'une diminution du nombre d'oocystes sur la diminution de la prévalence d'infection chez les moustiques. Ainsi, la réduction de l'intensité, constante pour un anticorps à une concentration donnée quelle que soit l'intensité de l'infection, est plus informative que la diminution de la prévalence qui varie selon l'intensité de l'infection, même si c'est cette dernière qui importe dans le blocage de la transmission du paludisme sur le terrain. En conclusion, bien que la TBA soit le paramètre qui révélera l'efficacité d'un candidat TBV dans une condition donnée, la TRA est le paramètre qui donne une idée de l'efficacité du candidat TBV quelle que soit l'intensité de la

transmission. La TRA permettra donc une comparaison de candidats, même si ils ont été testés dans des conditions différentes. A partir de la TRA, les modèles développés permettront de prédire la TBA pour une intensité d'infection donnée et donc d'évaluer l'intérêt effectif du candidat dans un contexte donné de transmission.

Conclusion 2

Au terme de cette partie, nous avons révélé un certains nombre d'informations sur les relations entre la densité en gamétocytes, le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des candidats TBV. L'intensité de l'infection au sein des moustiques, plutôt que la gamétocytemie, a été perçue comme la variable explicative la plus importante affectant l'efficacité des candidats TBV sur la réduction de la prévalence d'infection (TBA). La réduction de l'intensité de l'infection par les candidats TBV (TRA) est constante quelle que soit l'intensité de l'infection, alors que la TBA est négativement corrélée avec l'intensité de l'infection. Les candidats TBV doivent donc être caractérisés par leur TRA pour pouvoir être comparés. Ce chapitre met donc en évidence l'importance cruciale de l'intensité de l'infection dans l'efficacité des candidats TBV. Cependant, il faut noter que l'on sait très peu de choses quant à l'intensité de l'infection chez les moustiques naturellement infectés. Connaître ce niveau d'infection sera pourtant essentiel pour prédire l'efficacité des interventions de blocage de la transmission. Nous abordons cette question dans le chapitre 5.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article (Churcher *et al.* 2012) publié dans le journal "International Journal of Parasitology" et un second article en préparation (annexe 5).

Chapitre 5:

*Niveau de transmission naturelle homme-
moustique : conséquences sur l'évaluation des
TBV*

Chapitre 5 : Niveau de transmission naturelle homme-moustique : conséquences sur l'évaluation des TBV

Introduction

Dans nos deux chapitres précédents, nous avons mis en évidence l'intérêt de considérer l'intensité de l'infection lors de l'évaluation de candidats TBV : il a été démontré à l'aide un modèle mathématique, que l'efficacité des candidats TBV est dépendante de l'intensité d'oocystes au sein des moustiques du groupe contrôle. En conditions naturelles, la transmission de *Plasmodium* de l'homme au moustique est assurée par des niveaux variables de densité gamétoctaires au sein des personnes infectées. Ces densités variables de gamétoctes sont à l'origine d'une diversité de l'intensité d'infection en termes de nombre d'oocystes au sein de la population sauvage de vecteurs de paludisme. De plus ce niveau d'infection des vecteurs subit également une forte variation en fonction du temps et de l'espace (Medley *et al.* 1993; Anthony *et al.* 2000) qu'il convient de prendre en compte. Très peu de données traitant du niveau d'infection à *Plasmodium* des anophèles sur le terrain sont disponibles à nos jours. Cela constitue une limite pour éventuellement prédire l'efficacité des TBV en conditions naturelles.

Un autre paramètre majeur influençant la transmission en conditions naturelles et susceptible d'interférer avec l'efficacité des TBV est l'immunité naturelle des hôtes. De nombreuses études ont montré qu'en zone d'endémie palustre, les individus développent une immunité naturelle qui exerce une forte pression sur la transmission du parasite chez le moustique (Gouagna *et al.* 2004; Bousema *et al.* 2011a). Cette immunité varie entre autre en fonction de la fréquence d'infection palustre dans la population, l'âge des individus, les zones géographiques (Bousema *et al.* 2012b). Dans notre premier chapitre nous avons évalué l'efficacité des candidats vaccins dans des conditions expérimentales où les anticorps agissent en absence de l'immunité des porteurs humains. Toutefois, en conditions naturelles les anticorps issus des TBV chez l'homme devront agir sur les parasites chez le moustique en même temps que l'immunité naturelle des porteurs. Dans un tel un environnement, où se combineront immunité naturelle et immunité induite, il pourrait se produire des interactions (antagonisme, synergie ou addition) qu'il convient de définir.

Dans cette partie nous avons abordé l'impact de l'immunité naturelle bloquant la transmission de notre population d'étude afin de déterminer les interactions qui en résultent avec l'action des TBV. Dans un second volet nous avons estimé le niveau de transmission homme-moustique sur le terrain afin de pouvoir extrapoler l'efficacité des candidats vaccins en conditions naturelles.

I. Matériel et Méthodes

I.1. Evaluation de l'immunité naturelle bloquant la transmission

Pour tester l'effet de l'immunité naturelle bloquant la transmission, des moustiques ont été infectés en conditions expérimentales en présence et en absence des facteurs sériques des personnes infectées. Pour cela, les moustiques ont été nourris avec du sang directement prélevé du porteur d'une part, et d'autre part avec du sang dont le plasma a été remplacé par le sérum AB naïf à l'infection palustre (Gouagna *et al.* 2004). Dans la démarche expérimentale, environ 10 ml de sang de porteur de gamétocytes, ont été prélevés dans deux tubes héparinés. Puis, les deux tubes ont été centrifugés à 3000 r.p.m. pendant 3 minutes dans une centrifugeuse thermostable (37°C). Le plasma surnageant de l'un des tubes a été délicatement retiré par pipetage puis remplacé par une quantité équivalente d'un plasma issu d'un pool de donneurs non immun de groupe sanguin AB, préalablement chauffé dans un bain marie à 37°C (sang AB). Le contenu du second tube (plasma autologue et culot cellulaire) a été simplement homogénéisé (sang OWN). Les deux sangs reconstitués ainsi obtenus ont servi à gorger des anophèles femelles à jeun depuis la veille.

I.2. Evaluation de l'efficacité des TBV en présence de l'immunité naturelle

Afin de mesurer l'efficacité des candidats TBV dans des conditions expérimentales au plus proches des conditions naturelles, les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont été simultanément testés en présence et en absence de l'immunité naturelle des porteurs de gamétocytes comme décrit dans notre chapitre 1. On disposait donc de quatre conditions pour tester chaque candidat TBV :

- Sang du porteur de gamétocytes avec remplacement du sérum par du sérum AB

- Sang total du porteur avec sérum OWN (pour estimer l'immunité naturelle bloquant la transmission)
- Sang du porteur de gamétocytes avec remplacement du sérum par du sérum AB + anticorps (efficacité de TBV en absence de l'immunité naturelle)
- Sang total du porteur avec sérum OWN +anticorps (pour efficacité de TBV en présence de l'immunité naturelle)

Ces différentes combinaisons ont été utilisées pour gorger des groupes d'*An. coluzzii* de 3 à 4 jours maintenus à jeun pendant les 24 heures précédentes. Sept jours après le repas sanguin, les moustiques ont été disséqués pour détecter et compter les oocystes. L'efficacité des anticorps et immunité naturelle a été évaluée en termes de d'activité bloquant la transmission (TBA) et d'activité réduisant la transmission (TRA).

I.3. Evaluation du niveau de transmission sur le terrain

I.3.1. Mesure du niveau d'infection dans la population humaine

Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés à estimer le niveau d'infection chez les enfants chez qui nous avons recherchés les porteurs de gamétocytes. Bien que la population cible n'est représentative pour des enquêtes parasitologiques dans une vision générale sur le terrain, les données, recueillies permettent néanmoins de mesurer le niveau d'infection dans un réservoir d'infection pour les vecteurs, et pourraient servir de base pour une extrapolation à l'ensemble de la population humaine. Alors pour les cas d'infection, les densités parasitaires et gamétocytemies ont été estimées sur la base du nombre de trophozoïtes ou de gamétocytes comptés pour respectivement 100 ou 1000 leucocytes cumulativement comptés. En assumant le nombre de leucocytes à 8000 par microlitre de sang, la densité parasitaire ou gamétocytaire absolue (nombre/ μ l de sang) a été déduite par les formules :

$Parasitémie = \frac{8000 \cdot \text{nombre de trophozoïtes}}{1000} ; Gamétocytemie = \frac{8000 \cdot \text{nombre de gamétocytes}}{1000}$
--

I.3.2 Mesure du niveau d'infection au sein des vecteurs majeurs sur le terrain

I.3.2.1. Capture, dissection de moustiques de terrain

Pour estimer le niveau d'infection à *Plasmodium* chez les vecteurs majeurs du paludisme sur le terrain, un suivi entomologique longitudinal a été réalisé en échantillonnant des moustiques dans le village de Soumousso. En rappel, ce village a servi de site pour la recherche de gamétocytes de *Plasmodium* dans la population d'enfants. Un plan de collecte intégrant quartiers et concessions a été établi sur la base d'une carte géographique (Fig. 30). Afin de couvrir les fluctuations temporaires de la transmission due aux conditions climatiques et aux porteurs de gamétocytes, des collectes mensuelles ont été effectuées. Les intervalles de temps entre les collectes ont également permis de minimiser la capture des moustiques de même génération, gorgés sur les mêmes porteurs. Pour chaque collecte mensuelle, les moustiques ont été capturés dans les habitations durant trois jours consécutifs tous les matins, en se servant d'un aspirateur à bouche et d'une torche (Anthony *et al.* 2000). Les anophèles femelles (*An. gambiae* et *An. funestus*) ont été triés de l'ensemble des collectes sur la base des critères morphologiques des clés de détermination taxonomique (Gillies & De Meillon 1968; Gillies & Coetzee 1987). Ces principaux moustiques vecteurs ont été conservés dans les conditions standards de l'insectarium à l'IRSS, nourris au glucose 10% puis disséqués 5 jours plus tard pour la détection des oocystes sur les estomacs. Les carcasses de ces mêmes moustiques (tête-thorax) ont été conservés à -20°C pour des analyses immunologiques et moléculaires.

LOCALITE DE SOUMOUSO

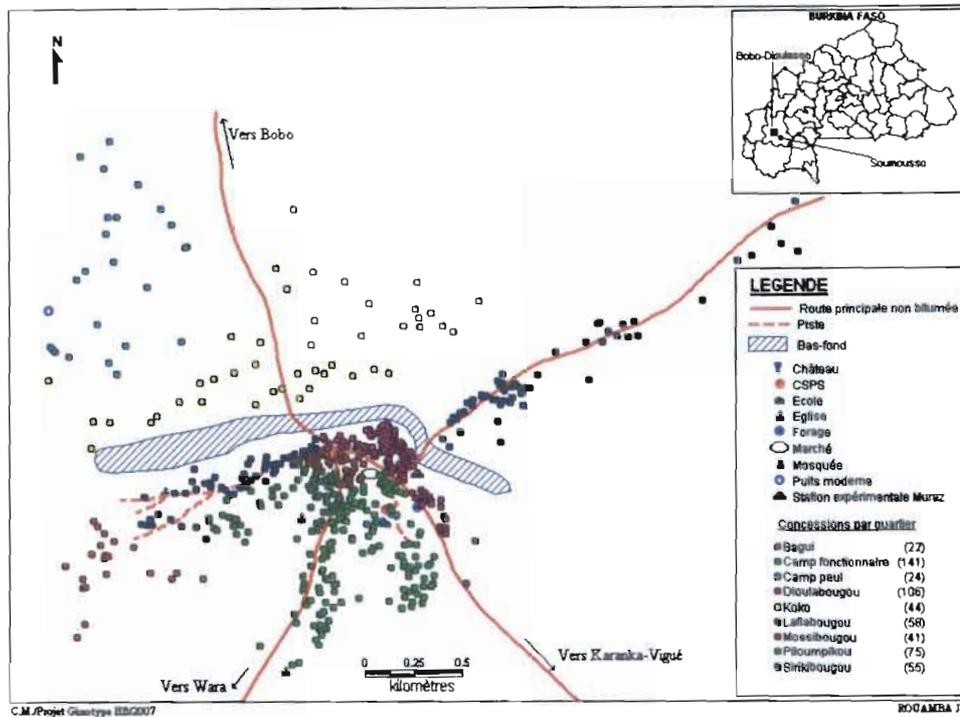


Figure 30 : Présentation graphique du village de Soumouso.

Constitué de 9 quartiers (regroupement des points par couleur), les maisons (chaque point de la carte) sont disposées de part et d'autre d'un bas-fond à inondation temporaire. Utilisant le plan de cette carte, les collectes de moustiques pour chaque sortie étaient effectuées par maison (autant que possible) et par quartier pendant 3 jours consécutifs pour former l'échantillon du mois.

1.3.2.2. Test immunologique d'indice sporozoïtique : ELISA csp

Afin d'évaluer la prévalence des vecteurs porteurs de sporozoïtes de *Plasmodium*, les *Anopheles* précédemment disséqués pour la détection des oocystes, ont également été testés par la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sur les têtes et thorax. Le principe de ce test immunologique est basé sur la mise en évidence d'un antigène de surface du parasite, la « circumsporozoïte protein » (csp) à l'aide de deux anticorps suivant le protocole décrit par (Wirtz *et al.* 1987). Les carcasses des moustiques (tête-thorax pour ne détecter que les parasites dans les glandes salivaires) ont été d'abord broyées dans une solution tampon pour isoler les antigènes parasitaires. Ces antigènes ont été par la suite capturés par des anticorps dit de capture, préalablement fixés sur une plaque ELISA. Un anticorps conjugué (marqué à la peroxydase) a été ensuite fixé sur le complexe anticorps de capture/antigènes. Enfin, le substrat de la peroxydase a été ajouté pour déclencher la réaction enzymatique révélatrice des échantillons positifs par une coloration bleue.

II. Résultats

II.1. Efficacités de TBV/immunité naturelle

II.1.1. L'immunité naturelle réduit le niveau d'infection à *Plasmodium* chez les vecteurs

Un point important de notre travail était d'estimer les capacités des réponses immunitaires naturelles des sujets humains à agir sur la transmission des parasites aux moustiques et comment elles pouvaient interagir avec les TBV. Pour cela, les moustiques ont été nourris sur du sang infecté en présence et en absence des propres facteurs sériques des porteurs de gamétocytes, et disséqués 7 jours plus tard pour apprécier leur niveau d'infection dans les groupes expérimentaux. Au total, treize patients avec des gamétocytemies variées ont été inclus pour tester l'effet de leur sérum sur le développement des oocystes. L'effet de leur sérum a été aussi évalué en termes d'activité bloquant la transmission (TBA) et d'activité réduisant la transmission (TRA). La figure 31, montre la distribution des oocystes dans les groupes expérimentaux pour 3 des expériences réalisées, et les valeurs estimées ont été consignées dans le tableau X. L'analyse révèle une réduction de l'intensité de 44,50%, IC95% [35,74 ; 53,25] en moyenne sur l'ensemble des 13 expériences. Cette réduction très peu variable semble ne pas avoir une relation avec la densité de gamétocytes. La figure 32A présentant les intensités de l'infection dans les groupes tests et contrôles, révèle clairement l'aspect standard de la TRA de cette immunité dans la population humain testée. Par ailleurs, cette immunité bloque la transmission du parasite à 18.79% IC95% [08,66 ; 28,92] en moyenne ; un blocage qui montre une relation négative avec l'intensité de l'infection comme démontré pour les candidats TBV (figure 32B). Ces tendances suggèrent que la pression immunitaire pourrait s'avérer plus efficace en termes de blocage de la transmission par une réduction de la prévalence d'infection chez les moustiques exposés à de très faibles intensités d'infection. Des travaux en cours portant sur des porteurs de faibles gamétocytemies nous permettront de vérifier cette hypothèse.

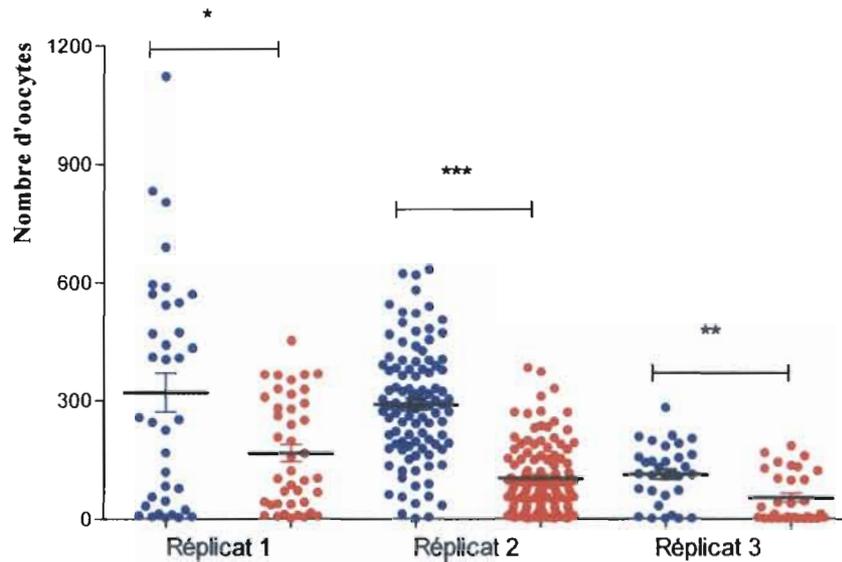


Figure 31: Distribution du nombre d'oocystes mettant en évidence l'immunité naturelle de l'homme. Les points représentent chacun le nombre d'oocystes comptés sur l'estomac du moustique disséqué pour les groupes contrôles (AB) en bleu et les groupes en présence du sérum du porteur (OWN) en rouge

Tableau X: Récapitulatif des expériences pour mesurer l'immunité de l'homme.

	Prévalence de l'infection % (n/N)			Intensité de l'infection (moy. d'oocystes ±SEM)		
	Contrôle (AB)	Test (OWN)	TBA	Contrôle (AB)	Test (OWN)	TRA
Expérience 1	99,00 (100/101)	96,43 (108/112)	02,60	289,79 ±14,40	102,94±08,23 ***	63,52
Expérience 2	74,19 (23/31)	70,37 (19/27)	05,15	19,23 ±03,57	010,37±02,31*	43,13
Expérience 3	64,29 (45/70)	24,59 (15/61)	61,74	02,11±00,33	00,51±00,13***	37,16
Expérience 4	70,00 (49/70)	61,40 (35/57)	12,28	03,34±00,47	01,37±00,28***	53,33
Expérience 5	92,31 (36/39)	91,11 (41/45)	01,30	294,46±48,42	151,89±20,88**	47,74
Expérience 6	88,57 (31/35)	75,76 (25/33)	14,47	08,71±01,09	05,39±00,96 NS	27,63
Expérience 7	84,62 (44/52)	58,82 (20/34)	30,48	07,58±00,89	04,15±00,81**	21,27
Expérience 8	80,39 (41/51)	79,63 (43/54)	00,95	015,22±02,08	04,26±00,54***	71,73
Expérience 9	88,24 (15/17)	73,81 (31/42)	16,35	036,35±01,03	17,88±03,77*	41,19
Expérience 10	86,27 (44/51)	58,57 (41/70)	32,11	05,63±00,65	02,71±00,49 NS	28,95
Expérience 11	93,33 (28/30)	76,19 (16/21)	18,36	17,40±02,28	10,95±02,44 NS	37,06
Expérience 12	90,62 (29/31)	70,90 (22/31)	21,69	112,9±13,09	53,39±11,39**	52,71
Expérience 13	96,77 (30/31)	70,83 (34/48)	26,80	68,06±08,05	31,96±05,22***	53,04

* Différence Significative entre le paramètre mesuré dans le groupe test et contrôle, NS = Différence non significative Moy. = moyenne arithmétique, SEM = erreur standard sur la moyenne ; N = effectif de moustiques disséqués ; n = effectif de moustiques infectés

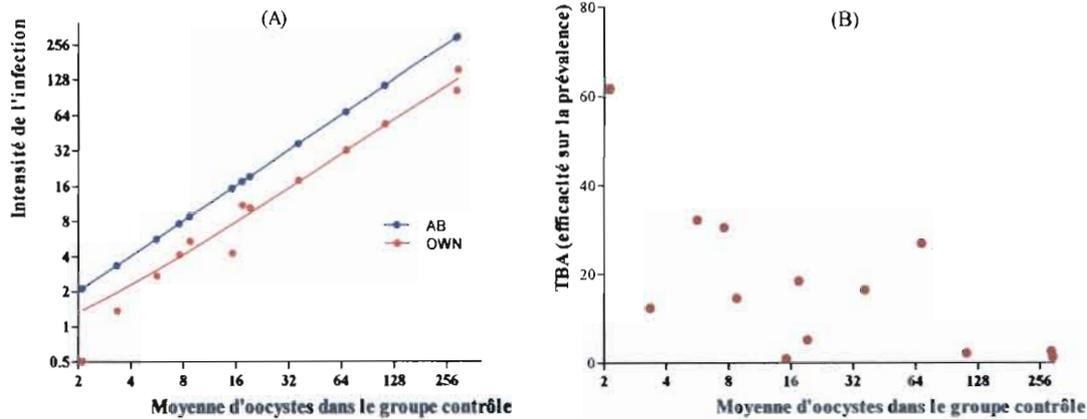


Figure 32 : Impact de l'immunité de l'homme sur la sporogonie de *P. falciparum* chez *An. coluzzii*. (A) présente l'intensité de l'infection chez les moustiques gorgés sur du sang infectieux en présence de l'immunité naturelle bloquante (OWN : en rouge) en relation avec les intensités d'infection chez les moustiques gorgés sur le même sang infectieux avec changement de sérum (AB : en bleu) ; (B) indique la relation en activité bloquant la transmission et intensité de l'infection dans les groupes contrôle (sérum AB).

II.1.2. Interactions entre activité des TBV et l'immunité naturelle des patients

Afin d'investiguer les interactions entre immunité naturelles et efficacité des TBV, les anticorps anti-Pfs25 et anti-Pfs230 ont été simultanément testés en présence et en absence de l'immunité naturelle des porteurs de gamétocytes. Sur 3 expériences réalisées, nous n'avons pas observé de différence significative dans la distribution des oocystes au sein des moustiques gorgés sur du sang en présence d'anticorps avec ou sans des facteurs sériques (Fig.33). Le tableau XI compare l'efficacité de chaque candidat vaccin testé dans les différentes conditions. Nous n'avons pas observé d'effet additif entre l'immunité naturelle et le TBV. La réduction de l'intensité due au TBV n'est pas augmentée en présence de l'immunité naturelle. En d'autres termes, il semble que nous sommes dans une situation d'effet sub-additif (l'effet est au moins égal à l'effet le plus important).

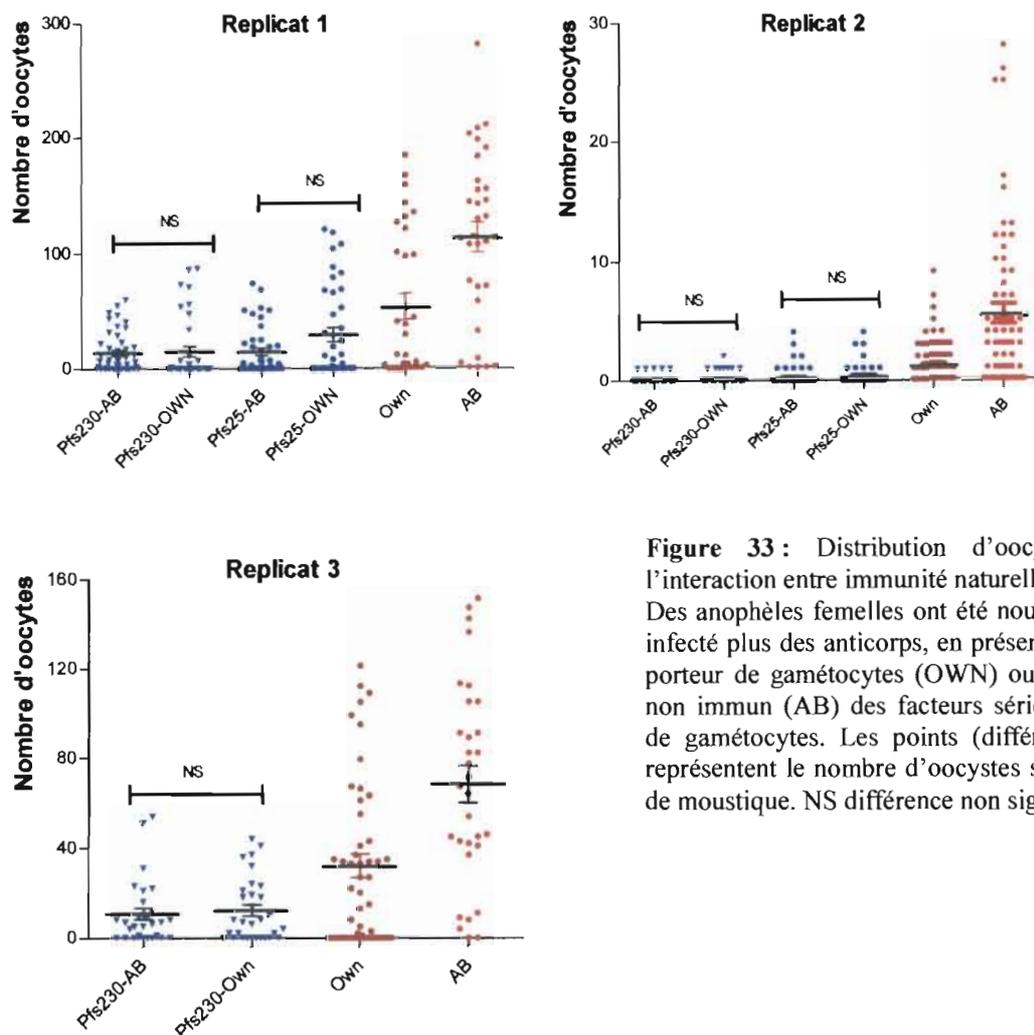


Figure 33 : Distribution d'oocystes illustrant l'interaction entre immunité naturelle et induite. Des anophèles femelles ont été nourris sur du sang infecté plus des anticorps, en présence du sérum du porteur de gamétocytes (OWN) ou avec un sérum non immun (AB) des facteurs sériques du porteur de gamétocytes. Les points (différents symboles) représentent le nombre d'oocystes sur les estomacs de moustique. NS différence non significative.

Tableau XI : Récapitulatif de l'efficacité des anticorps avec et sans l'immunité naturelle

		Blocage de la prévalence (TBA en %)		<i>p</i>	Réduction de l'intensité (TRA en %)		<i>p</i>
		Ac-AB	Ac-OWN		Ac-AB	Ac-OWN	
Pfs230	Expérience 1	22,52	36,55	0.0565	87,52	73,87	0.0227
	Expérience 2	91,00	88,60	0.8376	98,80	98,28	<i>l</i>
	Expérience 3	21,60	26,66	0.5124	84,34	82,17	0.9141
Pfs25	Expérience 1	29,06	57,08	0.0002	86,93	86,64	<i>l</i>
	Expérience 2	87,18	80,46	0.3812	96,95	95,06	<i>l</i>

Ac-AB anticorps dans du sang avec un sérum AB (privé d'une immunité anti-plasmodiale) ; Ab-OWN anticorps dans du sang total des porteurs de gamétocytes (contenant tous les facteurs sériques).

II.2. Niveau de l'infection chez les hommes et chez les anophèles

II.2.1. Le niveau d'infection à *Plasmodium* dans la population humaine

II.2.1.1 L'infection à Plasmodium demeure tout au long de l'année

Les données parasitologiques ont été collectées de 2009 à 2012, auprès de la population d'enfants (5-12 ans) particulièrement susceptibles. Ces données essentiellement basées sur la recherche de gamétocytes, fournissent des données non représentatives de l'ensemble de la population. Cependant, ces données révèlent une image de la transmission dans la population vulnérable. Au total 18841 examens parasitologiques ont été réalisés sur un effectif d'environ 2500 enfants de la localité de Soumousso et de Dandé. Les gouttes épaisses observées au microscope ont révélé des cas d'infections à chaque mois de l'année que nous avons échantillonné. Aussi, l'analyse des données, effectuée par mois de chaque année, a montré des tendances similaires de l'infection pour les mêmes mois des différentes années. Partant de ce constat, les résultats pour les 4 années ont été rassemblés autour des 12 mois. Les prévalences moyennes d'infection estimées étaient comprises entre 25 et 52% en considérant l'ensemble des formes parasitaires, et entre 5 et 11% pour les gamétocytes (Fig. 34). L'espèce *falciparum* a été largement dominante avec 99,13% dans la population d'enfants infectés. En termes de densité de l'infection, une large gamme de parasitémies et de gamétocytémies ont été observées selon les périodes de l'année et au sein d'une même période (Fig. 35). Toutefois, l'infection à *Plasmodium* aussi bien en prévalence qu'en densité, variait sensiblement selon les saisons de l'année. En effet, l'infection plasmodiale atteint son maximum entre Septembre-Octobre avant de baisser pour atteindre son minimum dans le mois d'Avril (Fig. 34 ; Fig. 35).

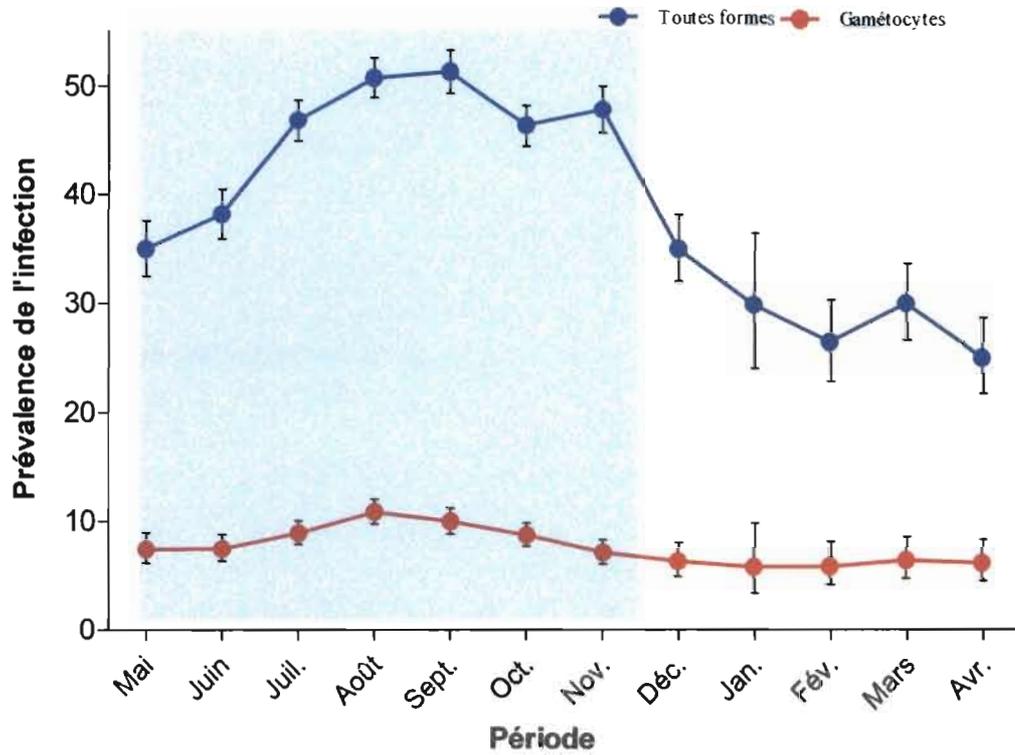


Figure 34 : Prévalence de l'infection à *Plasmodium* suivant les 12 mois de l'année. Les données de 4 ans de données parasitologiques ont été rassemblées pour chaque mois de l'année, puis la prévalence de l'infection a été estimée avec l'intervalle de confiance à 95%. Les fonds bleus et roses désignent respectivement les périodes de fortes et de faibles infections.

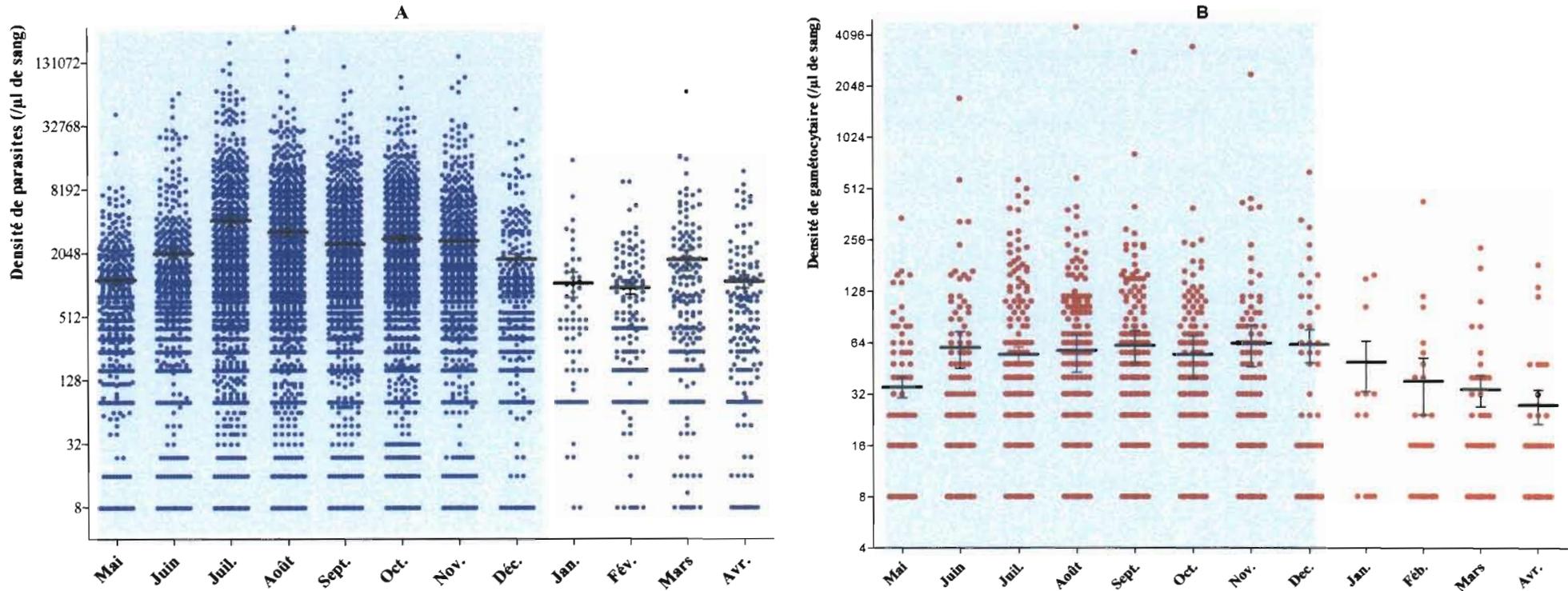
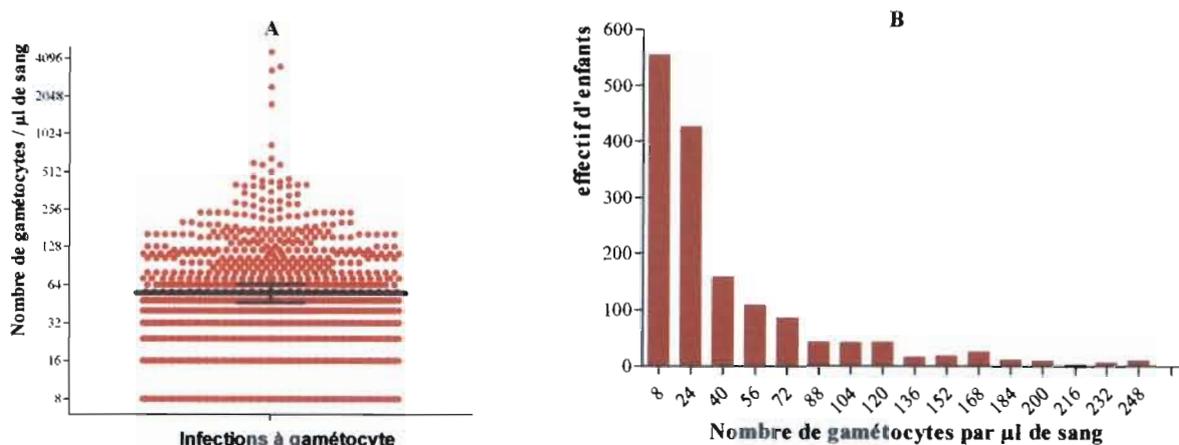


Figure 35 : Distribution de la densité de *Plasmodium* dans la population humaine.

Chaque point sur les graphes représente une valeur de la densité de *Plasmodium*. A l'issue des gouttes épaisses réalisées chez les enfants de 5 à 12 ans, les densités de parasites toutes formes confondues (A) et de gamétocytes ont été estimées pour 8251 cas d'infections enregistrés. Les fonds bleus et roses désignent respectivement les périodes de fortes et de faibles infections.

II.2.1.2. Analyse approfondie du niveau d'infection chez les enfants

Partant du principe que les gamétocytes sont les formes transmissibles du parasite de l'homme au moustique, nous avons regroupé l'ensemble des densités gamétocytaires afin d'effectuer une description selon les paramètres entrant dans l'évaluation des candidats TBV. Ainsi, parmi 1599 cas d'infection à gamétocytes de *P. falciparum*, nous avons observé une distribution très hétérogène de la gamétocythémie. En effet des porteurs ont été identifiés avec une très large échelle de gamétocythémies d'environ 8 à 9152 gamétocytes par microlitre de sang (Fig. 36A), suggérant une large fenêtre de densités sur le terrain. D'une manière générale, la densité moyenne est estimée 55,20 [45,79 ; 64,61] gamétocytes / μ l de sang pour une médiane de 16. Cependant, l'histogramme de la distribution (Fig. 36B) a montré que 80% des densités gamétocytaires sont en dessous de la moyenne, suggérant une surestimation de cette moyenne du fait des cas exceptionnels potentiellement élevés. Pour plus de précision dans les estimations, une analyse stratifiée a été effectuée, révélant les moyennes gamétocytaires suivant les différentes étendues de la distribution des gamétocythémies (Fig. 36C). Ces valeurs plus représentatives serviront à comprendre l'épidémiologie de la transmission du parasite de l'homme au moustique.



C

Etendue de gamétocythémie [minimum ; maximum]	[8 ; 56]	[8 ; 104]	[8 ; 248]	[8 ; 500]	[8 ; 4560]
Proportion d'infections (effectif)	78,04 (1248)	88,74 (1419)	97,56 (1560)	99,31 (1588)	100 (1599)
Moyenne [IC95%]	19,08 [18,28 ; 19,81]	26,27 [25,02 ; 27,51]	38 [35,76 ; 40,24]	43,52 [40,50 ; 56,55]	55,20 [45,79 ; 64,61]

Figure 36 : L'analyse détaillée des infections à gamétocytes dans la population d'étude (A) indique la distribution des gamétocythémies observées, (B) les l'histogramme de cette distribution et (C) le tableau résumant les différentes moyennes estimée pour chaque étendue des observations.

II.2.2. Niveau d'infection à *Plasmodium* chez les vecteurs sur le terrain

II.2.2.1. Résultats globaux

Dans le but de mesurer le niveau de l'infection à *Plasmodium* dans la population sauvage des vecteurs majeurs, 2296 anophèles femelles ont été collectés de Juin à Novembre 2011 à Soumouso, pour la détection et le comptage des oocystes ainsi que pour l'évaluation de l'indice sporozoïtique. Sur toutes les collectes mensuelles, nous avons observé au sein des moustiques disséqués des infections qualitativement et quantitativement très variées. Les moustiques infectés présentaient une surdispersion du nombre d'oocystes compris entre 1 et 100 dans la majeure partie des cas avec quelquefois des infections exceptionnelles allant jusqu'à 436 oocystes (Fig. 37). De plus, nous avons observé des moustiques infectés à la fois par des oocystes jeunes et matures, suggérant la prise de différents repas de sang infectieux décalés dans le temps. Au stade oocyste, l'intensité de l'infection a été calculée pour chaque collecte mensuelle. Le test immunologique ELISA a révélé des moustiques porteurs de sporozoïtes alors qu'ils présentaient aussi des oocystes, suggérant des infections multiples ou une libération progressive des sporozoïtes par les différents oocystes. Compte tenu de cet aspect, la prévalence de l'infection à *Plasmodium* des anophèles a été évaluée en combinant les résultats des deux tests (oocyste et indice sporozoïtique) pour chaque moustique. En d'autres termes le moustique est déclaré infecté lorsqu'il portait des oocystes sur son estomac et/ou les sporozoïtes dans ses glandes salivaires. Le tableau XII présente les détails sur la prévalence d'infection chez les moustiques aux deux stades dans la nature. L'analyse révèle qu'en moyenne 17,92% IC95% [13,72 ; 22,12] des anophèles vecteurs circulant dans la nature pendant cette période étaient porteurs de *Plasmodium*, tous stades confondus. Une prévalence de 11,76% [8,81 ; 14,72] de moustiques était infectés au stade oocyste avec une intensité d'infection estimée à $7,29 \pm 0,75$ oocystes par moustique infecté. Sur l'ensemble de la période de capture, un indice sporozoïtique de 9,19% [4,55 ; 13,82] a été révélé en moyenne par mois. En d'autres termes, environ 10% d'anophèles dans la nature étaient susceptibles de transmettre le *Plasmodium* aux humains. Aussi, au cours d'une collecte entomologique, nous avons découvert un cas d'*An. rufipes* infecté par *Plasmodium* au stade oocyste. L'implication de cette espèce d'anophèles en tant que vecteur de paludisme a été évoquée par Holstein depuis 1960. Nos résultats préliminaires ont été publiés (Da *et al.* 2013a) en attendant les résultats d'une investigation en cours afin de statuer sur la susceptibilité de cette espèce d'anophèle en tant que vecteur dans la transmission du paludisme.

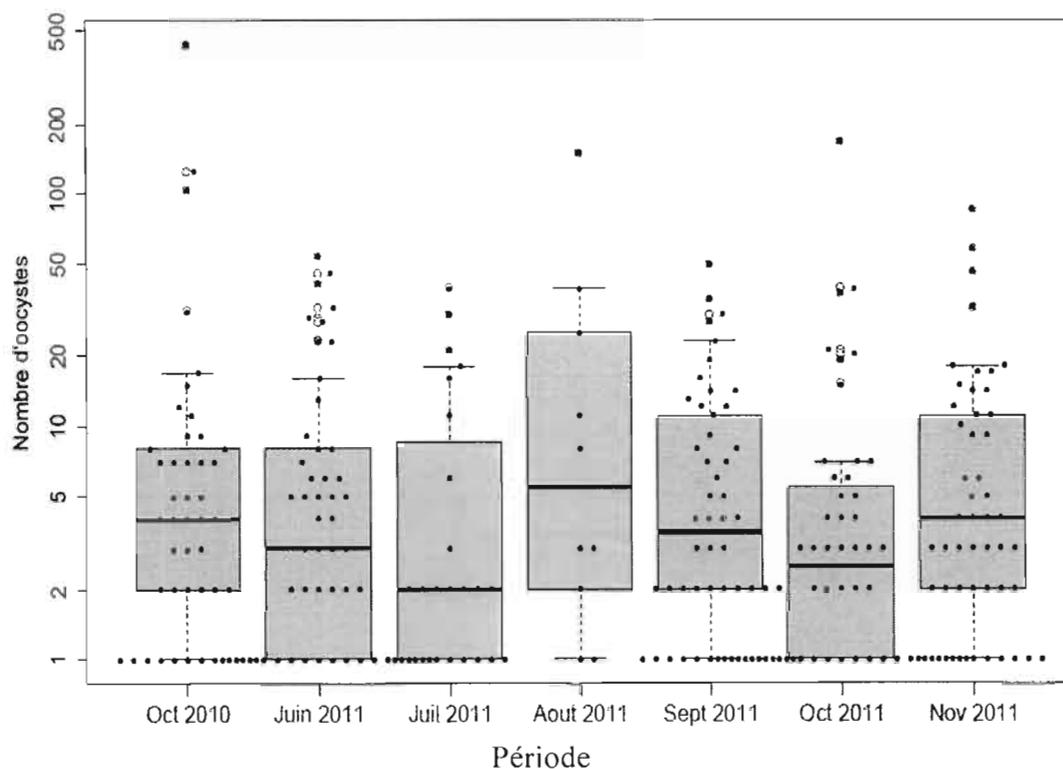


Figure 37 : Distribution du nombre d'oocystes au sein des anophèles sauvages. Chaque point représente l'effectif d'oocystes dans un moustique infecté.

Tableau XII: Récapitulatif du niveau d'infection à *Plasmodium* au sein des vecteurs sauvages

	Oct. 2010	Juin 2011	Juil. 2011	Août 2011	Sept. 2011	Oct. 2011	Nov. 2011	Moyenne	
Prévalence % (n/N)	oocystes	12,5 (50/400)	7,87 (24/305)	12,5 (50/400)	11,25 (45/400)	12,32 (49/398)	17,52 (48/274)	8,40 (10/119)	<u>11,76</u>
	sporozoïtes	18,5 (74/400)	13,11 (40/305)	08,25 (33/400)	03,75 (15/400)	06,78 (27/398)	08,02 (22/274)	05,88 (7/119)	<u>9,19</u>
	Prévalence totale	25,5 (102/400)	19,34 (59/305)	17,5 (70/400)	13,25 (53/400)	16,08 (64/398)	21,17 (58/274)	12,6 (15/119)	<u>17,92</u>
Intensité	Médiane	3,5	2	3	4	4	2	3	<u>3</u>
	Moyenne [IC95%]	7,76 [4,9 ; 10,6]	6,96 [2,6 ; 11,3]	8,54 [5 ; 12]	5,28 [3,5 ; 7]	9,77 [5,3 ; 14,3]	5,45 [2,9 ; 7,9]	10,33 [0,2 ; 20,5]	<u>7,72</u>

1.2.2.1. Analyse quantitative et qualitative de l'intensité de l'infection

Afin de mieux apprécier l'intensité de l'infection dans son ensemble, nous avons assimilé les moustiques infectés au stade oocyste en une population issue d'une infection. Nous avons ainsi obtenu 275 moustiques infectés (sur 2296 disséqués, 11,97%) avec une surdispersion

dans la distribution du nombre d'oocystes (Coefficient de variation $k=293.73\%$) (Fig. 38A). Une moyenne de 10,81 (soit 11) d'oocystes par estomac a été observée de façon générale. Cependant, l'histogramme de la distribution a montré près de 98% de moustiques infectés porte moins de 7oocystes (Fig. 38B) suggérant encore une surestimation de cette moyenne, compte tenu des charges en oocystes exceptionnelles observées pour une minorité de moustiques. Pour une meilleure représentativité des moyennes estimées, nous avons procédé à une analyse par classe (Fig. 38C). Ainsi, en dehors des moustiques présentant des niveaux d'infection exceptionnels (5/275), la moyenne générale est réduite à 7,36 oocystes par moustique, et paraît plus représentative dans les estimations de l'efficacité des TBV en conditions naturelles.

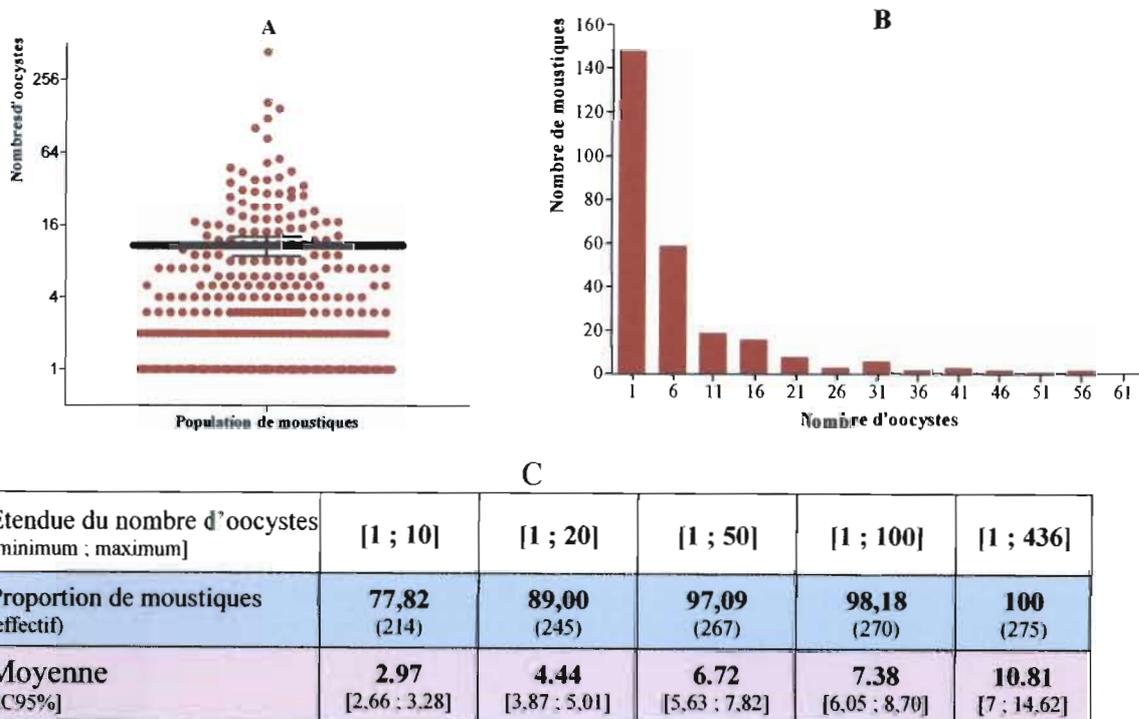


Figure 38 : Description globale de l'intensité de l'infection au sein des vecteurs sauvages. (A) distribution du nombre d'oocystes, largement dominé par un faible nombre d'oocystes (B) Histogramme de distribution des of oocystes

II.2.3. Niveau de transmission homme – moustiques sur le terrain

Afin d'estimer le niveau de transmission homme-moustique nous combiné les deux analyses stratifiées effectuées pour les niveaux d'infection au sein de la population humaine et chez les vecteurs sur le terrain (tableau XIII). Cette analyse comparative a révélé un appariement adéquat des variables, de la population humaine à la population de vecteurs, suivant les

niveaux de transmission que nous avons définis. En l'occurrence, environ 80% de la transmission homme-moustique est assurée par des porteurs humains d'environ 20 gamétocytes/ μl de sang qui génèrent 3 oocystes en moyenne chez les moustiques.

Tableau XIII: Concordance entre l'infection à *Plasmodium* dans la population humaine et chez les vecteurs sauvages.

	Etendue - distribution		Proportion		Moyennes	
	DG (μl)	No d'oocystes	% DG (μl)	%No de moustiques	DG (μl)	Oocystes
Niveau 1(très faible)	[8 ; 56]	[1 ; 10]	78,04	77,82	19,08	2.97
Niveau 2 (faible)	[8 ; 104]	[1 ; 20]	88,74	89,00	26,27	4.44
Niveau 3 (Modérée)	[8 ; 248]	[1 ; 50]	97,56	97,09	38	6.72
Niveau 4 (fort)	[8 ; 4560]	[1 ; 436]	100,0	100	55,20	10.81

III Discussion

III.1. Relation Immunité - efficacité des candidats TBV

Nous avons observé une réduction substantielle du rendement de la sporogonie de 44% en moyenne par l'immunité naturelle des personnes infectées par des gamétocytes, en conditions réelles de transmission. Notre étude n'est pas la première du genre sur l'immunité naturelle. Cette thématique largement traitée dans la littérature a montré l'effet de plusieurs facteurs dont l'âge et la fréquence de l'infection à *Plasmodium* (Drakeley *et al.* 1998; Drakeley *et al.* 2006a; Drakeley *et al.* 2006b; Bousema *et al.* 2011a; Bousema & Drakeley 2011b). Ici, nous avons évalué l'effet de l'immunité bloquant la transmission, en fonction de l'intensité de l'infection. Nous avons observé un effet constant de l'immunité naturelle sur la réduction de l'intensité de l'infection. Comme observé pour les TBV, la réduction de l'intensité entraîne une diminution de la prévalence dépendante de l'intensité initiale. Ainsi, lorsque l'infection est faible, l'immunité naturelle a un effet plus important en termes de réduction de la transmission. Ces modalités, identiques à celles des TBV, suggèrent qu'un effet additif pourrait être observé entre l'immunité naturelle et l'immunité induite par la vaccination TBV. Nous n'avons malheureusement observé qu'un effet sub-additif: l'effet de l'immunité naturelle semble nul quand combiné aux anticorps des candidats TBV. D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer cette tendance et en élucider les mécanismes. Il est toutefois encourageant d'observer qu'il n'y a pas d'antagonisme entre immunité naturelle et les TBV, car une telle situation était une inquiétude majeure dans le concept des TBV. Cette

compatibilité révélée dans notre étude s'avère très déterminante dans les perspectives de mise en œuvre des candidats TBV sur le terrain.

III.2. Du niveau de transmission homme-moustique sur le terrain

Nous avons voulu savoir si les intensités d'oocystes observées chez les vecteurs sauvages peuvent être mises en relation avec les gamétocytemies observées chez les hommes, bien que notre population d'étude fût restreinte aux enfants d'âge compris entre 5 et 12 ans. En effet, une telle relation nous permettrait d'estimer le niveau d'infection en oocystes chez les moustiques à partir de densités en gamétocytes chez les hommes, et ainsi prédire une efficacité des TBV. Il a été révélé que la transmission de *Plasmodium* de l'homme au vecteur est maintenue essentiellement par une faible intensité d'infection en conditions naturelles. Cela s'explique par les faibles densités gamétocytemies prédominantes dans la population humaine et aussi par l'importance de la pression immunitaire humaine révélée dans cette étude. Partant de ce constat, l'intensité de l'infection telle que révélée dans cet échantillon de vecteur illustre bien le niveau réel d'infection dans la population des anophèles, et nos faciès ainsi définis peuvent être utilisés pour prédire l'efficacité des TBV en conditions naturelles.

III.3. Extrapolation de l'efficacité des candidats TBV en conditions naturelles

III.3.1. Synthèse de l'efficacité des candidats TBV en conditions semi-naturelles

Au cours de nos travaux, deux antigènes ont été sélectionnés en leur qualité de candidats vaccins prometteurs. Nous sommes parvenus à la conclusion que le profil génétique des parasites est sans impact sur l'efficacité de ces 2 candidats vaccins. En revanche, nous avons démontré par modèle mathématique, que l'intensité de l'infection des moustiques influençait significativement leur efficacité. Aussi, la concentration d'anticorps dans le sang conditionne l'efficacité de ces candidats vaccins. Autrement dit, l'efficacité des candidats TBV dépend non seulement de leur degré d'immunogénéicité chez les individus mais aussi du profil épidémiologique de l'infection à *Plasmodium* de la zone. D'autre part, nous avons démontré que ces deux candidats vaccins agissent efficacement dans les conditions expérimentales assimilables à celles naturelles, notamment en présence de toutes les composantes du sang. Nous pensons que tel sera le cas, si ces candidats vaccins étaient administrés à des humains et

avaient généré autant d'anticorps. Supposant être dans ces conditions, il devient nécessaire de déterminer leur efficacité pour les intensités d'infections observées au sein des vecteurs sauvages sur le terrain.

III.3.2. Les candidats Pfs25 et Pfs230 : une efficacité prometteuse sur le terrain

Afin d'apporter des éléments de réponse à cette préoccupation relative à l'efficacité des candidats vaccins dans nos contextes épidémiologiques sur le terrain, nous avons comparé l'intensité de l'infection observée sur le terrain à celles obtenues en infection expérimentale dans les groupes contrôles de moustiques infectés. Nous avons inclus les infections pour lesquelles nous avons obtenu 100% de blocage pour les deux anticorps testés et comparé le niveau d'infection dans le contrôle négatif, avec le niveau d'infection parmi les moustiques infectés sur le terrain (Fig. 39). Cette analyse montre que le niveau d'infection sur le terrain est statistiquement inférieur à celui ces infections expérimentales ($p < 0.0001$, *Mann Whitney test*). Nous supposons donc qu'en favorisant les conditions en infection expérimentales, nous avons obtenu des niveaux d'infection supérieur à ceux dans la nature, et ainsi, nous avons sous estimé l'efficacité des candidats TBV pour bloquer la transmission homme-moustique.

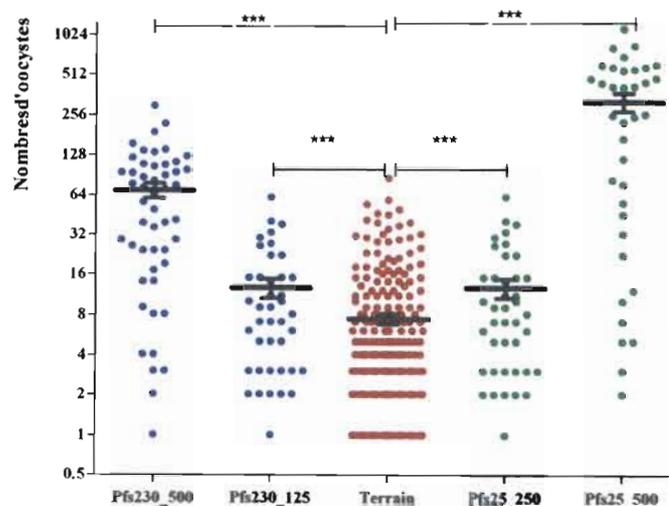


Figure 39 : Analyse comparative entre les intensités de l'infection au laboratoire et en conditions naturelles. Les points représentent le nombre d'ocystes comptés sur les estomacs des moustiques infectés dans les groupes expérimentaux. Les groupes de même couleurs représentent les intensités des groupes contrôles de moustiques pour les lesquels les anticorps testés à la concentration indiquée ont révélé 100% d'efficacité.

Dans le but de prédire l'efficacité des candidats vaccins en conditions naturelles, nous nous sommes servis de notre représentation graphique qui intègre à la fois les variables d'intensités d'ocystes et titres d'anticorps (Fig. 40). Cette représentation graphique (inspiré du modèle en

cours d'élaboration) permet de déduire d'une intensité de l'infection, le titre d'anticorps nécessaire pour bloquer la transmission. Les intensités d'infection obtenues dans les groupes contrôles illustrent les niveaux de transmission suivant les différents faciès épidémiologiques (les relations entre moyennes d'ocystes chez des moustiques infectés issus de plusieurs porteurs de gamétocytes sur le terrain et moyennes issues d'infections expérimentales sur un sang infectieux, restant à être établies). Pour l'interprétation des graphes, nous rappelons que les sections en pointillé représentent les combinaisons intensité/titre d'anticorps pour lesquelles une efficacité de 100% de blocage de la transmission est attendue. D'autre part, la section en couleur orange représente le domaine des intensités moyennes de l'infection obtenues sur le terrain, prenant en compte la moyenne maximale (11 ocystes/moustique infecté). Par projection graphique, nous estimons grossièrement que des doses minimales d'environ 125µg/ml et 250µg/ml d'anticorps issus des vaccins Pfs230 et Pfs25 suffiraient à bloquer totalement la transmission de *Plasmodium* d'homme-moustique dans le contexte épidémiologique de Soumouso. Dans d'autres contextes épidémiologiques tels que nous les avons définis en termes de niveau de transmission, ces valeurs minimales peuvent varier dans le sens de la diminution (Tableau XIV). A la limite de nos investigations, nous pensons que les deux candidats vaccins sont susceptibles de bloquer la transmission du paludisme dans nos contextes épidémiologiques, si ces antigènes sont à mesure de générer d'anticorps à des titres équivalents aux doses testées.

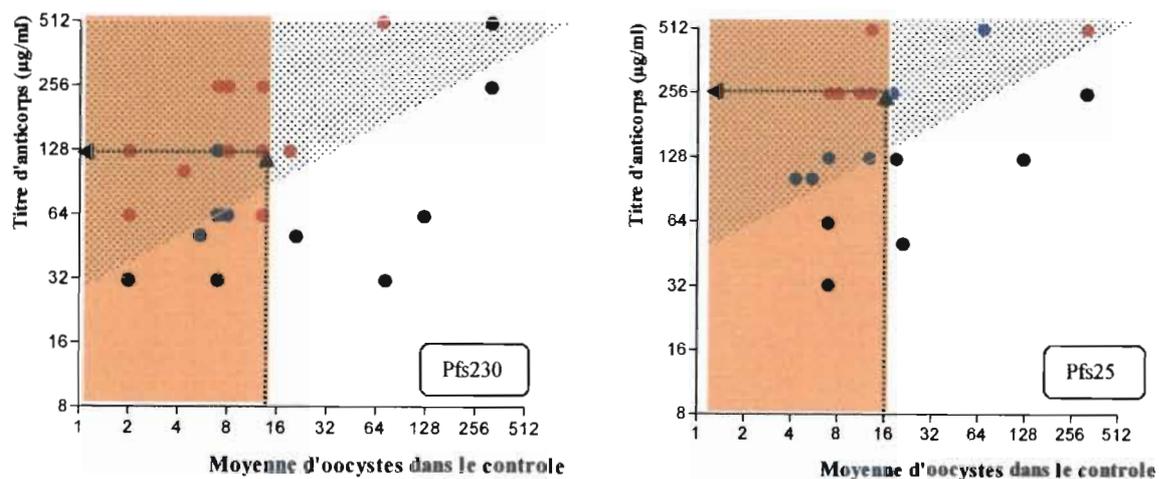


Figure 40: Analyse graphique pour extrapoler l'efficacité des candidats TBV sur le terrain. Les différents points indiquent les efficacités correspondant à chaque combinaison concentration d'anticorps / intensité de l'infection. Les couleurs des points correspondent au niveau d'efficacité avec : ● = efficacité < 70%, ● = efficacité 70 % - 99% et ● = 100% d'efficacité. La section marquée en pointillée désigne une zone dite de certitude i.e. à l'intérieur de laquelle toute concentration d'anticorps est susceptible de bloquer l'intensité de l'infection qui lui est associée. Le fond orange désigne la zone où se situent les intensités de l'infection sur le terrain.

Tableau XIV : Doses d'anticorps nécessaires en fonctions des faciès épidémiologiques

	Gamétocytémie dans la population humaine / μ L		Niveau d'infection dans la population de moustiques		Titre d'anticorps pour bloquer à 100% de	
	Distribution	Moyenne	Distribution	Moyenne	Pfs230	Pfs25
Zone à très faible transmission	[8 ; 56]	\approx 18	[1 ; 10]	\approx 3	62,5 μ g/ml	250 μ g/ml
Zone à faible transmission	[8 ; 104]	\approx 32	[1 ; 20]	\approx 5	100 μ g/ml	250 μ g/ml
Zone à transmission modérée	[8 ; 500]	\approx 40	[1 ; 100]	\approx 8	125 μ g/ml	250 μ g/ml
Zone à forte transmission	[8 ; 4560]	\approx 56	[1 ; 436]	\approx 11	125 μ g/ml	250 μ g/ml

Conclusion 3

Aux termes de cette partie, nous aboutissons à la conclusion que nos candidats TBV Pfs25 et Pfs230 peuvent agir en combinaison avec l'immunité acquise naturelle. Un effet sub-additif suggère une interaction entre immunité naturelle et celle induite par les candidats TBV, nécessitant des investigations supplémentaires pour en définir les mécanismes. S'agissant de l'intensité de l'infection, le niveau révélé sur le terrain au sein des vecteurs naturels de paludisme devrait pouvoir être déduite de la densité de l'infection dans la population humaine. L'intensité d'oocystes dans la nature, quoique élevée par rapport aux estimations de la communauté scientifique, demeure en dessous de celle que nous avons générée en conditions expérimentales chez les moustiques et que nous avons par conséquent sous-estimé l'efficacité des candidats TBV pour bloquer la transmission. Par extrapolation à travers un modèle simplifié, nous sommes parvenus à la conclusion que ces candidats vaccins testés devraient être en mesure de bloquer la transmission de Plasmodium homme-moustique pour ainsi limiter la propagation du paludisme.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons abordé un sujet relativement ancien, mais qui bénéficie actuellement d'un regain d'intérêt et qui requière des données supplémentaires pour une implémentation sur le terrain. Nous avons cherché à élucider l'efficacité des candidats TBV dans un contexte épidémiologique pertinent qui est la transmission de *P. falciparum* à un de ses vecteurs naturels en Afrique, *An. coluzzii*. L'innovation dans notre projet a été l'identification des paramètres qui influencent l'efficacité bloquant la transmission des principaux candidats TBV.

Nous avons pu obtenir du sérum issu du premier essai clinique de phase 1 pour un candidat TBV. Du sérum de personne volontaire, immunisée pour l'antigène Pfs25 a été mis en contact avec des isolats naturels de *P. falciparum* pour en tester l'efficacité. Ainsi, nous avons testé ce candidat vaccin dans les conditions les plus proches des conditions naturelles testées jusqu'à présent (sérum humain et isolats naturels de parasites). Cet essai a mis en évidence une efficacité remarquable en termes de TRA (diminution de l'intensité d'infection) de l'ordre de 80%, mais moindre en termes de TBA (diminution de la prévalence d'infection), en moyenne environ 30%. Ces résultats étaient à la fois encourageants et décevants, sachant que c'est la diminution de la prévalence d'infection qui est recherchée pour contrôler la transmission de *Plasmodium*. La différence d'efficacité TRA (constante) et TBA (qui diminue quand le nombre moyen d'oocystes dans le groupe contrôle augmente) a suggéré une relation à établir entre ces deux indices d'efficacité des TBV. Par ailleurs, nous avons vérifié que la diversité génétique des parasites (différents haplotypes et multiplicité d'infection) n'affectait pas l'efficacité du candidat vaccin basé sur Pfs25.

Nous avons également pu comparer l'efficacité des 5 principaux candidats TBV, formulés à l'aide de virus recombinants, qui ont généré des anticorps chez des souris. Cette approche, moins proche des conditions naturelles que la précédente (car les anticorps ont été générés dans le modèle murin et non chez l'homme), a permis de tester plusieurs candidats en parallèles et de multiplier les conditions expérimentales, en particulier le titre d'anticorps. Cette première comparaison de candidats TBV sur des isolats naturels de parasites a confirmé l'intérêt de Pfs25 et Pfs230 : elle a établi une efficacité dépendante du titre en anticorps et de

l'intensité de l'infection. Nous avons donc perçu que si un modèle mathématique était réalisé, il serait possible de prédire l'efficacité du TBV en fonction du titre d'anticorps et de l'intensité de l'infection ou à l'inverse, de déterminer un titre d'anticorps à atteindre pour obtenir une efficacité satisfaisante en fonction de l'intensité de l'infection. Ces travaux ont donc établi l'importance cruciale de l'intensité de l'infection dans l'évaluation des TBV et la nécessité de modéliser les relations entre les doses infectieuses (densité en gamétocytes), le succès de l'infection chez le moustique et l'efficacité des TBV.

Pour cela une étude a été effectuée, en utilisant le modèle de laboratoire *P. berghei*-*An. stephensi* et le système naturel *P. falciparum*-*An. coluzzii*. Nous avons pu limiter les variations liées à chaque isolat de parasite par un protocole de dilution des gamétocytes, et ainsi établir des relations entre gamétocytémie chez l'hôte vertébré et succès de l'infection chez le moustique. Pour *P. falciparum*, nous avons mis en évidence une relation positive linéaire entre gamétocytémie et intensité de l'infection, jusqu'à des nombres moyens d'oocytes jusque là jamais mentionnés à notre connaissance, suggérant que de tels niveaux d'infection pourraient exister dans la nature, même si ils sont supposés être exceptionnels. Pour *P. berghei*, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur au stade précoce de la sporogonie des fortes densités en parasites. Ces différences soulignent une fois de plus les précautions nécessaires lors de comparaison des deux systèmes (modèle et naturel). Malgré ces différences, le système de laboratoire nous a permis de mettre en évidence, dans des conditions standardisées la relation négative entre efficacité d'un TBV pour bloquer l'infection en termes de prévalence (TBA) et l'intensité de l'infection dans le groupe contrôle, alors que la réduction de l'intensité de l'infection (TRA) reste constante. Une modélisation mathématique permet de prédire la TBA en fonction de l'intensité de l'infection à partir de la TRA. Ceci révèle l'importance de l'intensité de l'infection lors d'évaluation de TBV et souligne le fait que les valeurs de TRA sont plus informatives, car constantes pour un candidat donné, pour comparer des candidats TBV que les valeurs de TBA. Celles-ci pourront être extrapolées à partir des valeurs de TRA grâce au modèle mathématique et ainsi indiquer l'impact sur la transmission de *Plasmodium* dans un contexte donné.

Malgré l'importance de l'intensité de l'infection chez les vecteurs sur l'efficacité des TBV, très peu de données existent sur le nombre d'oocystes chez les vecteurs dans la nature. Nos données ont montré, qu'ils sont, dans nos sites d'études, plus élevés que ceux généralement mentionnés dans la littérature. Cependant ils restent inférieurs au niveau d'infections obtenus

par infection expérimentale au laboratoire. Ceci est probablement dû au fait que nous avons sélectionné des porteurs de gamétocytes avec des gamétocytemies élevées pour les infections expérimentales et de plus, que l'immunité naturelle des porteurs a été évitée par le changement du sérum. Ainsi, en favorisant des forts niveaux d'infection au laboratoire, nous avons probablement sous-estimé l'efficacité des candidates TBV en termes de TBA. Les expériences futures pourront chercher à générer des infections moins fortes pour obtenir en laboratoire des valeurs de TBA qui sont plus proches de celles qui devraient être obtenues sur le terrain. Une étape importante à l'avenir pour l'évaluation des candidats TBV sera de pouvoir traduire des intensités d'infection obtenues au laboratoire (moyennes issues chacune d'expositions de moustiques à un sang infectieux), avec des moyennes d'infections dans la nature qui sont les résultats d'infections de moustiques sur un nombre indéterminés de personnes infectées.

Parallèlement à notre sujet spécifique, nous avons contribué à réaliser d'autres travaux traitant des nouvelles stratégies de lutte contre le paludisme, notamment l'identification des molécules médicamenteuses bloquant la transmission de *Plasmodium* homme-moustique. Il s'est agi également d'étudier le coût de l'infection à *Plasmodium* sur la fécondité et la longévité des vecteurs dans les différentes conditions environnementales. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'articles soumis à publier (annexe 5).

Perspectives

Nos travaux ont confirmé l'intérêt des deux candidats vaccins que sont Pfs25 et Pfs230 et l'utilisation de virus recombinants pour la formulation de TBV. Dans ce cadre un essai clinique de phase 1 est prévu pour 2014 au Royaume Uni. Il pourrait constituer une avancée vers l'utilisation des TBV sur le terrain. L'objectif de l'essai clinique est d'obtenir des immunisations à des niveaux supérieurs à ceux obtenus jusqu'à présent puisqu'un effet proportionnel du titre d'anticorps a été mis en évidence. De plus nos résultats ouvrent des perspectives dans la co-formulation des molécules vaccinales. Notre ambition à courts termes est d'étudier l'efficacité de molécules vaccinales multivalentes, profitant de modes d'actions complémentaires. En effet, les deux candidats TBV Pfs230 et Pfs25 agissent respectivement au stade gamète et oocinète du développement sporogonique. Nous envisageons de mesurer leur effet en association en perspective d'une formulation vaccinale à base de ces deux

antigènes. Une telle formulation pourrait avoir l'avantage de bloquer la formation de gamètes, ou à défaut d'une efficacité totale, de réduire le nombre de parasites pour faciliter leur élimination au stade oocinète par l'effet du second candidat TBV (Pfs25). De même, l'antigène AgAPN1 de l'estomac de moustique a été identifiée comme récepteur pour l'oocinète au cours de son adhésion et sa traversée de la membrane épithéliale. Dans notre étude, les anticorps issus de ce candidat vaccin ont montré une efficacité limitée, mais d'autres formulations pourraient être plus efficaces et avoir un mode d'action complémentaire. Enfin, l'ambition à long terme est d'aboutir à un vaccin agissant à la fois chez l'homme et chez le moustique. Les candidats TBV en cours d'évaluation pourraient être co-formulés ou co-administrés avec des vaccins classiques agissant sur les stades parasitaires chez l'homme, par exemple le vaccin RTSS, pour potentialiser leur action et ainsi, constituer un outil efficace pour le contrôle et l'éradication du paludisme.

Références bibliographiques

- Abdel-Wahab A., Abdel-Muhsin A.M., Ali E., Suleiman S., Ahmed S., Walliker D. & Babiker H.A. (2002) Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J Infect Dis* **185**, 1838-42.
- Agnandji S.T., Lell B., Fernandes J.F., Abossolo B.P., Methogo B.G., Kabwende A.L., Adegnika A.A., Mordmuller B., Issifou S., Kremsner P.G., Sacarlal J., Aide P., Lanaspá M., Aponte J.J., Machevo S., Acacio S., Buló H., Sigauque B., Macete E., Alonso P., Abdulla S., Salim N., Minja R., Mpina M., Ahmed S., Ali A.M., Mtoro A.T., Hamad A.S., Mutani P., Tanner M., Tinto H., D'Alessandro U., Sorgho H., Valea I., Bihoun B., Guiraud I., Kabore B., Sombie O., Guiguemde R.T., Ouedraogo J.B., Hamel M.J., Kariuki S., Oneko M., Odero C., Otieno K., Awino N., McMorrow M., Muturi-Kioi V., Laserson K.F., Slutsker L., Otieno W., Otieno L., Otsyula N., Gondi S., Otieno A., Owira V., Oguk E., Odongo G., Woods J.B., Ogutu B., Njuguna P., Chilengi R., Akoo P., Kerubo C., Maingi C., Lang T., Olotu A., Bejon P., Marsh K., Mwambingu G., Owusu-Agyei S., Asante K.P., Osei-Kwakye K., Boahen O., Dosoo D., Asante I., Adjei G., Kwara E., Chandramohan D., Greenwood B., Lusingu J., Gesase S., Malabeja A., Abdul O., Mahende C., Liheluka E., Malle L., Lemnge M., Theander T.G., Drakeley C., Ansong D., Agbenyega T., Adjei S., Boateng H.O., Rettig T., Bawa J., Sylverken J., Sambian D., Sarfo A., Agyekum A., Martinson F., Hoffman I., Mvalo T., Kamthunzi P., Nkomo R., Tembo T., Tegha G., Tsidya M., Kilembe J., Chawinga C., Ballou W.R., Cohen J., Guerra Y., Jongert E., Lapierre D., Leach A., Lievens M., Ofori-Anyinam O., Olivier A., Vekemans J., Carter T., Kaslow D., Leboulleux D., Loucq C., Radford A., Savarese B., Schellenberg D., Sillman M. & Vansadia P. (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* **367**, 2284-95.
- Agnandji S.T., Lell B., Soulanoudjingar S.S., Fernandes J.F., Abossolo B.P., Conzelmann C., Methogo B.G., Doucka Y., Flamen A., Mordmuller B., Issifou S., Kremsner P.G., Sacarlal J., Aide P., Lanaspá M., Aponte J.J., Nhamuave A., Quelhas D., Bassat Q., Mandjate S., Macete E., Alonso P., Abdulla S., Salim N., Juma O., Shomari M., Shubis K., Machera F., Hamad A.S., Minja R., Mtoro A., Sykes A., Ahmed S., Urassa A.M., Ali A.M., Mwangoka G., Tanner M., Tinto H., D'Alessandro U., Sorgho H., Valea I., Tahita M.C., Kabore W., Ouedraogo S., Sandrine Y., Guiguemde R.T., Ouedraogo J.B., Hamel M.J., Kariuki S., Odero C., Oneko M., Otieno K., Awino N., Omoto J., Williamson J., Muturi-Kioi V., Laserson K.F., Slutsker L., Otieno W., Otieno L., Nekoye O., Gondi S., Otieno A., Ogutu B., Wasuna R., Owira V., Jones D., Onyango A.A., Njuguna P., Chilengi R., Akoo P., Kerubo C., Gitaka J., Maingi C., Lang T., Olotu A., Tsofa B., Bejon P., Peshu N., Marsh K., Owusu-Agyei S., Asante K.P., Osei-Kwakye K., Boahen O., Ayamba S., Kayan K., Owusu-Ofori R., Dosoo D., Asante I., Adjei G., Adjei G., Chandramohan D., Greenwood B., Lusingu J., Gesase S., Malabeja A., Abdul O., Kilavo H., Mahende C., Liheluka E., Lemnge M., Theander T., Drakeley C., Ansong D., Agbenyega T., Adjei S., Boateng H.O., Rettig T., Bawa J., Sylverken J., Sambian D., Agyekum A., Owusu L., Martinson F., Hoffman I., Mvalo T., Kamthunzi P., Nkomo R., Msika A., Jumbe A., Chome N., Nyakuipa D., Chintedza J., Ballou W.R., Bruls M., Cohen J., Guerra Y., Jongert E., Lapierre D., Leach A., Lievens M., Ofori-Anyinam O., Vekemans J., Carter T., Leboulleux D., Loucq C., Radford A., Savarese B., Schellenberg D., Sillman M. & Vansadia P. (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* **365**, 1863-75.
- Anderson T.J., Haubold B., Williams J.T., Estrada-Franco J.G., Richardson L., Mollinedo R., Bockarie M., Mokili J., Mharakurwa S., French N., Whitworth J., Velez I.D., Brockman A.H., Nosten F., Ferreira M.U. & Day K.P. (2000) Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* **17**, 1467-82.
- Annan Z., Durand P., Ayala F.J., Arnathau C., Awono-Ambene P., Simard F., Razakandrainibe F.G., Koella J.C., Fontenille D. & Renaud F. (2007) Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7987-92.

- Anthony T.G., Trueman H.E., Harbach R.E. & Vogler A.P. (2000) Polymorphic microsatellite markers identified in individual *Plasmodium falciparum* oocysts from wild-caught *Anopheles mosquitoes*. *Parasitology* **121** (Pt 2), 121-6.
- Badolo A., Traore A., Jones C.M., Sanou A., Flood L., Guelbeogo W.M., Ranson H. & Sagnon N. (2012) Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malar J* **11**, 232.
- Baker D.A. (2010) Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **172**, 57-65.
- Baton L.A. & Ranford-Cartwright L.C. (2005a) How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends Parasitol* **21**, 22-8.
- Baton L.A. & Ranford-Cartwright L.C. (2005b) Do malaria ookinete surface proteins P25 and P28 mediate parasite entry into mosquito midgut epithelial cells? *Malar J* **4**, 15.
- Beard C.B., Durvasula R.V. & Richards F.F. (1998) Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg Infect Dis* **4**, 581-91.
- Bell A.S., de Roode J.C., Sim D. & Read A.F. (2006) Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution* **60**, 1358-71.
- Berrya A., Iriarta X. & Magnavala J. (2009) Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*.
- Billingsley P.F. & Rudin W. (1992) The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J Parasitol* **78**, 430-40.
- Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A.E., Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R.E. & Morris H.R. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-92.
- Billker O., Miller A.J. & Sinden R.E. (2000) Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology* **120** (Pt 6), 547-51.
- Billker O., Shaw M.K., Margos G. & Sinden R.E. (1997) The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* **115** (Pt 1), 1-7.
- Blagborough A.M., Churcher T.S., Upton L.M., Ghani A.C., Gething P.W. & Sinden R.E. (2013) Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. *Nat Commun* **4**, 1812.
- Blagborough A.M. & Sinden R.E. (2009) *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. *Vaccine* **27**, 5187-94.
- Blandin S. & Levashina E.A. (2004) Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* **16**, 16-20.
- Boete C. (2005) Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol* **21**, 445-7.
- Boissiere A., Tchioffo M.T., Bachar D., Abate L., Marie A., Nsango S.E., Shahbazkia H.R., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A., Christen R. & Morlais I. (2012) Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog* **8**, e1002742.
- Boudin C., Lyannaz J., Bosseno M.F., Chaize J. & Carnevale P. (1989) [Production of sporozoites of human *Plasmodium* in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop* **69**, 3-23.
- Boudin C. & Robert V. (2003) [*Plasmodium falciparum*: epidemiology and man-mosquito transmission and infection in the vector]. *Bull Soc Pathol Exot* **96**, 335-40.
- Boudin C., Van Der Kolk M., Tchuinkam T., Gouagna C., Bonnet S., Safeukui I., Mulder B., Meunier J.Y. & Verhave J.P. (2004) *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunol* **26**, 105-10.
- Bousema T., Churcher T.S., Morlais I. & Dinglasan R.R. (2013) Can field-based mosquito feeding assays be used for evaluating transmission-blocking interventions? *Trends Parasitol* **29**, 53-9.
- Bousema T., Dinglasan R.R., Morlais I., Gouagna L.C., van Warmerdam T., Awono-Ambene P.H., Bonnet S., Diallo M., Coulibaly M., Tchuinkam T., Mulder B., Targett G., Drakeley C., Sutherland C., Robert V.,

- Doumbo O., Toure Y., Graves P.M., Roeffen W., Sauerwein R., Birkett A., Locke E., Morin M., Wu Y. & Churcher T.S. (2012b) Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One* **7**, e42821.
- Bousema T. & Drakeley C. (2011b) Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* **24**, 377-410.
- Bousema T., Sutherland C.J., Churcher T.S., Mulder B., Gouagna L.C., Riley E.M., Targett G.A. & Drakeley C.J. (2011a) Human immune responses that reduce the transmission of *Plasmodium falciparum* in African populations. *Int J Parasitol* **41**, 293-300.
- Boyd M.F. (1949) Epidemiology of malaria: factors related to the intermediate host. In: *Malariaology, Philadelphia Vol. I*, 551-697.
- Bruce M.C., Alano P., Duthie S. & Carter R. (1990a) Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* **100 Pt 2**, 191-200.
- Butcher G.A. (1997) Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int J Parasitol* **27**, 975-87.
- Canning E.U. & Sinden R.E. (1973) The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* **67**, 29-40.
- Carter R. (2001) Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**, 2309-14.
- Carter R. & Chen D.H. (1976) Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature* **263**, 57-60.
- Carter R. & Kaushal D.C. (1984) Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. III. Changes in zygote surface proteins during transformation to mature ookinete. *Mol Biochem Parasitol* **13**, 235-41.
- Carter R. & Mendis K.N. (1991) Immune responses against sexual stages of *Plasmodium vivax* during human malarial infections in Sri Lanka. *Parassitologia* **33**, 67-70.
- Carter R., Mendis K.N., Miller L.H., Molineaux L. & Saul A. (2000) Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med* **6**, 241-4.
- Carter R., Miller L.H., Renner J., Kaushal D.C., Kumar N., Graves P.M., Grotendorst C.A., Gwadz R.W., French C. & Wirth D. (1984) Target antigens in malaria transmission blocking immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **307**, 201-13.
- Carter R. & Nijhout M.M. (1977) Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. *Science* **195**, 407-9.
- Charoenvit Y., Fallarme V., Rogers W.O., Sacci J.B., Jr., Kaur M., Aguiar J.C., Yuan L.F., Corradin G., Andersen E., Wikel B., Houghten R.A., Oloo A., De la Vega P. & Hoffman S.L. (1997) Development of two monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 and mapping of B-cell epitopes. *Infect Immun* **65**, 3430-7.
- Chen X.G., Marinotti O., Whitman L., Jasinskiene N., James A.A. & Romans P. (2007) The *Anopheles gambiae* vitellogenin gene (VGT2) promoter directs persistent accumulation of a reporter gene product in transgenic *Anopheles stephensi* following multiple bloodmeals. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 1118-24.
- Chima R.I., Goodman C.A. & Mills A. (2003) The economic impact of malaria in Africa: a critical review of the evidence. *Health Policy* **63**, 17-36.
- Christophides G.K., Zdobnov E., Barillas-Mury C., Birney E., Blandin S., Blass C., Brey P.T., Collins F.H., Danielli A., Dimopoulos G., Hetru C., Hoa N.T., Hoffmann J.A., Kanzok S.M., Letunic I., Levashina E.A., Loukeris T.G., Lycett G., Meister S., Michel K., Moita L.F., Muller H.M., Osta M.A., Paskewitz S.M., Reichhart J.M., Rzhetsky A., Troxler L., Vernick K.D., Vlachou D., Volz J., von Mering C., Xu J., Zheng L., Bork P. & Kafatos F.C. (2002) Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 159-65.
- Churcher T.S., Blagborough A.M., Delves M., Ramakrishnan C., Kapulu M.C., Williams A.R., Biswas S., Da D.F., Cohuet A. & Sinden R.E. (2012) Measuring the blockade of malaria transmission--an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int J Parasitol* **42**, 1037-44.

- Churcher T.S., Bousema T., Walker M., Drakeley C., Schneider P., Ouedraogo A.L. & Basanez M.G. (2013) Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife* **2**, e00626.
- Churcher T.S., Dawes E.J., Sinden R.E., Christophides G.K., Koella J.C. & Basanez M.G. (2010) Population biology of malaria within the mosquito: density-dependent processes and potential implications for transmission-blocking interventions. *Malar J* **9**, 311.
- Cirimotich C.M., Clayton A.M. & Dimopoulos G. (2011a) Low- and high-tech approaches to control *Plasmodium* parasite transmission by anopheles mosquitoes. *J Trop Med* **2011**, 891342.
- Cirimotich C.M., Dong Y., Clayton A.M., Sandiford S.L., Souza-Neto J.A., Mulenga M. & Dimopoulos G. (2011b) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* **332**, 855-8.
- Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R., Torre A., Coulibaly M.B. & Besansky N.J. (2013) *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* **3619**, 246-74.
- 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**, 1285-9.
- 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* **234**, 607-10.
- Contamin H., Fandeur T., Rogier C., Bonnefoy S., Konate L., Trape J.F. & Mercereau-Puijalon O. (1996) Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg* **54**, 632-43.
- Da D.F., Diabaté A., Mouline K., Lefèvre T., Awono-Ambene H.P., J.B. O. & Dabiré K.R. (2013a) *Anopheles rufipes* remains a Potential Malaria Vector after the First Detection of Infected Specimens in 1960 in Burkina Faso. *Journal of Infectious Diseases & Therapy* **1**.
- 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. (2013b) Anti-Pfs25 human plasma reduces transmission of *Plasmodium falciparum* isolates that have diverse genetic backgrounds. *Infect Immun* **81**, 1984-9.
- Dabire R.K., Namountougou M., Sawadogo S.P., Yaro L.B., Toe H.K., Ouari A., Gouagna L.C., Simard F., Chandre F., Baldet T., Bass C. & Diabate A. (2012) Population dynamics of *Anopheles gambiae s.l.* in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasit Vectors* **5**, 127.
- Diabate A., Brengues C., Baldet T., Dabire K.R., Hougard J.M., Akogbeto M., Kengne P., Simard F., Guillet P., Hemingway J. & Chandre F. (2004) The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* **9**, 1267-73.
- Dinglasan R.R., Alaganan A., Ghosh A.K., Saito A., van Kuppevelt T.H. & Jacobs-Lorena M. (2007a) *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15882-7.
- Dinglasan R.R. & Jacobs-Lorena M. (2008) Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends Parasitol* **24**, 364-70.
- Dinglasan R.R., Kalume D.E., Kanzok S.M., Ghosh A.K., Muratova O., Pandey A. & Jacobs-Lorena M. (2007b) Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13461-6.
- Dokomajilar C., Lankoande Z.M., Dorsey G., Zongo I., Ouedraogo J.B. & Rosenthal P.J. (2006) Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 162-5.
- Dondorp A.M., Yeung S., White L., Nguon C., Day N.P., Socheat D. & von Seidlein L. (2010) Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* **8**, 272-80.
- Dong Y., Aguilar R., Xi Z., Warr E., Mongin E. & Dimopoulos G. (2006) *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* **2**, e52.

- Dong Y., Manfredini F. & Dimopoulos G. (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* **5**, e1000423.
- Dowling M.A. & Shute G.T. (1966) A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ* **34**, 249-67.
- Drakeley C., Sutherland C., Bousema J.T., Sauerwein R.W. & Targett G.A. (2006a) The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol* **22**, 424-30.
- Drakeley C.J., Bousema J.T., Akim N.I., Teelen K., Roeffen W., Lensen A.H., Bolmer M., Eling W. & Sauerwein R.W. (2006b) Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol* **28**, 185-90.
- Drakeley C.J., Mulder L., Tchuinkam T., Gupta S., Sauerwein R. & Targett G.A. (1998) Transmission-blocking effects of sera from malaria-exposed individuals on *Plasmodium falciparum* isolates from gametocyte carriers. *Parasitology* **116** (Pt 5), 417-23.
- Drakeley C.J., Secka I., Correa S., Greenwood B.M. & Targett G.A. (1999) Host haematological factors influencing the transmission of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes. *Trop Med Int Health* **4**, 131-8.
- Draper S.J., Biswas S., Spencer A.J., Remarque E.J., Capone S., Naddeo M., Dicks M.D., Faber B.W., de Cassan S.C., Folgori A., Nicosia A., Gilbert S.C. & Hill A.V. (2010) Enhancing blood-stage malaria subunit vaccine immunogenicity in rhesus macaques by combining adenovirus, poxvirus, and protein-in-adjuvant vaccines. *J Immunol* **185**, 7583-95.
- Draper S.J., Goodman A.L., Biswas S., Forbes E.K., Moore A.C., Gilbert S.C. & Hill A.V. (2009) Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated multistage protection against malaria. *Cell Host Microbe* **5**, 95-105.
- Draper S.J., Moore A.C., Goodman A.L., Long C.A., Holder A.A., Gilbert S.C., Hill F. & Hill A.V. (2008) Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat Med* **14**, 819-21.
- Dyer M. & Day K.P. (2000) Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **16**, 102-7.
- Eksi S., Czesny B., van Gemert G.J., Sauerwein R.W., Eling W. & Williamson K.C. (2006) Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol* **61**, 991-8.
- Escalante A.A., Lal A.A. & Ayala F.J. (1998) Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics* **149**, 189-202.
- Fabre R., Berry A., Morassin B. & Magnaval J.F. (2004) Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology* **128**, 15-21.
- Fang W., Vega-Rodriguez J., Ghosh A.K., Jacobs-Lorena M., Kang A. & St Leger R.J. (2011) Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science* **331**, 1074-7.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J.B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G. & Simard F. (2003) [Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data]. *Med Trop (Mars)* **63**, 247-53.
- Fontenille D. & Simard F. (2004) Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**, 357-75.
- Gass R.F. & Yeates R.A. (1979a) In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Trop* **36**, 243-52.
- Gazin P., Robert V. & Carnevale P. (1985) [Longitudinal study of malaria indices in 2 villages of the Bobo Dioulasso region (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop* **65 Suppl 2**, 181-6.
- Gillies M.T. & Coetzee M.C. (1987) A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *South African Institute for Medical Research, Johannesburg* n°55, 143p.
- Gillies M.T. & De Meillon B. (1968) The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *South African Institute for Medical Research, Johannesburg* n°55, 143p.

- Goodman A.L., Blagborough A.M., Biswas S., Wu Y., Hill A.V., Sinden R.E. & Draper S.J. (2011) A viral vectored prime-boost immunization regime targeting the malaria Pfs25 antigen induces transmission-blocking activity. *PLoS One* **6**, e29428.
- Goodman A.L., Epp C., Moss D., Holder A.A., Wilson J.M., Gao G.P., Long C.A., Remarque E.J., Thomas A.W., Ammendola V., Colloca S., Dicks M.D., Biswas S., Seibel D., van Duivenvoorde L.M., Gilbert S.C., Hill A.V. & Draper S.J. (2010) New candidate vaccines against blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1. *Infect Immun* **78**, 4601-12.
- Gouagna L.C., Bancone G., Yao F., Yameogo B., Dabire K.R., Costantini C., Simpore J., Ouedraogo J.B. & Modiano D. (2010) Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet* **42**, 328-31.
- Gouagna L.C., Bonnet S., Gounoue R., Tchuinkam T., Safeukui I., Verhave J.P., Eling W. & Boudin C. (1999) The use of anti-Pfs 25 monoclonal antibody for early determination of *Plasmodium falciparum* oocyst infections in *Anopheles gambiae*: comparison with the current technique of direct microscopic diagnosis. *Exp Parasitol* **92**, 209-14.
- Gouagna L.C., Bonnet S., Gounoue R., Verhave J.P., Eling W., Sauerwein R. & Boudin C. (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**, 937-48.
- Gouagna L.C., Mulder B., Noubissi E., Tchuinkam T., Verhave J.P. & Boudin C. (1998) The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health* **3**, 21-8.
- Gouagna L.C., van der Kolk M., Roeffen W., Verhave J.P., Eling W., Sauerwein R. & Boudin C. (2007) Role of heat-labile serum factor or host complement in the inhibition of *Plasmodium falciparum* sporogonic stages in *Anopheles stephensi* by gametocyte carriers' serological factors. *Parasitology* **134**, 1315-27.
- Greenwood B.M. (2008) Control to elimination: implications for malaria research. *Trends Parasitol* **24**, 449-54.
- Greenwood B.M., Bojang K., Whitty C.J. & Targett G.A. (2005) Malaria. *Lancet* **365**, 1487-98.
- Gwadz R.W. (1976) Successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* **193**, 1150-1.
- Hafalla J.C., Santiago M.L., Pasay M.C., Ramirez B.L., Gozar M.M., Saul A. & Kaslow D.C. (1997) Minimal variation in the Pfs28 ookinete antigen from Philippine field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **87**, 97-9.
- Haji H., Smith T., Charlwood J.D. & Meuwissen J.H. (1996) Absence of relationships between selected human factors and natural infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes in an area of high transmission. *Parasitology* **113** (Pt 5), 425-31.
- Harbach R.E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* **94**, 537-53.
- 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.
- Helinski M.E., Hassan M.M., El-Motasim W.M., Malcolm C.A., Knols B.G. & El-Sayed B. (2008) Towards a sterile insect technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: irradiation, transportation, and field cage experimentation. *Malar J* **7**, 65.
- Helinski M.E., Parker A.G. & Knols B.G. (2006) Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. *Malar J* **5**, 41.
- Hill A.V. (2006) Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* **6**, 21-32.
- Hill A.V. (2011) Vaccines against malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 2806-14.
- Hughes G.L., Koga R., Xue P., Fukatsu T. & Rasgon J.L. (2011) Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog* **7**, e1002043.
- 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**, 452-5.

- Janse C.J., Franke-Fayard B., Mair G.R., Ramesar J., Thiel C., Engelmann S., Matuschewski K., van Gemert G.J., Sauerwein R.W. & Waters A.P. (2006) High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol* **145**, 60-70.
- Janse C.J., Mons B., Rouwenhorst R.J., Van der Klooster P.F., Overdulve J.P. & Van der Kaay H.J. (1985) In vitro formation of ookinetes and functional maturity of *Plasmodium berghei* gametocytes. *Parasitology* **91** (Pt 1), 19-29.
- Kadota K., Ishino T., Matsuyama T., Chinzei Y. & Yuda M. (2004) Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16310-5.
- Kariu T., Ishino T., Yano K., Chinzei Y. & Yuda M. (2006) CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol* **59**, 1369-79.
- Kaslow D.C. (1997) Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* **27**, 183-9.
- Kaslow D.C., Quakyi I.A., Syin C., Raum M.G., Keister D.B., Coligan J.E., McCutchan T.F. & Miller L.H. (1988) A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74-6.
- Kaslow D.C., Syin C., McCutchan T.F. & Miller L.H. (1989b) Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gallinaceum* reveal six conserved regions. *Mol Biochem Parasitol* **33**, 283-7.
- Khairnar K., Martin D., Lau R., Ralevski F. & Pillai D.R. (2009) Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium spp*: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malar J* **8**, 284.
- Kilama W.L. & Craig G.B., Jr. (1969) Monofactorial inheritance of susceptibility to *Plasmodium Gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Ann Trop Med Parasitol* **63**, 419-32.
- Kiszewski A.E. (2011) Blocking *Plasmodium falciparum* Malaria Transmission with Drugs: The Gametocytocidal and Sporontocidal Properties of Current and Prospective Antimalarials. *pharmaceuticals* **4**, 44-68.
- Kocken C.H., Jansen J., Kaan A.M., Beckers P.J., Ponnudurai T., Kaslow D.C., Konings R.N. & Schoenmakers J.G. (1993) Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 59-68.
- Konate L., Zwetyenga J., Rogier C., Bischoff E., Fontenille D., Tall A., Spiegel A., Trape J.F. & Mercereau-Puijalon O. (1999) Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93 Suppl 1**, 21-8.
- Kumar N. & Carter R. (1984) Biosynthesis of the target antigens of antibodies blocking transmission of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **13**, 333-42.
- 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.
- Lavazec C., Boudin C., Lacroix R., Bonnet S., Diop A., Thiberge S., Boisson B., Tahar R. & Bourgoignie C. (2007) Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine. *Infect Immun* **75**, 1635-42.
- Lensen A., Bril A., van de Vegte M., van Gemert G.J., Eling W. & Sauerwein R. (1999) *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. *Exp Parasitol* **91**, 101-3.
- Macdonald G., C.M.G., M.D., F.R.C.P., D.P.H & D.T.M. (1956) Epidemiological basis of malaria control. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **15**, 613 - 26.
- Mack S.R., Samuels S. & Vanderberg J.P. (1979a) Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 3. Carbohydrates. *J Parasitol* **65**, 217-21.
- Mack S.R., Samuels S. & Vanderberg J.P. (1979b) Hemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 2. Free amino acids. *J Parasitol* **65**, 130-6.
- Mahajan R.C., Farooq U., Dubey M.L. & Malla N. (2005) Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens. *Indian J Pathol Microbiol* **48**, 429-38.

- Manske M., Miotto O., Campino S., Auburn S., Almagro-Garcia J., Maslen G., O'Brien J., Djimde A., Doumbo O., Zongo I., Ouedraogo J.B., Michon P., Mueller I., Siba P., Nzila A., Borrmann S., Kiara S.M., Marsh K., Jiang H., Su X.Z., Amaratunga C., Fairhurst R., Socheat D., Nosten F., Imwong M., White N.J., Sanders M., Anastasi E., Alcock D., Drury E., Oyola S., Quail M.A., Turner D.J., Ruano-Rubio V., Jyothi D., Amenga-Etego L., Hubbart C., Jeffreys A., Rowlands K., Sutherland C., Roper C., Mangano V., Modiano D., Tan J.C., Ferdig M.T., Amambua-Ngwa A., Conway D.J., Takala-Harrison S., Plowe C.V., Rayner J.C., Rockett K.A., Clark T.G., Newbold C.I., Berriman M., MacInnis B. & Kwiatkowski D.P. (2012) Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature* **487**, 375-9.
- Mathias D.K., Plieskatt J.L., Armistead J.S., Bethony J.M., Abdul-Majid K.B., McMillan A., Angov E., Aryee M.J., Zhan B., Gillespie P., Keegan B., Jariwala A.R., Rezende W., Bottazzi M.E., Scorpio D.G., Hotez P.J. & Dinglasan R.R. (2012) Expression, immunogenicity, histopathology, and potency of a mosquito-based malaria transmission-blocking recombinant vaccine. *Infect Immun* **80**, 1606-14.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. (1997) Mixed-species *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol* **83**, 593-600.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. (2005a) An integrated model of *Plasmodium falciparum* dynamics. *J Theor Biol* **232**, 411-26.
- McKenzie F.E., Prudhomme W.A., Magill A.J., Forney J.R., Permpantich B., Lucas C., Gasser R.A., Jr. & Wongsrichanalai C. (2005b) White blood cell counts and malaria. *J Infect Dis* **192**, 323-30.
- Medley G.F., Sinden R.E., Fleck S., Billingsley P.F., Tirawanchai N. & Rodriguez M.H. (1993) Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector. *Parasitology* **106** (Pt 5), 441-9.
- Mendes A.M., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Cohuet A., Fontenille D., Kafatos F.C., Christophides G.K., Morlais I. & Vlachou D. (2011) Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **79**, 4708-15.
- Mendes A.M., Schlegelmilch T., Cohuet A., Awono-Ambene P., De Iorio M., Fontenille D., Morlais I., Christophides G.K., Kafatos F.C. & Vlachou D. (2008) Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog* **4**, e1000069.
- Michel K., Budd A., Pinto S., Gibson T.J. & Kafatos F.C. (2005) *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* **6**, 891-7.
- Ministère-Santé (2012) Bulletin d'épidémiologie et d'information sanitaire. http://www.sante.gov.bf/phocadownload/Publications_statistiques/bull.
- Mitri C., Thiery I., Bourgoïn C. & Paul R.E. (2009) Density-dependent impact of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. *Proc Biol Sci* **276**, 3721-6.
- Mlambo G. & Kumar N. (2008a) Transgenic rodent *Plasmodium berghei* parasites as tools for assessment of functional immunogenicity and optimization of human malaria vaccines. *Eukaryot Cell* **7**, 1875-9.
- Moody A. (2002a) Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* **15**, 66-78.
- Moody A.H. & Chiodini P.L. (2002b) Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br J Biomed Sci* **59**, 228-31.
- Mulder B., Roeffen W., Sauerwein R., Tchuinkam T., Boudin C. & Verhave J.P. (1996) Anti-Pfs25 monoclonal antibody 32F81 blocks transmission from *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**, 195.
- Mulder B., Tchuinkam T., Dechering K., Verhave J.P., Carnevale P., Meuwissen J.H. & Robert V. (1994) Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**, 121-5.
- Munhenga G., Brooke B.D., Chirwa T.F., Hunt R.H., Coetzee M., Govender D. & Koekemoer L.L. (2011) Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa. *Parasit Vectors* **4**, 208.
- Namountougou M., Simard F., Baldet T., Diabate A., Ouedraogo J.B., Martin T. & Dabire R.K. (2012) Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso, West Africa. *PLoS One* **7**, e48412.

- Nassir E., Abdel-Muhsin A.M., Suliaman S., Kenyon F., Kheir A., Geha H., Ferguson H.M., Walliker D. & Babiker H.A. (2005) Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol* **35**, 49-55.
- Niederwieser I., Felger I. & Beck H.P. (2001) Limited polymorphism in *Plasmodium falciparum* sexual-stage antigens. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 9-11.
- Nsango S.E., Abate L., Thoma M., Pompon J., Fraiture M., Rademacher A., Berry A., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A. & Morlais I. (2012) Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *Int J Parasitol* **42**, 589-95.
- Nwakanma D., Kheir A., Sowa M., Dunyo S., Jawara M., Pinder M., Milligan P., Walliker D. & Babiker H.A. (2008) High gametocyte complexity and mosquito infectivity of *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Int J Parasitol* **38**, 219-27.
- Osta M.A., Christophides G.K., Vlachou D. & Kafatos F.C. (2004) Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol* **207**, 2551-63.
- Outchkourov N.S., Roeffen W., Kaan A., Jansen J., Luty A., Schuiffel D., van Gemert G.J., van de Vegte-Bolmer M., Sauerwein R.W. & Stunnenberg H.G. (2008) Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4301-5.
- Paskewitz S.M., Brown M.R., Lea A.O. & Collins F.H. (1988) Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*. *J Parasitol* **74**, 432-9.
- Paskewitz S.M. & Riehle M. (1998) A factor preventing melanization of sephadex CM C-25 beads in *Plasmodium*-susceptible and refractory *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* **90**, 34-41.
- Paul R.E., Brey P.T. & Robert V. (2002) *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends Parasitol* **18**, 32-8.
- 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), 115-20.
- Plowe C.V. & Wellems T.E. (1995) Molecular approaches to the spreading problem of drug resistant malaria. *Adv Exp Med Biol* **390**, 197-209.
- Pollitt L.C., Churcher T.S., Emma J.D., Khan S.M., Sajid M., Basanez M., Colegrave N. & Reece S.E. (2013) Costs of crowding for the transmission of malaria parasites. *Evolutionary Applications*.
- Ponnudurai T., Lensen A.H., Van Gemert G.J., Bensink M.P., Bolmer M. & Meuwissen J.H. (1989) Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* **98** Pt 2, 165-73.
- Ponsa N., Sattabongkot J., Kittayapong P., Eikarat N. & Coleman R.E. (2003) Transmission-blocking activity of tafenoquine (WR-238605) and artelinic acid against naturally circulating strains of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 542-7.
- Poudel S.S., Newman R.A. & Vaughan J.A. (2008) Rodent *Plasmodium*: population dynamics of early sporogony within *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol* **94**, 999-1008.
- Pukrittayakamee S., Chotivanich K., Chantra A., Clemens R., Looareesuwan S. & White N.J. (2004) Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in *falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1329-34.
- Ramjanee S., Robertson J.S., Franke-Fayard B., Sinha R., Waters A.P., Janse C.J., Wu Y., Blagborough A.M., Saul A. & Sinden R.E. (2007) The use of transgenic *Plasmodium berghei* expressing the *Plasmodium vivax* antigen P25 to determine the transmission-blocking activity of sera from malaria vaccine trials. *Vaccine* **25**, 886-94.
- Ranawaka G.R., Fleck S.L., Blanco A.R. & Sinden R.E. (1994b) Characterization of the modes of action of anti-Pbs21 malaria transmission-blocking immunity: ookinete to oocyst differentiation in vivo. *Parasitology* **109** (Pt 4), 403-11.
- Razakandrainibe F.G., Durand P., Koella J.C., De Meeus T., Rousset F., Ayala F.J. & Renaud F. (2005) "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17388-93.

- Reece S.E., Drew D.R. & Gardner A. (2008) Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature* **453**, 609-14.
- Renner J., Graves P.M., Carter R., Williams J.L. & Burkot T.R. (1983) Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* **158**, 976-81.
- Richman A.M., Bulet P., Hetru C., Barillas-Mury C., Hoffmann J.A. & Kafalos F.C. (1996) Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol Biol* **5**, 203-10.
- Riehle M.M., Markianos K., Niare O., Xu J., Li J., Toure A.M., Podiougou B., Oduol F., Diawara S., Diallo M., Coulibaly B., Ouatarra A., Kruglyak L., Traore S.F. & Vernick K.D. (2006) Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science* **312**, 577-9.
- Robert V. & Boudin C. (2003) [Biology of man-mosquito *Plasmodium* transmission]. *Bull Soc Pathol Exot* **96**, 6-20.
- Robert V., Gazin P., Boudin C., Molez J.F., Ouedraogo V. & Carnevale P. (1985) [The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop* **65 Suppl 2**, 201-14.
- Robert V., Le Goff G., Essong J., Tchuinkam T., Faas B. & Verhave J.P. (1995) Detection of *falciparum* malarial forms in naturally infected anophelines in Cameroon using a fluorescent anti-25-kD monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* **52**, 366-9.
- Robert V., le Goff G., Gouagna L.C., Sinden M., Kieboom J., Kroneman R. & Verhave J.P. (1998) Kinetics and efficiency of *Plasmodium falciparum* development in the midguts of *Anopheles gambiae*, *An. funestus* and *An. nili*. *Ann Trop Med Parasitol* **92**, 115-8.
- Robert V., Tchuinkam T., Mulder B., Bodo J.M., Verhave J.P., Carnevale P. & Nagel R.L. (1996) Effect of the sickle cell trait status of gametocyte carriers of *Plasmodium falciparum* on infectivity to anophelines. *Am J Trop Med Hyg* **54**, 111-3.
- Rodriguez Mdel C., Martinez-Barnette J., Alvarado-Delgado A., Batista C., Argotte-Ramos R.S., Hernandez-Martinez S., Gonzalez Ceron L., Torres J.A., Margos G. & Rodriguez M.H. (2007) The surface protein Pvs25 of *Plasmodium vivax* ookinetes interacts with calreticulin on the midgut apical surface of the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Mol Biochem Parasitol* **153**, 167-77.
- Sachs J. & Malaney P. (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-5.
- 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.
- Saul A. (2007) Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 476-81.
- Saul A. (2008) Efficacy model for mosquito stage transmission blocking vaccines for malaria. *Parasitology* **135**, 1497-506.
- Scherf A., Carter R., Petersen C., Alano P., Nelson R., Aikawa M., Mattei D., Pereira da Silva L. & Leech J. (1992) Gene inactivation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. *Embo J* **11**, 2293-301.
- Sheehy S.H., Duncan C.J., Elias S.C., Biswas S., Collins K.A., O'Hara G.A., Halstead F.D., Ewer K.J., Mahungu T., Spencer A.J., Miura K., Poulton I.D., Dicks M.D., Edwards N.J., Berrie E., Moyle S., Colloca S., Cortese R., Gantlett K., Long C.A., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Doherty T., Nicosia A., Hill A.V. & Draper S.J. (2012) Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PLoS One* **7**, e31208.
- Sheehy S.H., Duncan C.J., Elias S.C., Collins K.A., Ewer K.J., Spencer A.J., Williams A.R., Halstead F.D., Moretz S.E., Miura K., Epp C., Dicks M.D., Poulton I.D., Lawrie A.M., Berrie E., Moyle S., Long C.A., Colloca S., Cortese R., Gilbert S.C., Nicosia A., Hill A.V. & Draper S.J. (2011) Phase Ia clinical evaluation of the *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen MSP1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *Mol Ther* **19**, 2269-76.
- Shi Y.P., Alpers M.P., Pova M.M. & Lal A.A. (1992) Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **50**, 179-80.

- Sinden R.E. (1983) The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology* **86** (Pt 4), 7-28.
- Sinden R.E. (1998) Malaria transfection: a new tool to study molecular function. *Parasitol Today* **14**, 88-90.
- Sinden R.E. (1999a) Gametogenesis in *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot* **92**, 437.
- Sinden R.E. (1999b) *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia* **41**, 139-48.
- Sinden R.E. (2004a) A proteomic analysis of malaria biology: integration of old literature and new technologies. *Int J Parasitol* **34**, 1441-50.
- Sinden R.E. (2010a) A biologist's perspective on malaria vaccine development. *Hum Vaccin* **6**, 3-11.
- Sinden R.E., Blagborough A.M., Churcher T., Ramakrishnan C., Biswas S. & Delves M.J. (2012b) The design and interpretation of laboratory assays measuring mosquito transmission of *Plasmodium*. *Trends Parasitol* **28**, 457-65.
- Sinden R.E., Butcher G.A. & Beetsma A.L. (2002) Maintenance of the *Plasmodium berghei* life cycle. *Methods Mol Med* **72**, 25-40.
- Sinden R.E., Butcher G.A., Billker O. & Fleck S.L. (1996) Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol* **38**, 53-117.
- Sinden R.E. & Canning E.U. (1972) The ultrastructure of *Plasmodium berghei* ookinetes in the midgut wall of *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **66**, 6.
- Sinden R.E., Carter R., Drakeley C. & Leroy D. (2012a) The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar J* **11**, 70.
- Sinden R.E. & Croll N.A. (1975) Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology* **70**, 53-65.
- Sinden R.E., Dawes E.J., Alavi Y., Waldock J., Finney O., Mendoza J., Butcher G.A., Andrews L., Hill A.V., Gilbert S.C. & Basanez M.G. (2007a) Progression of *Plasmodium berghei* through *Anopheles stephensi* is density-dependent. *PLoS Pathog* **3**, e195.
- Sinden R.E. & Garnham P.C. (1973) A comparative study on the ultrastructure of *Plasmodium* sporozoites within the oocyst and salivary glands, with particular reference to the incidence of the micropore. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **67**, 631-7.
- Sinden R.E., Hartley R.H. & Winger L. (1985b) The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology* **91** (Pt 2), 227-44.
- Smith T., Felger I., Kitua A., Tanner M. & Beck H.P. (1999) Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93** Suppl 1, 35-9.
- Soulama I., Sawadogo M., Nebie I., Diarra A., Tiono A.B., Konate A. & Sirima S.B. (2006) [Genetic diversity of *P. falciparum* and pathogenesis of the severe malarial anaemia in children under 5 years old in the province of Boulgou, Burkina Faso]. *Bull Soc Pathol Exot* **99**, 166-70.
- Sumitani M., Kasashima K., Yamamoto D.S., Yagi K., Yuda M., Matsuoka H. & Yoshida S. (2013) Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an antisporeozoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol* **22**, 41-51.
- Thera M.A., Doumbo O.K., Coulibaly D., Laurens M.B., Ouattara A., Kone A.K., Guindo A.B., Traore K., Traore I., Kouriba B., Diallo D.A., Diarra I., Daou M., Dolo A., Tolo Y., Sissoko M.S., Niangaly A., Sissoko M., Takala-Harrison S., Lyke K.E., Wu Y., Blackwelder W.C., Godeaux O., Vekemans J., Dubois M.C., Ballou W.R., Cohen J., Thompson D., Dube T., Soisson L., Diggs C.L., House B., Lanar D.E., Dutta S., Heppner D.G., Jr. & Plowe C.V. (2011) A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med* **365**, 1004-13.
- Tirawanchai N., Winger L.A., Nicholas J. & Sinden R.E. (1991) Analysis of immunity induced by the affinity-purified 21-kilodalton zygote-ookinete surface antigen of *Plasmodium berghei*. *Infect Immun* **59**, 36-44.
- Tomas A.M., Margos G., Dimopoulos G., van Lin L.H., de Koning-Ward T.F., Sinha R., Lupetti P., Beetsma A.L., Rodriguez M.C., Karras M., Hager A., Mendoza J., Butcher G.A., Kafatos F., Janse C.J., Waters A.P. & Sinden R.E. (2001) P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *Embo J* **20**, 3975-83.
- Tongren J.E., Zavala F., Roos D.S. & Riley E.M. (2004) Malaria vaccines: if at first you don't succeed. *Trends Parasitol* **20**, 604-10.

- Vaccines. T.m.C.G.o. (2011) A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* **8**, e1000398.
- van Dijk M.R., Janse C.J., Thompson J., Waters A.P., Braks J.A., Dodemont H.J., Stunnenberg H.G., van Gemert G.J., Sauerwein R.W. & Eling W. (2001) A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**, 153-64.
- van Dijk M.R., van Schaijk B.C., Khan S.M., van Dooren M.W., Ramesar J., Kaczanowski S., van Gemert G.J., Kroeze H., Stunnenberg H.G., Eling W.M., Sauerwein R.W., Waters A.P. & Janse C.J. (2010) Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog* **6**, e1000853.
- Vaughan J.A., Noden B.H. & Beier J.C. (1992) Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J Parasitol* **78**, 716-24.
- Vaughan J.A., Noden B.H. & Beier J.C. (1994) Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **51**, 233-43.
- Vermeulen A.N., Ponnudurai T., Beckers P.J., Verhave J.P., Smits M.A. & Meuwissen J.H. (1985a) Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med* **162**, 1460-76.
- Vernick K.D., Fujioka H., Seeley D.C., Tandler B., Aikawa M. & Miller L.H. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* **80**, 583-95.
- Vlachou D., Schlegelmilch T., Christophides G.K. & Kafatos F.C. (2005) Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Curr Biol* **15**, 1185-95.
- Vlachou D., Schlegelmilch T., Runn E., Mendes A. & Kafatos F.C. (2006) The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 384-91.
- von Seidlein L., Drakeley C., Greenwood B., Walraven G. & Targett G. (2001) Risk factors for gametocyte carriage in Gambian children. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 523-7.
- Vreysen M.J., Saleh K.M., Ali M.Y., Abdulla A.M., Zhu Z.R., Juma K.G., Dyck V.A., Msangi A.R., Mkonyi P.A. & Feldmann H.U. (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol* **93**, 123-35.
- Warburg A. & Miller L.H. (1991) Critical stages in the development of *Plasmodium* in mosquitoes. *Parasitol Today* **7**, 179-81.
- Wells T.N., Alonso P.L. & Gutteridge W.E. (2009) New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 879-91.
- White N.J. (2008) The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malar J* **7** Suppl 1, S8.
- WHO (2000) Malaria transmission blocking vaccines: an ideal public good. *World Health Organization 2000 TDR/RBM/MAL/VAC/2000.1*.
- WHO (2002) Report of a WHO consultation, Geneva, Switzerland, 3-5 December 2001. *Geneva, World Health Organization, document WHO/CDS/RBM/2002.39*.
- WHO (2012) WHO Global Malaria Program: World Malaria Report 2012 *WHO, 2012*.
- Williamson K.C. & Kaslow D.C. (1993) Strain polymorphism of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen Pfs230. *Mol Biochem Parasitol* **62**, 125-7.
- Wirtz R.A., Burkot T.R., Graves P.M. & Andre R.G. (1987) Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol* **24**, 433-7.
- Wu Y., Ellis R.D., Shaffer D., Fontes E., Malkin E.M., Mahanty S., Fay M.P., Narum D., Rausch K., Miles A.P., Aebig J., Orcutt A., Muratova O., Song G., Lambert L., Zhu D., Miura K., Long C., Saul A., Miller L.H. & Durbin A.P. (2008) Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* **3**, e2636.
- Yeates R.A. & Steiger S. (1981) Ultrastructural damage of in vitro cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) by purified proteinases of susceptible *Aedes aegypti* (L.). *Z Parasitenkd* **66**, 93-7.
- Yoshida S., Matsuoka H., Luo E., Iwai K., Arai M., Sinden R.E. & Ishii A. (1999) A single-chain antibody fragment specific for the *Plasmodium berghei* ookinete protein Pbs21 confers transmission blockade in the mosquito midgut. *Mol Biochem Parasitol* **104**, 195-204.
- Yoshida S. & Watanabe H. (2006) Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* **15**, 403-10.

Annexe

Annexe 1

Fiche d'information et de consentement pour les personnes participant à la recherche

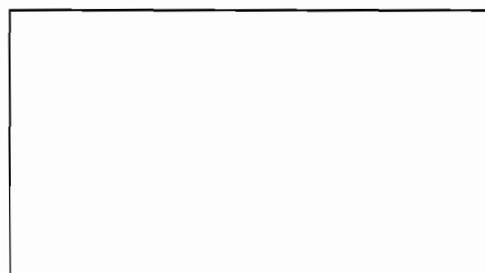
Ce document contient :

- **Une fiche d'information** destinée à expliquer les objectifs de l'étude, à donner des détails sur le protocole employé et à informer les volontaires de leur engagement dans l'étude.
- **Un accord de consentement éclairé individuel** à signer par les parents ou le tuteur légal qui accepte que son enfant participe à l'étude.

Nous vous prions de prendre connaissance du contenu de la présente fiche d'information, ainsi que la fiche de consentement ci-jointe. La fiche d'information explique vos droits et nos responsabilités dans le cadre de cette étude. La fiche de consentement sollicite votre participation à la réalisation de cette étude. Si vous avez une quelconque question relative au contenu de ce document, n'hésitez pas à vous adresser au responsable de l'équipe: Professeur Jean-Bosco Ouédraogo. Avant toute décision, il est important pour vous de comprendre pourquoi ce travail de recherche est mené et ce qu'il impliquera. Votre accord sera confirmé par la signature du formulaire de consentement ci-joint, pour indiquer que vous avez bien compris le but et contraintes de l'étude.

Nous vous faisons savoir que cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique du Centre Muraz, qui est un comité dont la responsabilité est de s'assurer que les droits de l'homme et la dignité humaine sont entièrement respectés pendant la conduite de la recherche et que les intérêts et le bien-être des participants ont la priorité au-dessus de l'intérêt scientifique.

Tampon du Coordinateur du Project



Fiche d'Information

Titre de l'étude: Bloquer la transmission du paludisme grâce aux vaccins, les médicaments et la réponse immunitaire des moustiques : déterminer des cibles et leur efficacité

Investigateurs responsables de l'étude au Burkina Faso: Dr George Christophides (Imperial College), Grande Bretagne (Principal Investigateur) ; Pr Jean Bosco Ouedraogo (IRSS) ; Dr. Anna Cohuet (IRD/IRSS) et Dr Louis-Clément Gouagna (IRD).

Sources de financement: Union Européenne

Les objectifs

Nous faisons des recherches sur le paludisme. Cette maladie est très fréquente dans cette zone. Les parasites qui sont responsables du paludisme sont transmis par les moustiques lorsqu'ils piquent la nuit. Si un moustique pique une personne qui a les parasites dans son sang, il va s'infecter et après plusieurs jours, il pourra aller transmettre des parasites à une nouvelle personne. Les parasites qui peuvent infecter les moustiques s'appellent les gamétocytes. Nous travaillons sur les moustiques et nous voulons mieux comprendre comment les parasites se développent chez les moustiques. Nous voulons voir s'il est possible d'arrêter le développement des parasites chez le moustique pour empêcher la maladie de se propager.

Critères d'inclusion dans l'étude

Nous allons rechercher les porteurs de gamétocytes parmi les enfants âgés de 5 à 11 ans. Les enfants de moins de 5 ans sont exclus du fait de leur vulnérabilité d'une part, et d'autre part parce qu'il est pratiquement difficile de prélever le sang de leurs veines encore petites. Cette tranche d'âge a été choisie car c'est celle qui comporte le plus de sujets infectés par les gamétocytes. Si votre enfant est malade, vous devez nous en informer car nous ne pourrions pas l'inclure dans l'enquête. Par contre votre enfant pourra bénéficier du traitement antipaludique au même titre que ceux qui participent à l'étude.

Votre décision quant à la participation de votre enfant doit être complètement volontaire. Vous devez vous assurer que la participation ou non de votre enfant est votre libre choix. Vous ne devez recevoir aucune mesure incitative pour la participation à l'enquête.

Si vous choisissez pour votre enfant de ne pas participer, il ne sera pas prélevé pour le diagnostic du paludisme. Si vous consentez qu'il soit inclus, vous avez la possibilité à tout moment de changer d'avis et d'arrêter sa participation à l'enquête. Votre enfant dans ce cas conservera ses droits de volontaire.

Protocole d'enquête parasitologique:

La sélection de ces enfants porteurs de gamétocytes sera effectuée par notre équipe avec la participation du CSPS et un représentant local du village. Nous allons venir à l'école avec l'équipe médicale de l'hôpital pour effectuer le diagnostic du paludisme aux enfants. Le diagnostic se fait par la réalisation d'une goutte épaisse. Ceci consiste à prélever 2 ou 3 gouttes de sang au bout du doigt, à les étaler sur une petite lame de verre et à les laisser sécher. De retour au laboratoire de diagnostic, la goutte épaisse est colorée et si l'enfant a des parasites dans son sang, les microscopistes pourront les voir à travers leur microscope. Nous pourrions voir 2 formes de parasites : 1) les mérozoïtes, ce sont les parasites qui peuvent donner la fièvre et il faut dans ce cas prendre un traitement, et 2) les gamétocytes, ce sont les parasites qui infectent les moustiques.

Si votre enfant est infecté par des mérozoïtes, le médecin lui donnera un traitement antipaludéen gratuitement. S'il a des gamétocytes, on vous demandera de poursuivre l'enquête. Vous devrez amener l'enfant au centre de recherche IRSS situé à Bobo Dioulasso où un prélèvement de sang sera effectué au niveau du pli du coude. La quantité de sang prélevée est équivalente à une cuillère à soupe (5 à 7 ml). Le sang sera utilisé pour nourrir des moustiques élevés dans notre laboratoire. Le but est d'examiner ces moustiques pour voir s'ils peuvent s'infecter. Donc une semaine après, les moustiques, ayant préalablement pris le sang, seront disséqués pour vérifier s'ils se sont infectés. Le fait que votre enfant possède des gamétocytes dans son sang indique qu'il est capable d'infecter des moustiques qui vont alors disséminer la maladie, mais ceci n'indique pas que votre enfant a le paludisme. Il n'aura donc pas de traitement antipaludéen si on n'a pas identifié de mérozoïtes dans son sang. Vous-même et votre enfant allez serez transportés du village jusqu'au laboratoire et vis versa.

Risques et inconvénients:

Cette étude peut comporter quelques contraintes et risques potentiels. Il est de notre devoir de vous mettre au courant et de vous faire connaître les dispositions que nous allons prendre pour minimiser ces risques.

Tout prélèvement sera effectué par un agent qualifié (technicien médical, infirmier, médecin) avec du matériel stérile et à usage unique (vaccinostyle, seringues). Au moment de la piqûre au bout du doigt, il est possible que votre enfant ressente une légère douleur, ceci ne représente aucun risque et la douleur ne dure que quelques secondes. Si votre enfant est inclus pour une ponction veineuse au niveau du bras, il pourra ressentir une gêne au point de

piqûre au moment du prélèvement. La piqûre peut provoquer un petit bleu qui disparaîtra en quelques jours. Le don de la quantité de sang demandée (correspondant à une cuillerée à café) ne présente véritablement aucun risque qui peut affecter la santé. Etant donné que tous les prélèvements seront effectués par un personnel médical qualifié et expérimenté avec du matériel stérile à usage unique, le risque de contamination est nul. Votre enfant ne sera pas exposé aux piqûres de moustiques et seul le sang prélevé sera donné aux moustiques d'élevage à travers un appareil qui permet de nourrir les moustiques.

Noter que seul le traitement contre le paludisme sera administré gratuitement à tous ceux qui porte les mérozoïtes, et ceci conformément aux directives nationales en vigueur. Votre enfant peut déclencher des effets secondaires à la prise du traitement antipaludéen. Il peut se plaindre de troubles digestifs, de réactions cutanées ou d'arythmie. Dans ce cas, vous devez aller voir le médecin de l'hôpital qui collabore dans cette enquête, il donnera un traitement approprié. Toute dépense due aux effets secondaires sera prise en charge par le projet.

Bénéfices:

Si votre enfant participe à l'étude et qu'il est infecté par le paludisme, il bénéficiera d'une prise en charge gratuite. On lui délivrera un traitement antipaludique approprié tel que recommandé par le Programme National de Lutte contre le Paludisme. S'il participe au prélèvement du sang pour les infection expérimentales, le transport aller et retour sera assuré par un chauffeur de l'institut. Aucun bénéfice direct ne sera perçu pour participation à l'enquête. Les résultats de cette étude pourront aider la communauté scientifique à mieux comprendre la transmission du paludisme chez le moustique et comment la transmission de la maladie peut être diminuée. De telles mesures pourront être appliquée dans les zones endémiques et donc dans la localité actuelle où cette étude a été conduite. Donc, les générations futures pourront bénéficier des résultats de nos recherches.

Confidentialité

Toute information médicale relative à votre enfant restera privée. Les échantillons de sang utilisés pour nourrir les moustiques resteront anonymes. Le sang prélevé ne servira en aucun cas à d'autres études ou manipulations, si des tubes ne sont pas utilisés, ils seront détruits.

Utilisation des résultats de l'étude

Les résultats de cette étude pourront être publiés dans une revue médicale. Avant que ces résultats ne soient publiquement disponibles, une équipe du projet remerciera tous ceux qui auront contribué à la bonne conduite du projet et leur informer des résultats.

Considérations financières

Votre participation à l'étude est entièrement volontaire. Par conséquent, vous ne recevrez aucune rémunération pour votre participation à l'étude. Par contre, vous n'aurez pas à payer de traitement anti-paludéen ou de consultation médicale pour le paludisme pendant la période d'étude. Les frais de transport si vous devez venir au centre de recherche vous seront remboursés.

Protection de données individuelles

La confidentialité sera respectée pour toute personne impliquée dans l'étude. Les participants à l'étude ne seront pas identifiés nommément, ni dans les rapports ni dans les publications. Tout prélèvement de sang sera étiqueté par un code spécifique et considéré par la suite comme échantillon anonyme, c'est-à-dire sans indication permettant d'établir un lien avec l'individu à partir duquel le sang a été obtenu. Des échantillons de sang ne seront pas utilisés pour des buts autres que ceux décrits dans les procédures d'étude et à la fin de cette étude de 6 mois, tout matériel restant sera détruit selon des règles de biosécurité en laboratoire.

Participation volontaire et responsabilité

La participation à cette étude est entièrement libre et volontaire. Vous avez le droit de refuser de donner votre accord de participation ou celui de votre enfant dans cette étude sans aucune conséquence ou préjudice. Par ailleurs si vous acceptez de participer à l'étude, vous devrez respecter les règles et procédures prévues dans les différents protocoles de collecte de sang ou de moustiques.

Considération de la diversité culturelle

La diversité culturelle, religieuse et linguistique sera respectée en fournissant le consentement éclairé. Ceci sera traduit en langues locales quand les personnes concernées ne peuvent pas comprendre le français. Nous respecterons toute personne ou groupe de personnes qui, pour une raison religieuse ou culturelle, ne veulent pas participer.

Signature ou empreinte du pouce

Si vous donnez votre consentement ou avalisez le consentement de votre enfant à cette étude, vous devez signer ou apposer l'empreinte de votre index sur la fiche de consentement. Ceci prouvera que vous avez très bien compris les informations et les contraintes de cette étude et que vous avez décidé volontairement et librement d'y participer.

Dignité humaine et droits de l'Homme

Nous vous informons que ce projet a été étudié et approuvé par le Comité National d'Ethique. Le Comité National d'Ethique est un Comité qui a pour tâche de s'assurer que dans ce projet la dignité et les droits de l'Homme sont respectés et que les intérêts et le bien être des volontaires ont la priorité sur l'intérêt scientifique.

Personne à contacter en cas de besoins:

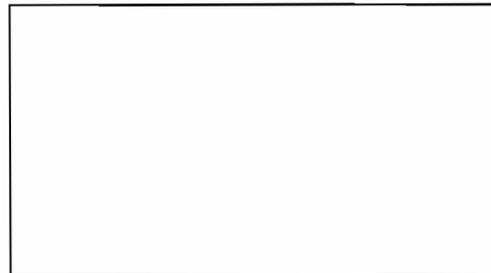
Vous pouvez contacter les responsables du programme si vous avez d'autres interrogations, dès maintenant et même après que l'étude soit commencée. Si vous voulez poser des questions plus tard, vous pouvez joindre le médecin à l'hôpital, ou le Coordinateur du Projet à l'adresse suivante :

Professeur JEAN-BOSCO OUEDRAOGO

Institut de Recherche en Science de la Santé, Bobo Dioulasso.

Tel : 20 98 18 80

Tampon du Coordinateur du Project sur la zone



Formulaire de consentement éclairé

Je, _____ (nom du parent/tuteur) représentant légal de (nom du participant) _____, certifie donner mon consentement libre et éclairé pour la participation de mon enfant au projet de recherche intitulé « Bloquer la transmission du paludisme grâce aux vaccins, les médicaments et la réponse immunitaire des moustiques : déterminer des cibles et leur efficacité ».

Je comprends que mon enfant pourra ressentir un léger inconfort au moment de la piqûre et que, bien que les risques soient mineurs, des effets secondaires au traitement anti- paludisme peuvent survenir s'il est traité. Je suis conscient qu'il n'y a pas davantage de bénéfices que ceux cités dans la première partie de ce formulaire, ni pour moi ni pour mon enfant.

J'ai lu les informations précédentes, ou elles m'ont été lues. J'ai eu l'opportunité de poser des questions à ce sujet et on a répondu de manière satisfaisante à toutes les questions que j'ai posées. J'ai obtenu le nom des Coordonnateurs du Projet à Bobo-Dioulasso et je peux le joindre si j'ai des questions supplémentaires concernant les droits de mon enfant.

Je consens volontairement à ce que mon enfant participe à cette étude et je comprends que je peux retirer mon enfant de l'étude à tout moment sans que cela n'affecte en rien ses bénéfices en temps que participant de l'étude.

Nom du participant et Signature du parent ou tuteur _____

Date _____

Jour/mois/année

Si illettré

J'ai été témoin d'une lecture précise du formulaire de consentement au parent du participant potentiel et la personne a eu l'opportunité de poser des questions. Je confirme que la personne a donné librement son consentement.

Nom du témoin et Signature du témoin _____ **ET Empreinte du pouce du parent**

Date _____

Jour/mois/année

Déclaration de l'investigateur : Je confirme que la personne a donné librement son consentement.

Noms _____ **Signature** _____

Date _____

Annexe 2 :

Protocole d'extraction de l'ADN sur oocyste (Kit Qiagen : Spin –Column)

Après isolement individuel d'oocystes de *P. falciparum*, ils sont conservés dans les tubes Eppendorf de 0,5ml à -20°C.

1. Dans chaque tube de type Eppendorf 0,5 ml, ajouter 180 µl de Buffer ALT + 20µl de proteinase K ;
2. Vortexer le mélange et incuber à 56°C pour une lyse complète pendant 1-3 heures dans un thermocycler, les échantillons peuvent aussi être lysés pendant toute la nuit ;
3. Vortexer 15s ;
4. Ajouter 200 µl de Buffer AL + 200 µl d'éthanol absolu (100 %) puis mélanger de nouveau ;
5. Transférer le mélange dans les colonnes (DNeasy Mini Spin Column) ;
6. Centrifuger à 9000 tours pendant 1 min ;
7. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube ;
8. Ajouter 500 µl de tampon AW1 ;
9. Centrifuger à 9000 tours pendant 1 min ;
10. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube ;
11. Ajouter 500 µl de tampon AW2 ;
12. Centrifuger à 12 000 tours pendant 3 min ;
13. Retirer délicatement la colonne de sorte qu'il n'entre pas en contact avec le liquide contenu dans le tube ;
14. Placer chaque colonne dans un tube Eppendorf stérile de 1,5µl, puis ajouter 50 µl de tampon AE pour l'élution ;
15. Centrifuger à 9000 r.p.m. pendant 1 min ;
16. retirer les colonnes et conserver l'éluat contenu dans le tube de 1,5 µl ;

Conserver l'ADN pour les PCRs à -20°C

Protocole d'amplification diagnostique de *P. falciparum*

Amorces

PF 1 : 5' GGAATGTTATTGCTAACAC 3'

PF 2 : 5' AATGAAGAGCTGTGTATC 3'

Composition du master mix :

Avec la Taq 5 prime, pour un volume final de 15µl par réaction

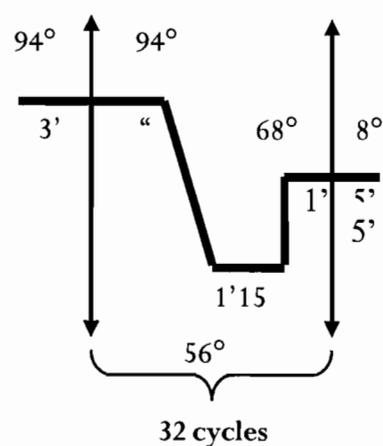
Réactifs	Concentration finale	Pour 1 rxs à 15µl
Tampon de Taq 10X	1X	1.5 µl
25mM MgCl ₂	0.5mM	0.4 µl
10mMdNTPeach	0.2 Mm each	0.3 µl
Primer F (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer R (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA polym (5U/µl)	0.5 U	0.1µl
ddH ₂ o		9.7µl
DNA template (1 à 5 ng / µl		2.0µl

Programme d'amplification :

5' [30 " , 1'15"]₃₂ 10' @ 56°C

Tailles attendues

1 fragment de 501 bp



Annexe 3 : Protocole d'amplification des marqueurs microsatellites de *P. falciparum*

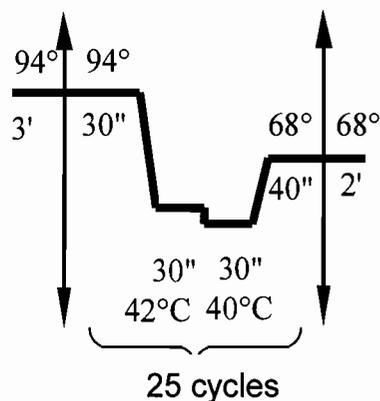
PCR1 :

Composition du "master mix" dans un volume final de 15 µl, avec la Taq polymérase 5_Prime

Réactifs	Concentration finale	1 rxs à 15 µl
Tampon de Taq 10 X	1 X	1.50 µl
MgCl 25 mM	1. mM	0.50 µl
10 mM dNTP	0.2 mM (chacun)	0.30 µl
Primer A (10 µM)	1.5 pmoles	0.15 µl
Primer B (10 µM)	1.5 pmoles	0.15 µl
Taq (5 U/µl)	1 U	0.20 µl
ddH ₂ O		10.2 µl
DNA (1 à 5 ng/µl)		2.00 µl

Programme d'amplification :

3' [30", 30", 30", 40"] 25c 2'
94° [94°, 42°, 40°, 68°] 68°



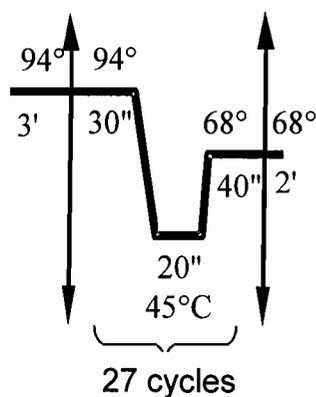
PCR2 :

Composition du "master mix" dans un volume final de 15 µl

Réactifs	Concentration finale	1 rxs à 15 µl
Tampon de Taq 10 X	1 X	1.5 µl
MgCl 25 mM	0.7 mM	0.4 µl
10 mM dNTP	0.2 mM (chacun)	0.3 µl
Primer A (10 µM)	4 pmoles	0.4 µl
Primer Fluo (5 µM)	2 pmoles	0.4 µl
Taq (5 U/µl)	1 U	0.2 µl
ddH ₂ O	/	10.3 µl
DNA PCR1		1.5 µl

Amplification d'amplification :

3' [30", 20", 40"] 27c 2'
94° [94°, 45°, 65°] 68°



Annexe 4 :

➤ Purification des réactions PCR par AMPure® Agencourt®

1- Mélanger la bouteille d'AMPure de façon à bien resuspendre les billes magnétiques

2- Ajouter le volume nécessaire d'AMPure en fonction du volume de PCR selon l'équation :

Volume d'AMPure à ajouter = 1.8 x Volume réactionnel

Volume réaction PCR (µl)	Volume d'AMPure (µl)
10	18
20	36
50	90
100	180

3- Mélanger en pipetant une dizaine de fois ou en vortexant 30 secondes et laisser incubé 5 minutes à TA

4- Placer la plaque sur la plaque magnétique SRIplate 96R et laisser entre 5 et 10 minutes de façon à séparer les billes de la solution. Le temps de séparation dépend de la taille de la réaction. Attendre que la solution soit claire avant de passer à l'étape suivante.

5- Aspirer le surnageant doucement de façon à ne pas prendre de billes.

6- Ajouter 200µl d'Ethanol 70% dans chaque puits et laisser 30 secondes à TA (ne pas vortexer ni mélanger). Retirer l'Ethanol et recommencer une deuxième fois cette opération. Retirer un maximum d'Ethanol au 2e lavage.

7- Laisser sécher à l'air libre, sur la plaque magnétique, 15 minutes.

8- Retirer de la plaque magnétique et éluer en ajoutant 40µl d'eau dans chaque puits. Mélanger ou vortexer. Laisser éluer 3-5 minutes à TA. Remettre sur la plaque magnétique avant de procéder à la réaction de séquence de façon à ne pas pipeter de billes magnétiques qui inhiberaient la réaction.

Dans le cas où la réaction purifiée doit être conservée à -20°C, Agencourt recommande de transférer l'élution, débarrassée des billes magnétiques, dans un nouveau tube avant de la congeler.

➤ **Purification Réactions Séquences par Agencourt®CleanSeq®**

Mélanger doucement le CleanSeqR par inversion

- 1- Mettre 10 µl de CleanSeqR dans les 20µl de réaction de séquence et ajouter 42µl Ethanol 85% ; Mélanger en pipetant une dizaine de fois
- 2- Mettre la plaque de réaction sur la plaque magnétique et laisser à TA 3 minutes
- 3- Aspirer le surnageant doucement en évitant de prendre les billes avec
- 4- Ajouter 100µl d’Ethanol 85% et laisser 30 secondes ; jeter l’Ethanol. Pour les réactions de séquences faites avec 4µl ou plus de BigDye Terminator, un second lavage est nécessaire. Dans ce cas, procéder de la même manière.
- 5- Laisser sécher a TA entre 10 et 15 minutes.
- 6- Hors plaque magnétique, ajouter 40µl d’H₂O dans chaque puits pour éluer ; mélanger et laisser 5 minutes a TA
- 7- Remettre sur la plaque magnétique pour séparer l’éluat des billes et prendre 12µl de cet éluat pour séquençage direct.

Annexe 5: Les articles

Articles

**Anti-Pfs25 Human Plasma Reduces
Transmission of Plasmodium falciparum
Isolates That Have Diverse Genetic
Backgrounds**

Dari F. Da, Saurabh Dixit, Jetsumon Sattabonkot, Jianbing Mu, Luc Abate, Bhanumati Ramineni, Jean Bosco Ouedraogo, Nicholas J. MacDonald, Michael P. Fay, Xin-zhuan Su, Anna Cohuet and Yimin Wu
Infect. Immun. 2013, 81(6):1984. DOI: 10.1128/IAI.00016-13.
Published Ahead of Print 18 March 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://iai.asm.org/content/81/6/1984>

These include:

REFERENCES

This article cites 22 articles, 7 of which can be accessed free at:
<http://iai.asm.org/content/81/6/1984#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Anti-Pfs25 Human Plasma Reduces Transmission of *Plasmodium falciparum* Isolates That Have Diverse Genetic Backgrounds

Dari F. Da,^{a,b} Saurabh Dixit,^c Jetsumon Sattabonkot,^{d,*} Jianbing Mu,^e Luc Abate,^b Bhanumati Ramineni,^c Jean Bosco Ouedraogo,^a Nicholas J. MacDonald,^c Michael P. Fay,^f Xin-zhuan Su,^e Anna Cohuet,^{a,b} Yimin Wu^c

Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso^a; Institut de Recherche pour le Développement (IRD)—UMR MIVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), Montpellier, France^b; Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, Maryland, USA^c; Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand^d; Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, Maryland, USA^e; Biostatistical Research Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA^f

Pfs25 is a leading candidate for a malaria transmission-blocking vaccine whose potential has been demonstrated in a phase 1 trial with recombinant Pfs25 formulated with Montanide ISA51. Because of limited sequence polymorphism, the anti-Pfs25 antibodies induced by this vaccine are likely to have transmission-blocking or -reducing activity against most, if not all, field isolates. To test this hypothesis, we evaluated transmission-blocking activities by membrane feeding assay of anti-Pfs25 plasma from the Pfs25/ISA51 phase 1 trial against *Plasmodium falciparum* parasites from patients in two different geographical regions of the world, Thailand and Burkina Faso. In parallel, parasite isolates from these patients were sequenced for the Pfs25 gene and genotyped for seven microsatellites. The results indicate that despite different genetic backgrounds among parasite isolates, the Pfs25 sequences are highly conserved, with a single nonsynonymous nucleotide polymorphism detected in 1 of 41 patients in Thailand and Burkina Faso. The anti-Pfs25 immune plasma had significantly higher transmission-reducing activity against parasite isolates from the two geographical regions than the nonimmune controls ($P < 0.0001$).

Despite decades of effort battling malaria, the disease is still a major cause of morbidity and mortality, mainly due to *Plasmodium falciparum*. Transmission-blocking vaccines (TBVs) that target sexual-stage parasite development within the mosquito midgut are an integral part of the malaria control and elimination plan currently under development (1, 2). Among multiple TBV targets, Pfs25, an antigen expressed on the surface of *P. falciparum* zygotes and ookinetes in mosquito midguts, is a leading vaccine candidate with which there is substantial evidence of induction of transmission-blocking activity (TBA) or transmission-reducing activity (TRA). A phase 1 trial conducted on U.S. adults testing a recombinant Pfs25 formulated with Montanide ISA51 demonstrated transmission-reducing activities in a standard membrane feeding assay (SMFA) using gametocyte cultures from the NF54 *P. falciparum* isolate (3).

While Pfs25 gene transcripts were detected in blood-stage gametocytes in the human host, the bulk of the Pfs25 expression commences only after fertilization in the mosquito host (4, 5). Due to the presence of little or no expression of the Pfs25 protein in the human host, it is unlikely to be naturally targeted by adaptive immunity. This is consistent with the absence of detectable anti-Pfs25 antibodies in human sera from areas where *P. falciparum* is highly endemic (6, 7), suggesting that the protein is not subject to selective pressure to evade the human immune system by antigenic variation and that the Pfs25 gene is likely highly conserved. Indeed, a survey of Pfs25 gene sequences from 9 parasite isolates from various geographical locations and 20 patients in Papua New Guinea revealed only one nonsynonymous mutation (8, 9). Recent large-scale analysis of *P. falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing showed only one synonymous mutation in the Pfs25 gene (10). It is therefore hypothesized that a recombinant Pfs25 vaccine based on the Pfs25 sequence in *P. falciparum* clone 3D7 of isolate NF54 will induce strain-transcending immunity against field isolates. In this study, we evaluated the

transmission-blocking and -reducing activities of human plasma from the Pfs25/Montanide ISA51 trial by a direct membrane feeding assay (DMFA). The assay uses *P. falciparum* gametocyte-containing blood obtained from malaria patients from two distant countries where the parasite is endemic, Thailand and Burkina Faso, in two distinct local mosquito vectors, *Anopheles dirus* and *Anopheles gambiae*, respectively. Our results showed that the anti-Pfs25 human plasma reduces transmission of *P. falciparum* isolates with diverse genetic backgrounds.

MATERIALS AND METHODS

Processing of plasma. The anti-Pfs25 plasma used in this study was collected by plasmapheresis of a volunteer from the phase 1 trial of Pfs25/Montanide ISA51, under NIAID IRB-approved protocol 05-1-0118 (3). All subjects provided written informed consent before participation. Plasma from a naïve volunteer (Interstate Blood Bank) was used as a control. Both anti-Pfs25 and naïve plasma samples were heat inactivated prior to processing. In order to avoid clotting due to ABO blood type mismatch, we preadsorbed the plasma with whole AB⁺ type blood (Interstate Blood Bank, Memphis, TN) to remove anti-A and anti-B antibodies, as described previously (11). Briefly, the whole AB⁺ type blood was washed to remove white cells and platelets. The AB⁺ red blood cell pellet

Received 8 January 2013 Returned for modification 4 February 2013

Accepted 13 March 2013

Published ahead of print 18 March 2013

Editor: J. H. Adams

Address correspondence to Yimin Wu, yiwu@niaid.nih.gov.

* Present address: Jetsumon Sattabonkot, Mahidol Vivax Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

D.F.D. and S.D. contributed equally to this article.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00016-13

was mixed at room temperature with the anti-Pfs25 immune plasma or the naïve-control plasma by gentle rotation for 20 min and was then centrifuged at $2,500 \times g$ for 10 min at 4°C . Supernatant was collected and filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter, aliquoted, and stored at -80°C for feeding assays. Using a standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (3), the anti-Pfs25 titer of this plasma was set to 3,200 ELISA units. This plasma had been tested by SMFA in the United States and had demonstrated 68 to 83% TRA (3).

DMFA. DMFAs were conducted separately at laboratories in Thailand and Burkina Faso. Both laboratories used their own local laboratory-reared mosquitoes exposed to gametocyte-infected blood from malaria patients in Burkina Faso and Thailand. The gametocyte-infected blood samples from malaria patients were collected under protocols approved by the institutional ethical committee in Burkina Faso (003-2009/CE-CM) and from the Ministry of Public Health in Thailand (under protocol WRAIR 1308). Prior to testing of the immune plasma at the two sites, the standard operating protocols (SOPs) used by both laboratories were reviewed and harmonized to minimize assay variation. The only differences in the SOPs used by the two sites, in addition to the source of gametocytes, were the mosquito species, the volume and the hematocrit of the feeding mixture in the feeder, and the types of membrane used for feeding.

In Thailand, infections were carried out using a colony of the local vector *Anopheles dirus* and gametocyte carriers were identified among adult patients of the Malaria Clinic, Mae Sot, Tak Province. Gametocyte density in donor carriers was determined by a microscopy read of 500 leukocytes on a thick blood smear. In Burkina Faso, an *Anopheles gambiae* (M molecular form) colony, established from the local natural vector population, was used. *P. falciparum* gametocyte carriers were selected among children screened in villages around Bobo Dioulasso. Gametocyte density in donor carriers was determined by a microscopy read of 1,000 leukocytes on a thick blood smear.

The gametocyte-infected blood was collected by venous blood draw and washed with incomplete RPMI medium. The blood was mixed with aliquots of anti-Pfs25 or heat-inactivated naïve control plasma. Taking into account the usual observed hematocrit in patients from the two study sites, the blood cell-to-plasma mixing ratios were $150\ \mu\text{l}:180\ \mu\text{l}$ in Thailand and $175\ \mu\text{l}:180\ \mu\text{l}$ in Burkina Faso. The mixture was incubated at room temperature for 15 min and transferred in glass feeders covered with Parafilm (in Burkina Faso) or Baudruche membrane (in Thailand) and maintained at 37°C using a water jacket circulation system. Three feeders were used per blood donor-plasma combination in order to avoid a potential feeder effect. Fifty 2- to 3-day-old female *A. gambiae* or 100 5- to 7-day-old *A. dirus* mosquitoes were placed in each membrane feeder and were allowed to feed for 30 min, after which all unengorged mosquitoes were removed. Mosquitoes were provided a 10% sucrose solution daily until they were dissected for oocyst counting at 7 days (for *A. gambiae*) or 9 to 11 days (for *A. dirus*) after blood feeding.

Transmission-blocking and -reducing activities of the anti-Pfs25 plasma. We considered two types of activity of the anti-Pfs25 plasma, TBA and TRA. The TBA measures the blocking of infection prevalence and is calculated as follows: $\text{TBA} = 100 \times [1 - (\text{prevalence of infection for mosquitoes fed with immune plasma/prevalence of infection for control group})]$. The TRA measures the reduction of oocyst density in infected mosquitoes and is calculated as follows: $\text{TRA} = 100 \times [1 - (\text{mean oocyst number with immune plasma/mean oocyst number in control group})]$. We tested the TBA and TRA of the anti-Pfs25 plasma against parasite isolates from 5 gametocyte carriers from Thailand and 7 from Burkina Faso.

Statistical methods. To evaluate whether we used comparable parasite exposures for mosquito vectors in Thailand and Burkina Faso, we used a Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) test for testing gametocyte density between countries and the t distribution on the log-transformed values for confidence intervals on the geometric mean. To compare gametocyte density to mean oocyst count, proportion of infected mosqui-

toes, or TRA, we used Spearman correlations with confidence intervals (CI) calculated using rank transform methods.

We modeled the log of the mean oocyst count (for TRA) or the log of the infection prevalence (for TBA) as normally distributed. This assumption is motivated by the central limit theorem, which states that because each statistic comes from a mean (either the mean of the oocyst counts or the mean of the indicators of infection), the normality assumption is reasonable even if the individual mosquito oocyst counts follow a more complicated model such the zero-truncated negative binomial model (12). The log of the mean can be treated as normally distributed using the delta method (13). For a single donor, we estimated the log of the ratio (test over control) of the oocyst means (for TRA) or prevalences (for TBA), using Welch's two-sample t test and the associated confidence intervals. In this case, the observations are the log means for the 6 feeders (3 with tested sera and 3 for control). This method automatically accounts for the feeder-to-feeder variability. The estimates and confidence limits are then transformed to TBA or TRA by the formula $100[1 - \exp(\log R)]$, where $\log R$ is the estimate (or confidence limit) of the log ratio from the t test. For testing the country effects, we used meta-regression methods (14, 15). Meta-regression methods are typically used for meta-analyses where there are systematic effects of interest between studies. Here each donor acts like a study and the systematic effect is the country effect. We used the mean and variance of the $\log R$ effect for each donor from the t test methods just described and allowed for donor variability through a random donor effect. We estimated the ratio of the effect from Burkina Faso over the effect from Thailand, where the effect is the test-over-control ratio for each country (estimated by the exponential of the average $\log R$ effect per country). Thus, confidence intervals on that ratio account for both the feeder variability and the donor variability.

Pfs25 sequencing and microsatellite genotyping. Blood from each gametocyte carrier was spotted on filter paper, dried, wrapped in aluminum foil, and stored at ambient temperature. Blood samples from an additional 29 *P. falciparum* carriers in Burkina Faso were added for Pfs25 sequencing. Genomic DNA was extracted from each gametocyte carrier blood sample using CTAB extraction buffer (16). The Pfs25 gene was amplified by using forward PCR primer PF1 (5'-CTTTGTTTCTTCAA TTTATTC-3') and reverse primer PR1 (5'-TCATGGTATTTTTTTTG TC-3') upstream of the Pfs25 gene start codon and downstream of the Pfs25 stop codon, respectively. Both strands were sequenced using the BigDye Terminator, version 3.1, cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and an Applied Biosystems sequencer. Sequences were assembled and verified using SeqScape (Applied Biosystems). The Pfs25 sequence from the NF54 *P. falciparum* isolate (8) was used as a reference sequence.

Microsatellites were genotyped for *P. falciparum* in blood from each gametocyte carrier using fluorescence-labeled forward primers. The markers used in this study (B5M5, C14M17, C13M63, B5M124, BM17, C1M67, and C1M4) were described previously (17, 18). Fragment analyses were conducted with a sequencer (Applied Biosystems), and alleles were sized relative to an internal size standard using GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

RESULTS

Transmission-blocking and -reducing activities of the anti-Pfs25 plasma on *P. falciparum* gametocyte isolates in Thailand and Burkina Faso. The DMFAs were conducted by feeding vector mosquitoes on blood from *P. falciparum* gametocyte carriers. The geometric mean of gametocyte density of carriers in Burkina Faso was lower ($133/\mu\text{l}$ [95% CI, 78 to $227/\mu\text{l}$]) than that of Thai carriers ($409/\mu\text{l}$ [95% CI, 62 to $2,706/\mu\text{l}$]), although there was no significant difference between the 2 countries ($P = 0.146$ by WMW test). To evaluate the effect of gametocyte density on baseline mosquito infectivity, we calculated the Spearman correlation (r_s) between gametocyte density and the proportion of infected mosquitoes or the mean oocyst density in mosquitoes from feed-

TABLE 1 Transmission-blocking and -reducing activities in DMFAs conducted in Thailand and Burkina Faso^a

Study site	Gametocyte carrier	No. of mosquitoes infected/no. dissected		% Reduction in prevalence ^c (95% CI)	P value ^c	Oocyst density mean; median (IQR) ^b		% Reduction in oocyst density (95% CI) ^c	P value ^c
		Control plasma	Test plasma			Control plasma	Test plasma		
Thailand	Thai 1	96/120	17/120	82.5 (72.1, 89.0)	0.003	20.1; 9 (1–30)	0.7; 0 (0–0)	96.9 (88.9, 99.2)	0.0021
	Thai 2	52/60	34/60	34.8 (14.5, 50.3)	0.013	144.1; 140 (96–236)	12.9; 2 (0–14)	91.8 (66.5, 98.0)	0.0097
	Thai 3	74/120	17/120	77.4 (59.2, 87.5)	0.003	2.6; 2 (0–4)	0.3; 0 (0–0)	91.2 (56.9, 98.2)	0.0190
	Thai 4	51/60	48/60	5.6 (–20.5, 26.0)	0.512	149.3; 112 (8–246)	97.2; 58 (5–166)	33.8 (–67.1, 73.8)	0.2827
	Thai 5	79/84	63/66	–1.1 (–15.1, 11.2)	0.772	222.9; 162 (49–345)	70.0; 53 (22–120)	71.0 (–21.7, 93.1)	0.0743
Burkina Faso	BF 1	53/63	53/73	14.9 (–7.6, 32.7)	0.125	33.4; 28 (6–49)	6.3; 4 (0–9)	80.6 (58.5, 91.0)	0.0059
	BF 2	45/47	93/109	10.5 (–10.4, 27.5)	0.181	86.4; 88 (24–133)	22.0; 16 (5–33)	73.6 (63.6, 80.9)	0.0003
	BF 3	80/93	60/96	27.1 (5.2, 43.9)	0.034	13.7; 13 (3–23)	3.9; 2 (0–7)	72.0 (63.9, 78.2)	0.0002
	BF 4	42/68	19/61	48.5 (1.2, 73.2)	0.047	11.4; 3 (0–16)	2.0; 0 (0–2)	80.0 (29.2, 94.4)	0.0251
	BF 5	64/82	67/104	19.2 (–10.4, 40.8)	0.099	54.9; 22 (2–92)	6.8; 2 (0–7)	87.1 (76.1, 93.1)	0.0015
	BF 6	60/75	36/86	48.7 (31.9, 61.3)	0.003	11.1; 5 (1–14)	1.6; 0 (0–2)	84.6 (66.2, 93.0)	0.0050
	BF 7	110/132	65/130	40.1 (25.8, 51.6)	0.003	14.0; 13 (2–21)	2.7; 1 (0–4)	80.9 (72.4, 86.7)	0.0003

^a The DMFAs were conducted using *A. dirus* and *A. gambiae* mosquitoes in Thailand and Burkina Faso, respectively.

^b Interquartile range (IQR) is the difference between the third and the first quartiles.

^c Percent reduction was calculated by comparing the infection prevalence or the oocyst count in mosquitoes fed with anti-Pfs25 test plasma and a nonimmune control plasma after combining information from feeders using log transformations. For details on the estimation and calculation of the 95% confidence intervals and P values, see the statistical methods section.

ing cups using control plasma. We found no significant correlation between proportion of infected mosquitoes and gametocyte density in the blood meal ($r_s = 0.46$; 95% CI, –0.16, 0.82; $P = 0.137$), but there appears to be a strong positive correlation between the mean oocyst density in mosquitoes and gametocyte density ($r_s = 0.88$; 95% CI, 0.62, 0.97; $P = 0.0002$).

We observed significant reductions in oocyst density in 10 of 12 feeding assays for mosquitoes fed with gametocyte-containing blood mixed with anti-Pfs25 plasma compared to mosquitoes fed on the same infectious blood mixed with control sera (Table 1 and Fig. 1). The gametocyte density in the blood meal, however, did not strongly impact the TRA ($r_s = -0.18$; 95% CI, –0.68, 0.44; $P = 0.58$), as the mean oocyst density in the controls was used to standardize the TRA. The activity may also be measured by TBA: inhibition of mosquito infection (prevalence). We observed a significant correlation between TRA and TBA by anti-Pfs25 plasma ($r_s = 0.76$; 95% CI, 0.32, 0.93; $P = 0.0045$). However, there were fewer significant TBA events, with only 7 of 12 cases significantly blocking infection (Table 1 and Fig. 2). This lack of significance may be due to the high oocyst density in the infection control typically observed in these assays (19) (Fig. 2).

Meta-regression analysis was conducted to determine whether TBAs and TRAs, as measured by inhibition of infection prevalence and oocyst density, respectively, determined in Thailand and Burkina Faso are comparable. The average TBAs were 51.2% (95% CI, 15.8%, 71.8%) for Thailand and 31.0% (95% CI, –9.4%, 56.5%) for Burkina Faso, whereas the average TRAs were estimated as 86.1% (95% CI, 68.6%, 93.8%) for Thailand and 80.3% (95% CI, 64.1%, 89.2%) for Burkina Faso. Percent inhibition was calculated as $100 \times (1 - R)$, with R being the ratio of test to control. The ratio of the ratios (RR) was used to compare the two countries ($RR = R(\text{Burkina Faso})/R(\text{Thailand})$). A value of RR close to 1 would mean that the two countries have comparable effects. We estimate the RR_{TBA} to be 1.41 (95% CI, 0.69, 2.89) and the RR_{TRA} to be 1.41 (95% CI, 0.51, 3.88). Despite the higher-

than-one values for both RR_{TBA} and RR_{TRA} , we find no significant differences between the two sites, and the confidence intervals of RR_{TBA} and RR_{TRA} rule out extreme differences.

The meta-regression methodology allows us to adjust for effects of gametocyte density on RRs by adding a log gametocyte density term to the linear meta-regression model. The adjusted RR_{TRA} ($RR_{TRA}[\text{adj}] = 1.87$; 95% CI, 0.57, 6.13; $P = 0.26$) shows no significant country effect, whereas the gametocyte-adjusted RR_{TBA} ($RR_{TBA}[\text{adj}] = 2.21$; 95% CI, 1.16, 4.20; $P = 0.021$) does

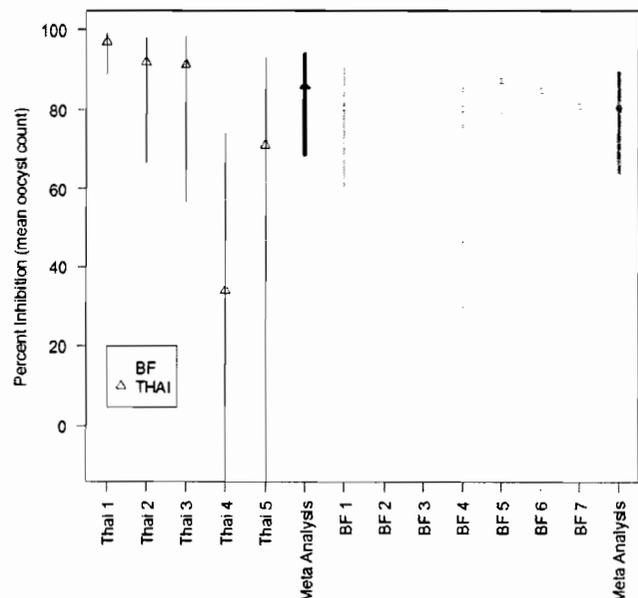


FIG 1 TRA measured as percent reduction on mean oocyst density. For each subject, we give the estimate and the 95% confidence interval. The meta-analysis columns represent the overall estimate from that country with the 95% confidence interval calculated by meta-regression.

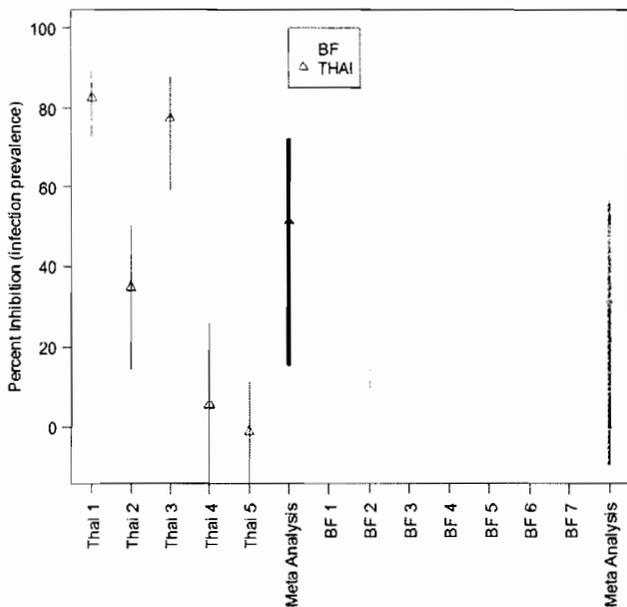


FIG 2 TBA measured as percent reduction on infection prevalence. For each subject, we give the estimate and the 95% confidence interval. The meta-analysis columns represent the overall estimate from that country with the 95% confidence interval calculated by meta-regression.

show a significant country effect, indicating that DMFA parameters other than gametocyte density may contribute to the TBA readout.

Pfs25 protein is highly conserved among field isolates with independent genetic backgrounds. The recombinant Pfs25 in the Pfs25/ISA51 vaccine was manufactured based on the sequence of isolate NF54 of *P. falciparum* clone 3D7. We genotyped parasites from gametocyte carriers involved in the study by using 7 microsatellite markers and sequenced the Pfs25 genes in these parasites and additional samples.

Genotyping was conducted using DNA from human blood samples containing both sexual and asexual blood-stage parasites.

The number of alleles detected by microsatellite markers allowed us to estimate the genetic diversity among the parasite population in the patients. Parasite isolates from 4 of 5 Thai carriers revealed only one allele for each of the 7 microsatellite markers, whereas 2 alleles were detected for 1 microsatellite in parasites from the fifth carrier (Table 2). The microsatellite haplotypes identified in the individual Thai carriers were different, indicating that while carriers from Thailand were infected with one or two parasites, each was infected with a different isolate. In Burkina Faso, however, parasite genetic diversity was much greater. The 7 Burkina Faso gametocyte carriers showed evidence of multiple infections, with 2 to 9 different haplotypes detected per donor; at least 42 distinct genotypes or clones were present within this group (Table 2).

Despite the highly divergent genetic backgrounds of parasites among the carriers from the 2 countries, Pfs25 sequences revealed a very low level of diversity. Among the Thai isolates, one nonsynonymous mutation was observed compared to the previously published NF54 isolate (8). This mutation observed in the blood donor identified as Thai 3 has previously been detected in other geographical areas (<http://plasmodb.org/>) and results in a glycine-to-alanine substitution. No synonymous polymorphisms were detected among the Thai isolates. In Burkina Faso, no polymorphism, synonymous or nonsynonymous, compared to the NF54 isolate was detected in the Pfs25 gene among all 7 gametocyte carriers and 29 additional parasite carriers.

Interestingly, the Pfs25 gene sequence of the donor with the lowest TBA (Thai 4) was identical to that in NF54. Conversely, the antisera of the donor with the Pfs25 gene substitution for alanine (Thai 3) had highly significant TBA ($P_{TBA} = 0.003$ and $P_{TRA} = 0.019$). These results from our study suggest that sequence polymorphism may have little impact on efficacy of recombinant Pfs25 vaccines based on sequences in the NF54 isolate.

DISCUSSION

Previously, Arakawa and colleagues demonstrated effective transmission-blocking activity against field isolates using anti-Pfs25 sera raised in rodents (20). Similarly, in a pilot study, we observed that pooled rabbit sera from animals immunized with Pfs25/Mon-

TABLE 2 *P. falciparum* microsatellite allele sizes in blood samples from gametocyte carriers

Study site	Gametocyte carrier	Allele size (base pairs) of microsatellite marker ^a							Haplotype no. ^a
		B5M5	C14M17	C13M63	B5M124	BM17	C1M67	C1M4	
Thailand	Thai 1	221	174	192	220	131	200	189	1
Thailand	Thai 2	226	203	202	189	131	209	214	1
Thailand	Thai 3	214	186	201	177	127	207	200	1
Thailand	Thai 4	ND ^b	196	381	152	132	205	184	1
Thailand	Thai 5	230	167/163	240	171	128	199	205	2
Burkina Faso	BF 1	192/204/207 211/224/230	180/192/202	191/212/217 226/253	159/171/200/211/220 226/239/247/261	131/136 138 151	189/193/205 210/212	178/185/189 200/206	9
Burkina Faso	BF 2	183/192/207 211/217/230	180/184/194 205/215/226	197/208/215	183/200/207/213/220 232/247	131/142 144	183/189/195 199	186/189/204 209	7
Burkina Faso	BF 3	211/217/220 227/237	182/194/202	203/223	177/189/200/211/232 247/260	131/138 144	183/187/199 214	190/192/200 214	7
Burkina Faso	BF 4	198/204/217 220/230	178/186/190 207/215	199/203/216 223/272	194/207/213/220/232	138/142 147	183/193/205	180/185/189 193/200	5
Burkina Faso	BF 5	207/224	228	219	200/211	131/143	185	194/200	2
Burkina Faso	BF 6	211/220/224 233	180/192	219	194/200/213/220/226	131/138	189/208	184/200	5
Burkina Faso	BF 7	192/204/211 217/220/224	180/192/207 213	206/215	177/183/188/194/211 239/260	130/144	183/189/201 203/210/216	178/193/206	7

^a Number of detected parasite haplotypes in the human blood donor, according to the maximal number of alleles observed.

^b ND, not detected.

^c Multiple alleles in mixed infection are separated by slashes.

tanide ISA51 inhibited parasites from a Thai malaria patient with a single Pfs25 haplotype identical to the 3D7 strain (data not shown). This article is the first report that human anti-Pfs25 sera can confer transmission-blocking activity in a DMFA against field parasites responsible for local transmission. It supports our hypothesis that Pfs25 vaccines based on the NF54 isolate sequence can induce strain-transcending immunity. The limited polymorphism of Pfs25 may be central to strain-transcending immunity and may facilitate development of a Pfs25-based transmission-blocking vaccine. We recognize that this proof of concept was based on a single human serum with a relatively high anti-Pfs25 titer and that the observation needs to be confirmed with immune sera from future vaccine trials.

To minimize assay variability between two sites, we harmonized the DMFA SOPs for blood processing, feeder setup, feed duration, and temperature, while gametocyte carrier recruitment (patients in Thai clinics versus asymptomatic Burkina Faso volunteers), hematocrit in blood meal, and mosquito species were adapted to local conditions. Our results demonstrated similar anti-Pfs25 serum transmission-reducing and/or transmission-blocking activity against local mosquito vectors in both sites.

We observed strong efficacy of the anti-Pfs25 plasma in reducing oocyst intensity (mean TRAs were above 80% in both Thailand and Burkina Faso) and a more limited blocking activity (mean TBAs were 31% and 51.2% in Thailand and Burkina Faso, respectively). The same plasma had been tested in SMFA in the United States and had demonstrated 68 to 83% TRA (3). Further analyses of the same data sets revealed lower TBAs (0 to 11%) in multiple assays, with mean oocyst densities of 5.1 to 52.1 in control mosquitoes fed with an autologous preimmune serum (Y. Wu, unpublished data). The TRA and TBA results of DMFAs in Burkina Faso and Thailand seem comparable to those of SMFAs in the United States. We therefore observed similar efficacies of the anti-Pfs25 plasma against cultured and field parasites.

It was anticipated that the anti-Pfs25 plasma would show a lower effect on mosquito infection prevalence (TBA) than on oocyst density (TRA) in these assays. As recently highlighted by Churcher and colleagues, variation in oocyst density associated with little or no change in prevalence occurs at high levels of infection, with high infection prevalence and high oocyst density. This is due to the relationship between prevalence and oocyst density, in which infection prevalence reaches a plateau close to 100% when oocyst density is high (19). Consequently, TBA is more dependent on control infection intensity than TRA, and a higher TBA may be observed when mosquitoes are fed on blood meals with lower infectious gametocyte densities. In the present study, oocyst densities in the control groups were high as defined by Churcher and colleagues (19), probably as a result of selecting volunteer blood donors with higher gametocyte densities, whereas in natural settings, wild mosquito vectors may be infected by gametocyte carriers at a submicroscopic detection level (21). Actual exposure of mosquitoes to *P. falciparum* in natural settings remains poorly documented (22, 23). Studies to characterize the parasite intensity in naturally infected malaria vectors and subsequent transmissibility to human populations could potentially fill a major gap of knowledge for evaluating TBV candidates at relevant infection levels.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank study participants for their blood donations and Andrew Orcutt for technical assistance. In addition, we thank the Laboratoire Mixte International (LAMIVECT), Bobo Dioulasso, Burkina Faso, for technical support.

This work was supported by funding from the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, United States, and the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreements 242095 and 223736. Also, we thank IRD for financial support and for a fellowship to D.F.D.

REFERENCES

1. Kaslow DC. 2002. Transmission-blocking vaccines. *Chem. Immunol.* 80: 287–307.
2. Birkett AJ. 2010. PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI): perspectives on the status of malaria vaccine development. *Hum. Vaccin.* 6:139–145.
3. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, Mahanty Fay SMP, Narum D, Rausch K, Miles AP, Aebig J, Orcutt A, Muratova O, Song G, Lambert L, Zhu D, Miura K, Long C, Saul A, Miller LH, Durbin AP. 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3:e2636. doi:10.1371/journal.pone.0002636.
4. Vermeulen AN, van Deursen J, Brakenhoff RH, Lensen TH, Ponnudurai T, Meuwissen JH. 1986. Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:155–163.
5. Schneider P, Bousema T, Omar S, Gouagna L, Sawa P, Schallig H, Sauerwein R. 2006. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int. J. Parasitol.* 36:403–408.
6. Carter R, Graves PM, Quakyi IA, Good MF. 1989. Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 169:135–147.
7. Quakyi Otoo IA, LN, Pombo D, Sugars LY, Menon A, De Groot AS, Johnson A, Alling D, Miller LH, Good MF. 1989. Differential non-responsiveness in humans of candidate *Plasmodium falciparum* vaccine antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:125–134.
8. Kaslow DC, Quakyi IA, Keister DB. 1989. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:101–103.
9. Shi YP, Alpers MP, Povoia MM, Lal AA. 1992. Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50:179–180.
10. Manske M, Miotto O, Campino S, Auburn S, Almagro-Garcia J, Maslen G, O'Brien J, Djimde A, Doumbo O, Zongo I, Ouedraogo JB, Michon P, Mueller I, Siba P, Nzila A, Borrmann S, Kiara SM, Marsh K, Jiang H, Su XZ, Amaratunga C, Fairhurst R, Socheat D, Nosten F, Imwong M, White NJ, Sanders M, Anastasi E, Alcock D, Drury E, Oyola S, Quail MA, Turner DJ, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Amenga-Etego L, Hubbard C, Jeffreys A, Rowlands K, Sutherland C, Roper C, Mangano V, Modiano D, Tan JC, Ferdig MT, Amambua-Ngwa A, Conway DJ, Takala-Harrison S, Plowe CV, Rayner JC, Rockett KA, Clark TG, Newbold CI, Berriman M, MacInnis B, Kwiatkowski DP. 2012. Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature* 487:375–379.
11. Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, Long CA, Lambert L, Miles AP, Wang J, Stowers A, Miller LH, Saul A. 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23:3131–3138.
12. Harris C, Morlais I, Churcher TS, Awono-Ambene P, Gouagna LC, Dabire RK, Fontenille D, Cohuet A. 2012. *Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations. *PLoS One* 7:e30849. doi:10.1371/journal.pone.0030849.
13. Lehmann EL. 1999. Elements of large sample theory. Springer, New York, NY.
14. Knapp G, Hartung J. 2003. Improved tests for a random effects meta-regression with a single covariate. *Stat. Med.* 22:2693–2710.

15. Viechtbauer W. 2010. Conducting meta-analyses in R with the metaphor Package. *J. Stat. Softw.* 36:1–48.
16. Morlais I, Poncon N, Simard F, Cohuet A, Fontenille D. 2004. Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: new insights into the biology of malaria vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:795–802.
17. Su X, Ferdig MT, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, Wootton JC, Wellems TE. 1999. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 286:1351–1353.
18. Liu S, Mu J, Jiang H, Su XZ. 2008. Effects of *Plasmodium falciparum* mixed infections on in vitro antimalarial drug tests and genotyping. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79:178–184.
19. Churcher TS, Blagborough AM, Delves M, Ramakrishnan C, Kapulu MC, Williams AR, Biswas S, Da DF, Cohuet A, Sinden RE. 2012. Measuring the blockade of malaria transmission—an analysis of the standard membrane feeding assay. *Int. J. Parasitol.* 42:1037–1044.
20. Arakawa T, Komesu A, Otsuki H, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Matsumoto Y, Tsuji N, Wu Y, Torii M, Tsuboi T. 2005. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 73:7375–7380.
21. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. 2012. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat. Commun.* 3:1237.
22. Billingsley PF, Medley GF, Charlwood D, Sinden RE. 1994. Relationship between prevalence and intensity of *Plasmodium falciparum* infection in natural populations of *Anopheles* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:260–270.
23. Medley GF, Sinden RE, Fleck S, Billingsley PF, Tirawanchai N, Rodriguez MH. 1993. Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector. *Parasitology* 106:441–449.



Measuring the blockade of malaria transmission – An analysis of the Standard Membrane Feeding Assay

Thomas S. Churcher^{a,*}, Andrew M. Blagborough^{b,1}, Michael Delves^b, Chandra Ramakrishnan^b, Melissa C. Kapulu^c, Andrew R. Williams^c, Sumi Biswas^c, Dari F. Da^{d,e}, Anna Cohuet^{d,e}, Robert E. Sinden^{b,c}

^a Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London W2 1PG, UK

^b Department of Life Sciences, Imperial College London, South Kensington, London SW7 2AZ, UK

^c The Jenner Institute, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ, UK

^d Institut de Recherche en Sciences de la Santé, 01 BP 545 Bobo-Dioulasso 01, 399, Avenue de la Liberté, Burkina Faso

^e Institut de Recherche pour le Développement, Unité MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2012

Received in revised form 13 September 2012

Accepted 17 September 2012

Available online 27 September 2012

Keywords:

Malaria
Mosquito
Standard Membrane Feeding Assay
Transmission
Plasmodium
Oocyst

ABSTRACT

The standard membrane feeding assay (SMFA) is currently considered to be the ‘gold standard’ for assessing the effectiveness of malaria transmission blocking interventions (TBIs) in vivo. The operation and analysis of SMFAs has varied between laboratories: field scientists often measure TBI efficacy as a reduction in the prevalence of infected mosquitoes whilst laboratory scientists are more likely to quote efficacy as a change in the number of oocysts within the mosquito. These metrics give outputs that differ widely, resulting in a need for greater understanding of how the SMFA informs TBI assessment. Using data from 536 different assays (conducted on *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*, in either *Anopheles gambiae* or *Anopheles stephensi*) it is shown that the relationship between these metrics is complex, yet predictable. Results demonstrate that the distribution of oocysts between mosquitoes is highly aggregated, making efficacy estimates based on reductions in intensity highly uncertain. Analysis of 30 SMFAs carried out on the same TBI confirms that the observed reduction in prevalence depends upon the parasite exposure (as measured by oocyst intensity in the control group), with assays which have lower exposure appearing more effective. By contrast, if efficacy is estimated as a reduction in oocyst intensity, then this candidate demonstrated constant efficacy, irrespective of the exposure level. To report transmission-blockade efficacy accurately, the results of SMFAs should give both the prevalence and intensity of oocysts in both the control and intervention group. Candidates should be assessed against a range of parasite exposures to allow laboratory results to be extrapolated to different field situations. Currently, many studies assessing TBIs are underpowered and uncertainties in efficacy estimates rarely reported. Statistical techniques that account for oocyst over-dispersion can reduce the number of mosquitoes that need to be dissected and allow TBI candidates from different laboratories to be accurately compared.

© 2012 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The intolerable health and economic burdens imposed by malaria have prompted an ambitious expansion of malaria control activities, recently including local elimination and future eradication as key objectives (Alonso et al., 2011). A key component of this endeavour is now recognised to be the interruption of transmission of the parasites through the mosquito vector (Smith et al., 2011), thereby reducing the number of secondary infections (Shaukat et al., 2010). The efficacy of newly developed transmission blocking interventions (TBIs) needs to be accurately assessed; for example a

wide range of highly effective transmission blocking (TB) drugs and vaccines have been developed in the laboratory and these candidates now need to be selected and prioritised to transfer the best of these new tools to the field. This will require a standard method by which to assess the effectiveness of TBIs that will allow results from different laboratories to be compared directly.

The Standard Membrane Feeding Assay (SMFA) was developed from an experimental laboratory protocol devised to study transmission of malaria parasites to their vectors (Boyd, 1949; Ponnudurai et al., 1987). The presence/number of oocysts is used to report the success of infection, although it was quickly appreciated that the production of oocysts did not necessarily correlate with the successful transmission of the parasite from vector to vertebrate host (Boyd, 1949). In the 1970–80’s the SMFA gained acceptance as a useful and standard method to determine,

* Corresponding author. Tel.: +44 207 594 3265; fax: +44 207 402 3927.

E-mail address: thomas.churcher@imperial.ac.uk (T.S. Churcher).

¹ Contributed equally to this work.

in vivo, the impact of TB antibodies targeting gametes and ookinetes, for which reporting oocyst production was the most direct readout. The ability to make multiple identical replicates with or without the intervention and to infect replicate groups of vectors in vivo was key to this application, and the assay rapidly acquired the accolade 'gold standard'. In this assay, potential TBI candidates are mixed with infectious gametocytes and fed to mosquitoes which are then dissected after a fixed time interval to determine how efficiently oocysts have developed on the midgut. Although this method is widely used across different laboratories, results are reported in different and often conflicting formats. Studies may report (i) the reduction in the proportion of infected mosquitoes (here defined as oocyst prevalence, Medley et al., 1993) or (ii) the reduction in the mean number of oocysts (here defined as oocyst intensity, see Medley et al., 1993). Experiments on TBIs have focused on the changes in the numbers of parasites in a mosquito as this is deemed the more discriminatory of the two metrics. Despite these two metrics being clearly related (Billingsley et al., 1994), the efficacy of an intervention will be described differently depending on which of the two measurements are used. This uncertainty in presentation reflects the deeper lack of understanding of how malaria transmission and the properties of mosquito infection are measured. Field malariologists tend to report malaria transmission as the Entomological Inoculation Rate (EIR), which is the number of potentially infectious bites received per person per time unit, in which a mosquito is deemed infectious if they have salivary gland sporozoites, regardless of their number (Smith et al., 2005). The apparent dichotomy between assay readouts needs to be resolved if appropriate decisions about which potential TBIs to take forward into field trials are to be made.

To allow different TBI candidates to be compared fully in the SMFA it is essential to understand the uncertainty around point estimates, an issue that is rarely discussed in the scientific literature. Transmission 'blockade' is conventionally measured by the change (fall or rise) in oocyst prevalence/intensity, induced by the intervention, by comparison with an appropriate, control replicate. The results are expressed as:

$$\text{Efficacy} = \frac{C - E}{C} \times 100 \quad (1)$$

where C is the mean prevalence/intensity in the control group and E is the mean prevalence/intensity in the intervention group (Lensen et al., 1999; Blagborough et al., 2012). The assay is repeated a number of times (typically three to five paired comparisons) and the mean efficacy reported. Results show here, that the accuracy of a result can vary dramatically depending on the number of mosquitoes dissected in both the control and intervention groups, and the number of replicate feeds carried out.

Perhaps the biggest practical drawback of the SMFA is the cost of the assay. Dissection of mosquito midguts and enumeration of oocysts, particularly when working with human pathogens, imposes exceptionally high manpower, time and infrastructure costs. Consequent financial and/or practical pressures lead many to reduce the number of feeds and mosquitoes dissected to a 'useful' minimum. The number of feeds conducted and mosquitoes dissected varies substantially between laboratories and power calculations are rarely determined, making comparison of different candidates even within the same laboratory potentially imprecise. An early critique of the assay used bootstrapping methodology to examine factors that influenced the reproducibility of the method and concluded that a study comparing oocyst intensity must have a control group oocyst mean intensity of ≥ 35 (van der Kolk et al., 2005). Although this might be desirable in some cases, in reality oocyst counts in the control group are often significantly lower than this, and the results deemed to be less 'valuable'. As a result, more generalisable guidelines are required.

Using data from 536 SMFA studies on both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* or *Anopheles stephensi*, the underlying relationship between oocyst prevalence and intensity is re-examined. It is shown how this relationship explains why the same TBI candidate may give very different estimates of TBI efficacy under different experimental conditions, discuss the consequent operational constraints of the SMFA, and suggest an improved method of interpreting the data.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and mosquitoes

General parasite maintenance was carried out as described previously (Sinden, 2002; Blagborough et al., 2012). *Plasmodium berghei* strains ANKA 2.34, PbGFPCON 259c12 (Janse et al., 2006), or PbGFPCON 507c11, were maintained in 4–10 week old female Tuck's Ordinary (TO) or CD1 mice (Harlan, UK) by serial mechanical passage (up to a maximum of eight passages). Hyper-reticulocytosis was induced 2–3 days before infection with 200 μ l i.p. phenylhydrazinium chloride (PH; 6 mg/ml in PBS; ProLabo, UK). Mice were then infected i.p. with 10^8 *P. berghei*-infected mouse blood cells and infections monitored with Giemsa-stained tail blood smears (Sinden, 2002). *Plasmodium falciparum* strains 3D7 and NF54 were maintained in asynchronous culture as described previously (Ifediba and Vanderberg, 1981; Graves et al., 1984). *Anopheles stephensi* mosquito strain SDA 500 and *A. gambiae* strains N'Gouso and G3 were produced as described previously (Sinden, 2002), and maintained on fructose (8% (w/v) fructose, 0.05% (w/v) *p*-aminobenzoic acid).

2.2. The Standard Membrane Feeding Assay

2.2.1. *Plasmodium berghei*

Batches of *Anopheles* housed in pots at 19 °C were starved for 24 h and then fed on heparinised *P. berghei*-infected blood using standard membrane feeding methods (Sinden, 1996). Briefly, infected mice were exsanguinated into heparinised syringes. Heparinised blood was then added to tubes (at 37 °C) containing the antibody or drug under investigation with appropriate controls (Normal/pre-immune serum with or without the drug (solvent only)). These mixed preparations were offered through Parafilm® membranes on feeders at 37 °C to replicate pots of 50–200 female mosquitoes obtained from the same generation/cohort. Twenty-four hours after feeding, mosquitoes were briefly anaesthetised with CO₂ and unfed mosquitoes were removed. Mosquitoes were then maintained at 19–22 °C and 50–80% relative humidity. Recognising that midgut oocyst numbers vary over time (Dawes et al., 2009b), midguts were dissected only on day 10 post-feeding. Mosquito midguts were dissected and cohort size, infection prevalence and the mean number of oocysts on the midgut (intensity), were measured for each pot of mosquitoes (Sinden, 1996; Blagborough et al., 2012).

2.2.2. *Plasmodium falciparum*

Mature gametocytes of *P. falciparum* (3D7 and NF54) were produced in vitro as described previously (Ifediba and Vanderberg, 1981; Graves et al., 1984). Briefly, mature gametocyte cultures (0.015–0.4% final gametocytaemia) were fed for 30 min at 37 °C to mosquitoes through a Parafilm® membrane. Engorged mosquitoes were housed in pots at 28 °C and 60–80% relative humidity. On days 8–10, midguts were dissected and the results analysed as in Section 2.2.1.

2.3. Mathematical analysis

A summary of the data used is given in Supplementary Table S1. The number of oocysts in a mosquito is highly over-dispersed (aggregated relative to the normal distribution) so here the statistical analysis was carried out using data from individual dissected mosquitoes (as opposed to mean oocyst estimates which is shown to be highly uncertain at low sample sizes). Among the 536 experiments analysed, individual mosquito count data were available for 189 different experimental feeds, in which a total of 9,119 mosquitoes were dissected (Supplementary Table S2). The relationship between oocyst prevalence and intensity was estimated by extending the methods of Medley et al. (1993) which fit a relationship between the mean parasite intensity and parasite prevalence using a binomial distribution. To fully capture the uncertainty in oocyst estimates, a full negative binomial distribution is used to allow the number of oocysts in infected mosquitoes to influence the distribution. To account for the abundance of uninfected mosquitoes seen, a zero-inflated negative binomial distribution was also tested. A range of different functional forms are used to describe how k (an inverse measure of aggregation; see Eq. (1) of Medley et al., 1993) changes with oocyst intensity. The most parsimonious models were chosen using the likelihood ratio test.

Estimates of the number of mosquitoes that need to be dissected (power calculations) were generated by sampling from the best fit distribution and functions according to the stated sample size and using the results from Eq. (1) (with simulations run a 10,000 times to generate 95% confidence intervals). Statistics were further refined using generalised linear mixed models (GLMMs), with binomial error structure for prevalence data and zero-inflated negative binomial for intensity data (Bolker et al., 2009). The uncertainty around point estimates was calculated by bootstrapping (for both mosquitoes and experimental feeds when estimates involving multiple assays were required).

3. Results

3.1. The relationship between oocyst prevalence and intensity

The results of 536 TBI assays on 132 different TBI candidates are shown in Fig. 1. This graph suggests that interventions can have widely different combinations of reported abilities to reduce oocyst prevalence and intensity. Superficial viewing might suggest that for both *P. falciparum* and *P. berghei* a substantial reduction in intensity (~70%), may be required before a noticeable (~10%) impact upon prevalence is achieved. However, further analysis suggests that this is not the case (see below).

The relationship between oocyst prevalence and intensity is shown in Fig. 2A. For what is believed to be the first time, these data show that the same relationship holds in both the control and the experimental groups. Fitting separate curves to the control and experimental groups does not significantly improve the fit of the model (likelihood ratio test P value = 0.060; see Supplementary Fig. S1). This suggests that if an intervention reduces oocyst intensity then the reduction seen in prevalence is entirely predicted by the course of the black line plotted in Fig. 2A. The shape of the best fit relationship can then be used to show what reduction in prevalence is expected for a given reduction in intensity in experiments in which the control intensity ranges from one to 100 oocysts (Fig. 2B), i.e. in an individual SMFA assay, if the control group has a mean oocyst intensity of 100 then one would only expect to see a reduction in oocyst prevalence of 20% from a TBI which reduced oocyst intensity by 90% (Fig. 2B). Upon closer inspection of Fig. 1 this can also be seen in the larger dataset of 536 paired experiments. Darker points signifying higher oocyst densities in

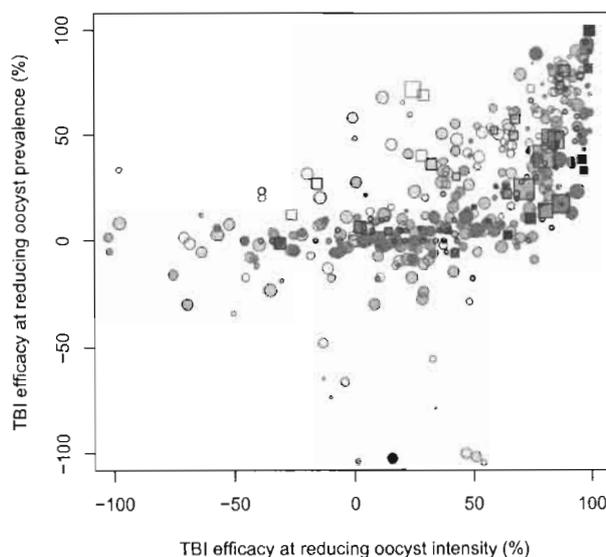


Fig. 1. Results of 536 Standard Membrane Feeding Assays (SMFAs) used to assess the effectiveness of 132 different transmission blocking intervention (TBI) candidate drugs and sera. Each point represents the efficacy of a single paired experiment as estimated using Eq. (1) (using the arithmetic mean). The colour of the point represents the parasite species used, be it *Plasmodium falciparum* (blue) or *Plasmodium berghei* (green) whilst the depth of the colour reflects the parasite exposure (darker shading reflecting higher mean intensity in the control group). The size of the point is relative to the number of mosquitoes dissected in each paired experiment whilst the shape of the point denotes the species of vector used, either *Anopheles gambiae* (square) or *Anopheles stephensi* (circle). Negative points on either axis indicate estimates where the TBI candidate appeared to increase either oocyst prevalence or intensity, although whether this is due to transmission enhancement or measurement error associated with the assay cannot be determined. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the control group are more likely to be to the right of the x-axis, showing the strongly non-linear relationship between blockade of prevalence and blockade of intensity. The majority of data points clearly suggest a highly non-linear relationship between the reduction in prevalence and the reduction in intensity. This will be exacerbated by the current assumption that high control oocyst numbers equate to a 'successful' experiment within the majority of laboratory studies (Fig. 2B).

Whilst recognising that the majority of the *P. falciparum* data examined were gathered in different laboratories to the *P. berghei* data, it is interesting to note that the prevalence-intensity relationship appears relatively consistent between both parasite and vector combinations (Fig. 2A). Nevertheless statistical analysis shows that fitting different curves (Supplementary Fig. S2) to the different parasite species separately significantly improves the fit of the models ($P < 0.001$). Further analysis comparing data from *P. falciparum* and *P. berghei* from the same laboratory is needed to verify this result, although for the purposes of this study a single curve fitted to the whole dataset is used as it will make relatively little practical difference to power calculations. Laboratories may wish to improve their power estimates by fitting their own parasite-vector combination-specific prevalence-intensity relationships.

3.2. The aggregated distribution of oocysts

Medley et al. (1993) originally highlighted that the number of oocysts in each mosquito is far from normally distributed. They demonstrated that there are significantly more uninfected mosquitoes for a given mean oocyst intensity than you would expect with a Poisson (normal) distribution. This report goes further and

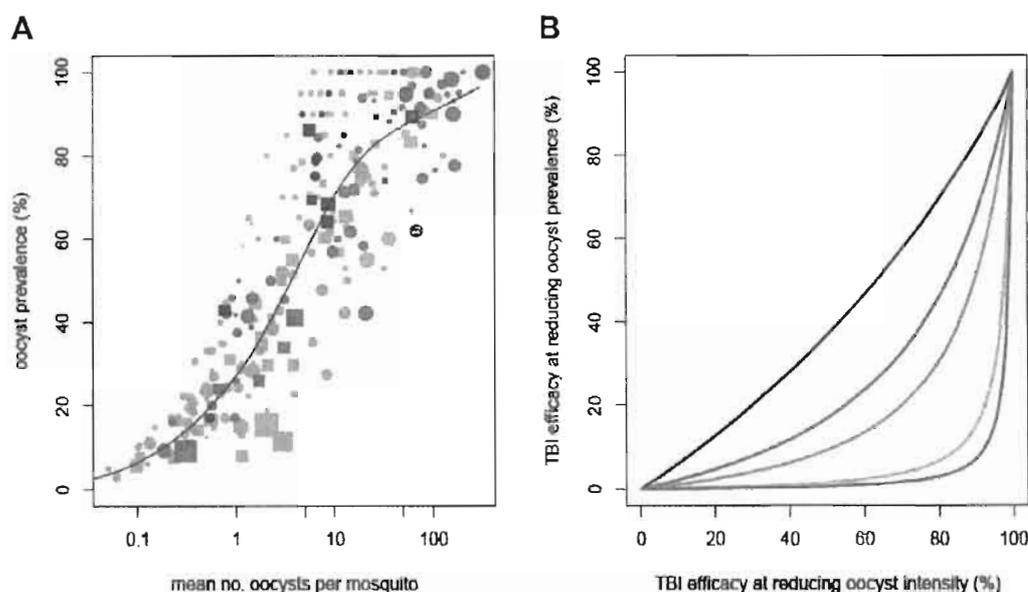


Fig. 2. The relationship between oocyst prevalence and intensity and how this relationship will determine the effectiveness of transmission blocking interventions (TBIs). (A) Oocyst prevalence – intensity relationship estimated from 189 Standard Membrane Feeding Assays (SMFAs). The colour of the point represents the parasite species used: *Plasmodium falciparum* (blue) or *Plasmodium berghei* (green). The dark shade denotes SMFA controls whilst the lighter shade signifies experiments with candidate TBIs. The size of the points indicates the number of mosquitoes dissected whilst the shape denotes the species of vector used, either *Anopheles gambiae* (square) or *Anopheles stephensi* (circle). Oocyst intensity is shown as the arithmetic mean. The black line indicates the best fit model (see Supplementary Table S3 for the best fit parameters). (B) The expected relationships between efficacy and oocyst prevalence and intensity when using different parasite exposures according to the model presented in (A). The colours of the lines indicate the mean oocyst intensity in the control group, one (blue), five (green), 10 (orange), 50 (yellow) or 100 (red) oocysts. This can be compared with Fig. 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

examines the overall distribution of parasites in infected mosquitoes and the number of uninfected mosquitoes observed. Results indicate that the degree of oocyst aggregation (over-dispersion) is even greater than previously described. Using a zero-inflated negative binomial distribution (Log-likelihood: -21686) instead of a normal negative binomial distribution (Log-likelihood: -21846 ; as used by Medley et al., 1993) significantly improved the fit of the best-fit model ($P < 0.001$). Across the whole dataset, 79% of oocysts were found in just 10% of all mosquitoes. The degree of oocyst aggregation (as measured by the variance to mean ratio) increases with increasing infection intensity (see Supplementary Fig. S3). This aggregation can substantially increase the uncertainty around study results, particularly in SMFAs with high parasite exposure.

3.3. Understanding the uncertainty around estimates generated using the current method of analysis

3.3.1. Number of mosquitoes dissected

Parasite aggregation makes estimates of oocyst intensity highly uncertain. This uncertainty is exacerbated when a relatively small number of mosquitoes are dissected. This is illustrated in Fig. 3A which is parameterised using the results of the model fitted in Fig. 2A and described in Supplementary Data S1. If only 20 mosquitoes were dissected, then a mean oocyst intensity of 20 would have 95% confidence interval estimates that ranged from ~ 10 to ~ 50 . A worked interpretation and practical application of these findings is described within Supplementary Data S2. Dividing one uncertain result by another uncertain result (as done in Eq. 1) generates highly uncertain estimates of TBI efficacy. The uncertainty is worse if there is a low intensity of oocysts in the control group (i.e. low parasite exposure in the absence of a TBI), as small absolute changes in the denominator can have a big effect on the overall estimate of efficacy. This is illustrated in Fig. 3B for an intervention with a true efficacy of 80%. If, as commonly practised, 20 mosqui-

toes are dissected in both the control and the intervention group, the 95% confidence intervals for the efficacy could range between -10% (enhancement) to 100% depending on the oocyst intensity in the control group. Even if the control group had a mean oocyst intensity of 50, the confidence intervals would still be relatively large ($\sim 50\%$ to $\sim 95\%$). To have relative confidence in the precision of the efficacy estimates will require large numbers of mosquitoes to be dissected (Fig. 3C). There is considerably more certainty in the efficacy estimates of highly effective interventions because the degree of aggregation decreases with mean oocyst intensity. This means that interventions with a lower efficacy will typically show greater variability in the efficacy observed when using the SMFA. Similar uncertain predictions were generated for efficacy estimates that rely on prevalence (Fig. 3D and E). The same problems arise when using Eq. (1), making SMFA results highly uncertain.

3.3.2. Number of experimental feeds

Decisions about potential TBIs are currently being made using relatively small numbers of experimental replicates (often as low as one). The results of 30 different paired assays using the same TBI candidate (anti *Pbs28* monoclonal antibody (mAb) 13.1) are shown in Fig. 4A and B. There is considerable variation in assay readout, between experimental feeds which could be explained by heterogeneity between hosts (mice in this case), feeding apparatus, experimental technique or cage effects. This uncertainty in efficacy should be taken into consideration when designing experiments but also in the statistical analysis. Mosquitoes from the same cage will not be statistically independent as they are more likely to have similar levels of infection than mosquitoes fed and reared for a replicate experiment. An example of this “cage effect” could be the degree with which the parafilm is stretched over the feeding device as that might influence mosquito infectivity for all mosquitoes within that experimental feed, or the microbiota present in the gut of mosquitoes reared in a single cohort. Studies

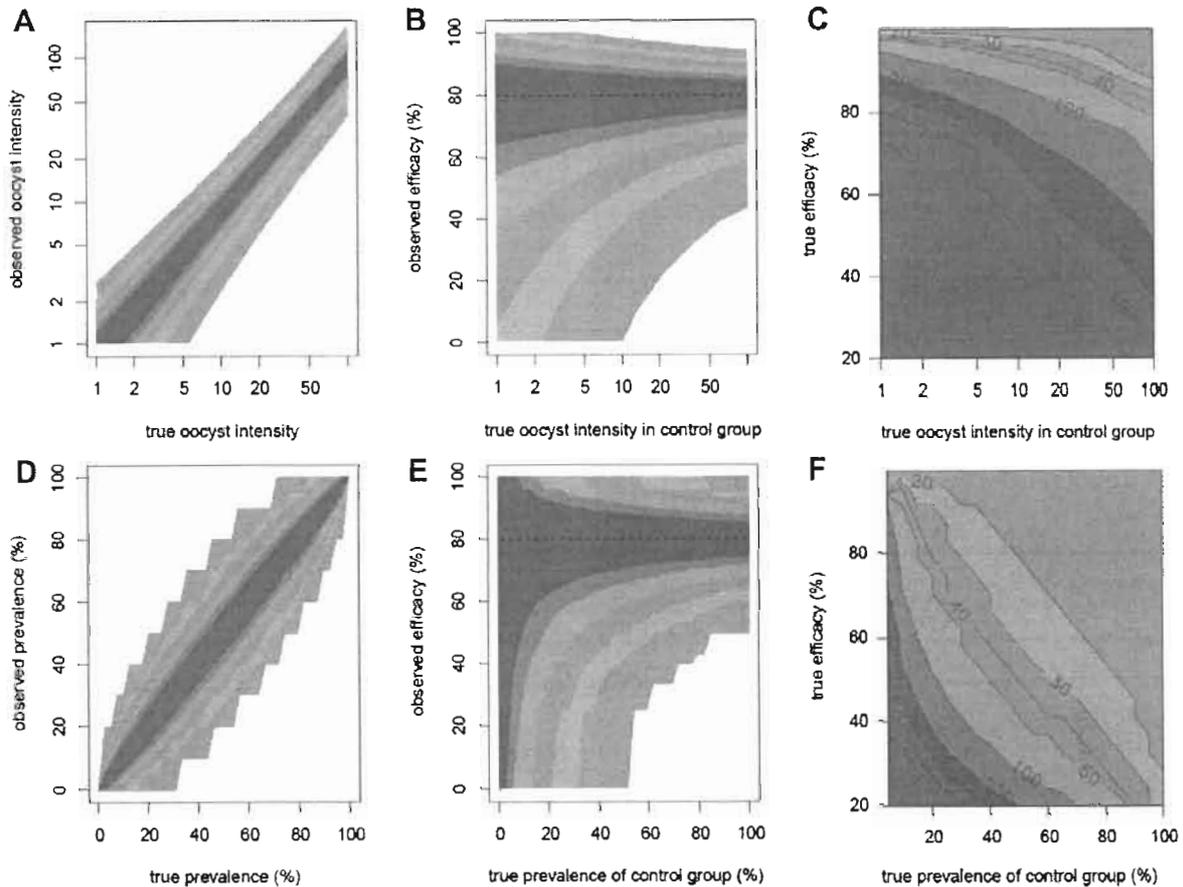


Fig. 3. Indications of the uncertainties in efficacy estimates generated by 30 repeat Standard Membrane Feeding Assays (SMFAs) conducted on the same transmission blocking intervention (TBI) candidate in the same laboratory using the standard method. Efficacy is measured as either a reduction in the mean number of *Plasmodium berghei* oocysts developing within *Anopheles stephensi* (A–C) or oocyst prevalence (D–F). (A) and (D) show the range of oocyst intensity estimates that could be observed for a given true oocyst intensity according to the number of mosquitoes dissected, be it 10 (orange), 20 (yellow), 30 (green), 50 (light blue), 100 (dark blue), 200 (purple). (B) and (E) show the range of efficacies that could be generated by a TBI candidate with a true efficacy of 80% (denoted by the black dashed line). Shaded colours represent different sample sizes (as above). (C) and (F) show the minimum number of mosquitoes that need to be dissected to ensure that reported efficacy is within 10% of the true efficacy. If the number of mosquitoes required is >500 then a value of 500 is given. All figures show 95% confidence interval estimates. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

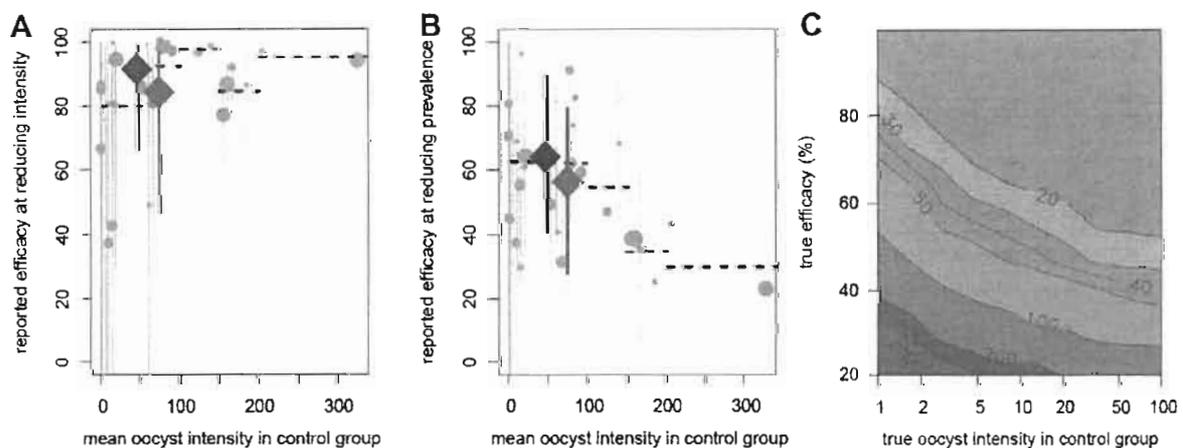


Fig. 4. The range of efficacies seen for a single transmission blocking intervention (TBI) candidate calculated using oocyst intensity (A) or prevalence (B). Each grey point indicates a paired *Plasmodium berghei* – *Anopheles stephensi* assay with the size of the point representing the mean number of mosquitoes dissected in the experiment. Vertical lines indicate 95% confidence interval estimates. Black dotted lines show the average result pooling experiments of similar oocyst intensities in the control group together (bin range, 0–50, 50–100, 100–150, 150–200, 200+). The large red point indicates the average efficacy of the candidate (estimated using Eq. (1)) whilst the blue point shows estimates derived using a mixed-effects model. (C) The minimum number of mosquitoes that need to be dissected to ensure that observed TBI efficacy is within 10% of the true efficacy using the mixed-effects model. This method substantially reduces the number of mosquitoes that need to be dissected compared with the traditional method (Fig. 3C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

which fail to account for this variability risk describing inaccurate TBI efficacies and, subsequently, differences between different TBI candidates when they do not exist. Ideally multiple feeders and cages should be used for each feed and it is suggested the results be analysed using GLMMs. This multi-level analysis allows a single estimate of the TBI efficacy to be estimated (the fixed effect) whilst allowing the level of infection in the different assays (i.e. using different sources of blood, feeders or cages) to vary at random (the random effect, see Bolker et al., 2009). GLMMs can allow the error structure of the data to be described by a variety of different statistical distributions. This is particularly appealing when dealing with intensity data since it will reduce the variability associated with the overdispersed data. These models also allow the overall estimate to be weighted by the certainty in the individual feeding estimates (determined by the number of mosquitoes dissected), something which is ignored using the current standard method. The advantages of using a GLMM as opposed to Eq. (1) are illustrated in Fig. 4C (in comparison with Fig. 3F). Using the GLMM estimates of efficacy are higher for both oocyst prevalence (64.0% versus 56.5%) and intensity (91.5% versus 84.3%), and for the later the 95% confidence region is reduced by 43%.

The data in Fig. 4 also illustrates how the efficacy of a TBI candidate, calculated by reductions in oocyst prevalence, decreases the higher the oocyst intensity in the control group (Fig. 4B). Interestingly, if efficacy is estimated as changes in oocyst intensity then the candidate has approximately the same efficacy irrespective of the oocyst intensity in the control group (Fig. 4A) – this can be shown statistically by including control oocyst intensity as a covariate in the GLMM; reported efficacy was significantly lower in experiments with control group intensities of >100 (Fig. 4B), where efficacy was reported by reduction in infection prevalence ($P < 0.001$) but not in Fig. 4A, where efficacy was reported by reduction in infection intensity ($P = 0.11$).

4. Discussion

Recognising the central importance of developing effective TBIs to achieving the recently rediscovered objectives of local elimination and global eradication of malaria, and the established current central role of the SMFA in evaluating such interventions, the technique has been re-analysed using a substantial body of data gathered by this method on both model rodent (*P. berghei*) and human malaria (*P. falciparum*). Results show that: (i) reductions in oocyst prevalence and intensity follow predictable relationships, (ii) a single TBI investigated in great detail (anti *Pbs28* mAb 13.1) appears, on average, to be equally effective irrespective of the number of parasites ingested within the range tested, (iii) it is suggested that previously published TBI efficacy estimates are highly uncertain due to aggregation of infections in mosquito cohorts and small sample sizes, (iv) different statistical techniques should be used to refine efficacy estimates and optimise power calculations, and (v) it is strongly recommended that for every SMFA carried out authors should report changes in oocyst prevalence and intensity together with the mean control oocyst number and the number of mosquitoes dissected. These points shall be discussed in turn in relation to some of the technical questions challenging TBI assessment.

Currently the efficacy of transmission blocking vaccines (Carter, 2001), drugs (Delves et al., 2012) and other interventions (Cirimotich et al., 2011) are most commonly estimated as a reduction in oocyst prevalence, oocyst intensity or both. Simply giving point estimates of efficacy fails to understand that these results, and their associated uncertainty, will depend on the specific variables of the experiment from which they were derived. Key variables that are rarely made explicit include the fact that blockade

was achieved at a particular intensity of exposure (as measured by the mean oocyst number in the control group), and with an accuracy determined by the number of experimental infections and the number of mosquitoes dissected in each experiment. This paper has outlined how these variables have a substantial and predictable impact upon the results reported.

It could be argued that the prevalence of mosquito infection is more important in epidemiological terms than intensity. It is therefore tempting to estimate TBI efficacy as a reduction in oocyst prevalence since detecting significant changes in the number of infected/uninfected is not complicated by highly infected mosquitoes. This method has the advantage in that it is quicker (a microscopist does not need to count oocysts, just detect their presence/absence) and is easily mechanised using oocyst-specific markers (e.g. *P. berghei* PbGFPCON 259c12 (Vlachou et al., 2004), which produces ookinetes and oocysts expressing GFP in vivo). However, using oocyst prevalence alone as a measure for efficacy has a number of pitfalls. Firstly evidence indicates that the reduction in the number of infected mosquitoes will depend on the parasite exposure, with it being much easier to show reductions in oocyst prevalence if there is a low or intermediate (<50%) oocyst prevalence in the control group. Secondly, in highly infected mosquitoes small changes in oocyst prevalence can mask large differences in oocyst intensity. This can be seen in Fig. 2A where increasing the oocyst prevalence from 90% to 95% would increase oocyst intensity by more than 2.6-fold (from a mean of 87–230). Ultimately, investigators will need all information to assess different TBI candidates so that observed inhibition should be described for each pair of assays, citing both oocyst intensity and prevalence, and the experimental constraints of sample size and control oocyst number.

The clear relationship between oocyst prevalence and intensity, and their respective reductions, will allow epidemiologists to predict how effective an intervention will be at reducing both the number of infected bites and perhaps the number of parasites within these bites. This will allow the results from laboratory assays to be extrapolated to the field, allowing scientists who use different metrics (such as EIR) to communicate effectively. The most effective reduction in the prevalence of oocysts will be when the mean oocyst intensity in wild caught mosquitoes is at its lowest. This is encouraging, recognising that oocyst counts from wild caught mosquitoes are typically very low (Rosenberg, 2008), and that in the majority of malaria-infected areas of the globe, the EIR is reported to be less than one (Gething et al., 2010). Our ability to predict what impact a TBI will have in the field depends on whether TBI candidates have approximately the same efficacy at reducing oocyst intensity, irrespective of intensity of infection in the control group (Fig. 4A). In this study there were only sufficient repeat assays of a single intervention to do this statistical analysis once; we would therefore strongly advise other candidates to be tested in this thorough way (i.e. using gametocyte exposures that generate a wide range of oocyst intensity/prevalence estimates in the control group).

Over the years the SMFA has been refined to maximise transmission. This has been so successful that some laboratories can repeatedly achieve levels of infection with very high oocyst densities, both in laboratory models (Farrance et al., 2011) and using field populations of human parasites (Harris et al., 2012). With such high control oocyst intensities, and recognising the prevalence/intensity relationship described in Fig. 2, it is not surprising that SMFAs have been used to estimate changes in oocyst intensity in order to evaluate TBIs and understand the dynamics of the mosquito immune system. The ability of a TBI candidate to reduce oocyst prevalence has been shown to depend on parasite exposure (as measured by the number of oocysts in the control group, Fig. 4B). As shown in Fig. 2B, just because an intervention fails to achieve a sufficient reduction in oocyst prevalence at high parasite

exposures does not mean that it will not achieve this in field settings. To fully evaluate the effectiveness of a TBI, mosquitoes should be fed on hosts with a wide range of gametocyte densities and not just those with the highest counts. This may involve feeding mosquitoes on hosts with sub-microscopic gametocytemia (Schneider et al., 2007).

There are a number of different reasons why the results of separate SMFAs might provide different readouts for a single intervention. These can be broadly categorised as either 'host' effects (for example differences in immunological responses) or due to intra-laboratory experimental variation when performing the assay (different conditions in the cage or feeding apparatus). Both of these sources of variability need to be embraced to enable different TBI candidates to be compared accurately. Ideally, multiple experimental replicates and mosquito populations should be used with a number of different parasite preparations and the results analysed in a GLMM. This is potentially impractical to perform for each individual assay. We suggest laboratories should estimate their individual SMFA-variability once and use this information to adjust the precision of subsequent feeding experiments. Our data suggests that the number of oocysts in mosquitoes feeding on the same blood sample is best described using a zero-inflated negative binomial distribution. Using a statistical method (such as GLMMs) that takes this distribution into account when analysing oocyst intensity data will reduce the number of mosquitoes that need to be dissected in order to achieve a statistically significant result. To carry out this type of statistical analysis requires individual oocyst counts from all dissected mosquitoes, something that has rarely been made available in the past once mean estimates have been reported.

Swellengrebel (as reported in Boyd and Stratman-Thomas, 1933) advocated that field studies examining malaria infections in mosquitoes should examine a minimum of 100 mosquitoes, and if at that point the estimate of mean oocyst intensity remains variable, that the sample size be continuously expanded until stable values are reached. This commendable ideal is unfortunately not a practical approach to the SMFA. The number of mosquitoes that needs to be dissected will depend on the question under investigation, the certainty with which the null hypothesis is rejected (the study's power) and the type of statistical analysis that will be carried out. It will also depend on the number of experimental feeds to be carried out and the degree of intra-assay variability (as there is no benefit in having highly precise estimates from a single assay if there is considerable intra-assay variability). This paper clearly illustrates that the number of mosquitoes to be dissected will also depend on parasite exposure. Generally, the higher the intensity in the control group, the fewer mosquitoes that need to be dissected. Should the scientific community continue estimating efficacy as reductions in oocyst intensity using the standard method (Eq. 1), it must be acknowledged that a single SMFA will require >100 mosquitoes to be dissected to ensure that the recorded efficacy is within 10% of the true efficacy, if that efficacy is 80% or less (Fig. 3C). Fig. 3 can help inform this decision (a worked example of this is given in Supplementary Data S2). Ultimately no TBI efficacy estimate should be given without an expression of the uncertainty around the point estimate. This can be simply calculated using the GLMM or generated using bootstrapping methodology using the traditional method (Eq. 1).

Perhaps the most frustrating aspect of this discussion is our need to conclude the analysis at the point of oocyst burden. Surprisingly, despite extensive studies (Boyd and Stratman-Thomas, 1933; Vaughan et al., 1992, 1999; Pumpuni et al., 1997; Beier, 1998; Frischknecht et al., 2004; Medica and Sinnis, 2005; Zollner et al., 2006; Kebaier et al., 2009; Conteh et al., 2010) it is only in *P. berghei* that the relationship between oocyst number and salivary gland sporozoite burden has been described (Dawes et al.,

2009a), and for no species is the relationship between the gross salivary gland sporozoite load and the contribution of the mosquito to overall transmission known (the mosquito to human basic reproduction number). This needs urgent resolution as without this knowledge the impact that partially effective TBIs can have on person-to-person transmission cannot easily be assessed.

Acknowledgements

We wish to acknowledge Kazutoyo Miura (National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), USA), Carole Long (NIAID) and Adrian Hill (The Jenner Institute, UK) for scientific input during the preparation of this study, and Mark Tunnicliff, Ursula Straschil and Sara Zakutansky for technical assistance. TSC is supported by a Junior Research Fellowship from Imperial College London, UK and AMB is funded by the Fraunhofer Institute (Delaware, USA). MD is funded by the Bill and Melinda Gates Foundation and Medicines for Malaria Venture, USA. Funding for the data collection was provided by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreements Nu 242095 and Nu223736. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. All procedures were performed in accordance with the terms of the UK Animals (Scientific Procedures) Act Project Licence and were approved by the University of Oxford Animal Care and Ethical Review Committee (PPL 30/2414) and the Imperial College Ethical Review Committee (PPL 70/6347). The Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) Assurance for Imperial College covers all Public Health Service (PHS) supported activities involving live vertebrates in the US (#A5634-01). Pooled human red blood cells and sera were purchased from the National Blood Service (UK). No ethics approval was therefore obtained for the use of human sera or red blood cells specifically but the Imperial College Ethical Review Committee reviewed all of the procedures undertaken.

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.ijpara.2012.09.002>.

References

- 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.
- Beier, J.C., 1998. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 519–543.
- Billingsley, P.F., Medley, G.F., Charlwood, D., Sinden, R.E., 1994. Relationship between prevalence and intensity of *Plasmodium falciparum* infection in natural populations of *Anopheles* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 260–270.
- Blagborough, A.M., Delves, M.J., Ramakrishnan, C., Lal, K., Butcher, G.A., Sinden, R.E., 2012. Assessing transmission-blockade in *Plasmodium* spp. In: *Malaria Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ (Chapter 7.6).
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H., White, J.S., 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 24, 127–135.
- Boyd, M.F., 1949. Epidemiology: factors related to the definitive host. In: Boyd, M.F. (Ed.), *Malariology*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 608–697.
- Boyd, M.F., Stratman-Thomas, W.K., 1933. Studies on benign tertian malaria. 2. The clinical characteristics of the disease in relation to the dosage of sporozoites. *Am. J. Hyg.* 17, 666–685.
- Carter, R., 2001. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* 19, 2309–2314.
- Cirimotich, C.M., Clayton, A.M., Dimopoulos, G., 2011. Low- and high-tech approaches to control *Plasmodium* parasite transmission by *Anopheles* mosquitoes. *J. Trop. Med.* 2011, 891342.
- Conteh, S., Chattopadhyay, R., Anderson, C., Hoffman, S.L., 2010. *Plasmodium yoelii*-infected *A. stephensi* inefficiently transmit malaria compared to intravenous route. *PLoS ONE* 5, e8947.

- Dawes, E.J., Churcher, T.S., Zhuang, S., Sinden, R.E., Basáñez, M.G., 2009a. *Anopheles* mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malar. J.* 8, 228.
- Dawes, E.J., Zhuang, S., Sinden, R.E., Basáñez, M.G., 2009b. The temporal dynamics of *Plasmodium* density through the sporogonic cycle within *Anopheles* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1197–1198.
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E.A., Sinden, R.E., Leroy, D., 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* 9, e1001169.
- Farrance, C.E., Rhee, A., Jones, R.M., Musiychuk, K., Shamloul, M., Sharma, S., Mett, V., Chichester, J.A., Streatfield, S.J., Roeffen, W., van de Vegte-Bolmer, M., Sauerwein, R.W., Tsuboi, T., Muratova, O.V., Wu, Y., Yusibov, V., 2011. A plant-produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of *Plasmodium falciparum*. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1351–1357.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., Menard, R., 2004. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell. Microbiol.* 6, 687–694.
- Gething, P.W., Patil, A.P., Smith, D.L., Guerra, C.A., Elyazar, I.R., Johnston, G.L., Tatem, A.J., Hay, S.I., 2010. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar. J.* 10, 378.
- Graves, P.M., Carter, R., McNeill, K.M., 1984. Gametocyte production in cloned lines of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 1045–1050.
- 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.
- Ifediba, T., Vanderberg, J.P., 1981. Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature* 294, 364–366.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Waters, A.P., 2006. High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 60–70.
- Kebaier, C., Voza, T., Vanderberg, J., 2009. Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium* sporozoites in mice. Fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. *PLoS Pathog.* 5, e1000399.
- Lensen, A., Bril, A., van de Vegte, M., van Gemert, G.J., Eling, W., Sauerwein, R., 1999. *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 91, 101–103.
- Medica, D.L., Sinnis, P., 2005. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect. Immun.* 73, 4363–4369.
- Medley, G.F., Sinden, R.E., Fleck, S., Billingsley, P.F., Tirawanchai, N., Rodriguez, M.H., 1993. Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector. *Parasitology* 106, 441–449.
- Ponnudurai, T., van Gemert, G.J., Bensink, T., Lensen, A.H., Meuwissen, J.H., 1987. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum*: its variability with gametocyte numbers and concentration of antibody. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 491–493.
- Pumpuni, C.B., Mendis, C., Beier, J.C., 1997. *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity varies as a function of sporozoite loads in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J. Parasitol.* 83, 652–655.
- Rosenberg, R., 2008. Malaria: some considerations regarding parasite productivity. *Trends Parasitol.* 24, 487–491.
- Schneider, P., Bousema, J.T., Gouagna, L.C., Otieno, S., van de Vegte-Bolmer, M., Omar, S.A., Sauerwein, R.W., 2007. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 470–474.
- Shaukat, A.M., Breman, J.G., McKenzie, F.E., 2010. Using the entomological inoculation rate to assess the impact of vector control on malaria parasite transmission and elimination. *Malar. J.* 9, 122.
- Sinden, R.E., 1996. Infection of mosquitoes with rodent malaria. In: Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis, C. (Eds.), *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 67–91.
- Sinden, R.E., 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell. Microbiol.* 4, 713–724.
- Smith, D.L., Dushoff, J., Snow, R.W., Hay, S.I., 2005. The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Nature* 438, 492–495.
- Smith, T.A., Chitnis, N., Briet, O.J., Tanner, M., 2011. Uses of mosquito-stage transmission-blocking vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 27, 190–196.
- van der Kolk, M., De Vlas, S.J., Saul, A., van de Vegte-Bolmer, M., Eling, W.M., Sauerwein, R.W., 2005. Evaluation of the Standard Membrane Feeding Assay (SMFA) for the determination of malaria transmission-reducing activity using empirical data. *Parasitology* 130, 13–22.
- Vaughan, J.A., Noden, B.H., Beier, J.C., 1992. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.* 78, 716–724.
- Vaughan, J.A., Scheller, L.F., Wirtz, R.A., Azad, A.F., 1999. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials. *Infect. Immun.* 67, 4285–4289.
- Vlachou, D., Zimmermann, T., Cantera, R., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C., 2004. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell. Microbiol.* 6, 671–685.
- Zollner, G.E., Ponsa, N., Garman, G.W., Poudel, S., Bell, J.A., Sattabongkot, J., Coleman, R.E., Vaughan, J.A., 2006. Population dynamics of sporogony for *Plasmodium vivax* parasites from western Thailand developing within three species of colonized *Anopheles* mosquitoes. *Malar. J.* 5, 68.

Anopheles rufipes remains a Potential Malaria Vector after the First Detection of Infected Specimens in 1960 in Burkina Faso

Da DF¹, Diabaté A¹, Mouline K², Lefèvre T^{2,3}, Awono-Ambene HP⁴, Ouédraogo JB¹ and Dabiré KR^{1*}

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Burkina Faso

²IRD/IRSS, Burkina Faso

³Universités Montpellier 1 & 2, Centre IRD, France

⁴Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Cameroon

Abstract

Malaria transmission is assured in Africa mainly by the species of the complex *Anopheles gambiae* followed by *Anopheles funestus*. But as the malaria elimination is becoming more and more realistic, it is crucial to consider all vectors involved in *Plasmodium* transmission even though in local scale. In this prospect we performed this study to confirm if *Anopheles rufipes* remains potentially able to transmit *Plasmodium* since former findings reported this species to be potential malaria vector in Burkina Faso toward 1960. Our data recorded one female of *An. rufipes* infected by a *Plasmodium* parasite at the oocyst stage suggesting that this mosquito species still remains a potential human malaria vector. However, future field and laboratory studies are needed to confirm *An. rufipes* vector competence and capacity.

Keywords: *Anopheles rufipes*; Infection; Oocyst, *Plasmodium falciparum*; Vector

Introduction

The parasite *Plasmodium falciparum* is responsible for the majority of deaths due to malaria worldwide, particularly amongst children less than five years of age and pregnant women living in sub-Saharan Africa [1]. This parasite is transmitted through infected bites of female mosquitoes belonging to the genus *Anopheles*. Only few *Anopheles* species are involved in malaria parasite transmission in Africa. In Burkina Faso and other West African countries, *Anopheles gambiae* s.s. Giles (now confirmed as a complex of two species, namely *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*) [2], *Anopheles arabiensis* Patton and *Anopheles funestus* Giles have been associated with the highest entomological inoculation rates for several decades [3-6]. In the past, *Anopheles nili* was also a major malaria vector species in the south-western region of the country, although its population has decreased drastically over the two latest decades due to environmental modification by human activity [3]. The potential epidemiological role of other species such as *Anopheles rufipes* was also demonstrated in the north and south-west localities of Burkina Faso by Holstein [7]. Despite the fact that specimens of *An. rufipes* were found infested by *Plasmodium* oocysts in the field several decades ago, further investigations including field surveillance of malaria transmission are needed to better assess the potential role and implication of this species in local malaria transmission system. In 2008, during entomological surveys, *An. rufipes* mosquitoes were frequently found, in large numbers, at the end of the rainy season (October-November) in homes of the village of Soumouso. Based on this observation, we included *An. rufipes* in the panel of major malaria vectors (*An. gambiae* sl and *An. funestus*) from which routine infection rates were estimated. The overall goal of this paper is to re-evaluate whether, a couple of decades after the previous data, if *An. rufipes* remains competent for *Plasmodium* infection.

Materials and Methods

Sampling site

Soumouso (11°00'46"N, 4°02'45"W) is a typical Guinean savannah village located approximately 55 km East of Bobo-Dioulasso, the second largest town of Burkina Faso. There are two distinct seasons over the year. The rainy season occurs from May to October, with an annual average of rainfall of 1000-1200 mm. *Anopheles* breeding sites

consist mainly of rain-filled puddles and a semi-permanent swamp. Four main malaria vectors are found in this village, including both molecular forms M and S (respectively *An. coluzzii* and *An. gambiae*, see above) of *An. gambiae*, *An. funestus*, and *An. nili*. *An. arabiensis* is occasionally reported at low frequency (<5% of *An. gambiae* s.l. samples). *An. rufipes* is also reported towards the end of the rainy season but as it has been considered a non-vector species, its bionomic and dynamics have not been considered until now.

Mosquito collection and infection detection

During October and November 2008, resting wild blood-fed female mosquitoes (including *An. gambiae* sl, *An. funestus* and *An. rufipes*) were caught using a mouth aspirator in the living room of human dwellings early in the morning [8]. They were kept under in sectary conditions for 5 days in IRSS lab, until all surviving mosquitoes were dissected in 2% mercurochrome and their midguts examined for *Plasmodium* oocyst infection. Mosquitoes were morphologically identified [9,10]. The carcasses of all dissected mosquitoes were then used for CSP ELISA tests according to the protocol of Burkot et al. [11], modified by Wirtz et al. [12].

Results and Discussion

Out of a total of 729 mosquitoes dissected in October and November 2008, *An. gambiae* s.l. was predominant (58.44%), followed by the significant presence of *An. funestus* (29.63%) and *An. rufipes* (11.93%). The dissection revealed a highly variable distribution of the number of oocysts (from 1 to 100) in the infected females. In particular, the single oocyst-positive *An. rufipes* harbored five oocysts. Estimation of the prevalence of the infection was focused

*Corresponding author: Dabiré KR, BP 390 IRSS/Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Tel: +226 70 73 90 69; E-mail: dabire_roch@hotmail.com

Received July 23, 2013; Accepted September 11, 2013; Published September 13, 2013

Citation: Da DF, Diabaté A, Mouline K, Lefèvre T, Awono-Ambene HP, et al. (2013) *Anopheles Rufipes* remains a Potential Malaria Vector after the First Detection of Infected Specimens in 1960 in Burkina Faso. J Infect Dis Ther 1: 112. doi:10.4172/2332-0877.1000112

Copyright: © 2013 Da DF, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

on a qualitative assessment. The results showed that 4.69 % (20/426) of *An. gambiae* s.l. females dissected were positive for the presence of oocyst compared to *An. funestus* and *An. rufipes*, respectively, with 1.85 % (4/216) and 1.15% (1/87). No *An. rufipes* or *An. funestus* mosquitoes were found positive for sporozoite detection by ELISA-CSP, while some of them were oocyst-positive. Several non-mutual exclusive hypotheses may explain this pattern. Firstly, some studies have revealed the existence of a barrier to infection between mosquito midgut and salivary glands. In particular, some mosquito immune pathways appear to specifically target the sporozoites and prevent their migration [13-15]. It is therefore possible that while *An. funestus/rufipes* are permissive hosts to *Plasmodium* oocyst stages, they are not competent for the sporozoites stages. Second, it is possible that, in Soumouso, populations of *An. rufipes* and *An. funestus* do not live long enough to transmit the plasmodium sporozoites compared to *An. gambiae*. This may be due to several factors including intrinsic genetic differences impacting adult lifespan, or a relatively higher sensitivity to pyrethrinoids used for the impregnation of long-lasting insecticide nets compared to *An. gambiae* [3]. Finally, when uninfected *An. rufipes* and *An. funestus* may have the same adult longevity as *An. gambiae* but display decreased longevity when infected possibly because of a lower tolerance to malaria infection.

In addition to the undeniable positivity found in the single female at oocyst stage, recent preliminary findings gathered in our lab using experimental *Plasmodium falciparum* infections, have shown that *An. rufipes* can be infected with sporozoites (Mouline, unpublished results). Thus, based on the assumption that any positive mosquito at oocyst stage should carry sporozoite stages later, we have estimated the overall *Plasmodium* prevalence per female, by combining positive mosquitoes with oocyst and/or sporozoites. Thus, the infection rates reached 27.93% for *An. gambiae* sl, 1.85% for *An. funestus* and 1.15% for *An. rufipes* (Table 1). The infection rate was significantly higher for *An. gambiae* than *An. funestus* ($P < 0.0001$, $df = 1$). In previous studies, the susceptibility of *An. rufipes* to *Plasmodium* infection was estimated among a total of 9 females examined [7]. The same authors also reported few specimens of *An. rufipes* with sporozoites in the salivary glands in Oursy, a locality of the northern region of Burkina Faso (formerly known as Haute-Volta). Our study demonstrates that *An. rufipes* mosquitoes can continue to serve as a potential malaria parasite vector species in specific areas of Burkina Faso. However, its real contribution to malaria epidemiology in Burkina Faso should be better investigated. Current mosquito control strategies are targeting malaria vectors belonging to the *An. gambiae* complex of species. Such studies that underline the potential role of other vector species such as *An. funestus*, *An. nili* and *An. rufipes* in malaria transmission intensity could serve to improve malaria control programs in Burkina Faso.

Conclusion

The detection of *Plasmodium* oocysts in *An. rufipes* in the field suggests that this species is potentially capable to serve as a malaria vector mosquito. Due to their significance among the local vector population from specific locations in Burkina Faso, a routine entomological surveillance is required to better elucidate its vector capacity.

Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was funded by MIM project n°A40057 granted to Dr Parfait Awono (OCEAC) and to the IRSS as co-investigating team. The authors are grateful to the villagers of Soumouso for their contribution and cooperation during sample collection. We are grateful to an anonymous reviewer for his constructive comments, which increased the quality of our manuscript.

References

- WHO (2012) WHO Global Malaria Program: World Malaria Report 2012 WHO.
- Coetzee M, Koekemoer LL (2013) Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol* 58: 393-412.
- Dabiré KR, Baldet T, Diabaté A, Dia I, Costantini C, et al. (2007) *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol* 44: 990-997.
- Dia I, Diop T, Rakotoarivony I, Kengne P, Fontenille D (2003) Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol* 40: 279-283.
- Robert V, Carnevale P, Ouedraogo V, Petrarca V, Coluzzi M (1988) [Transmission of human malaria in a savanna village of South-West Burkina Faso]. *Ann Soc Belg Med Trop* 68: 107-121.
- Robert V, Gazin P, Boudin C, Molez JF, Ouedraogo V, et al. (1985) [The transmission of malaria in a wooded savannah area and a rice-growing area around Bobo Dioulasso (Burkina Faso)]. *Ann Soc Belg Med Trop* 65 Suppl 2: 201-214.
- Holstein M (1960) Un nouveau vecteur du paludisme en A.O.F., *Anopheles rufipes* Gough 1910. *Entomologie Médicale et Vétérinaire - Office de la Recherche Scientifique d'Outre-Mer* N° 379.
- Anthony TG, Trueman HE, Harbach RE, Vogler AP (2000) Polymorphic microsatellite markers identified in individual *Plasmodium falciparum* oocysts from wild-caught *Anopheles* mosquitoes. *Parasitology* 121: 121-126.
- Gillies MT, Coetzee MC (1987) A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg n°55:143p.
- Gillies MT, De Meillon B (1968) The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg n°55:143p.
- Burkot TR, Graves PM, Cattani JA, Wirtz RA, Gibson FD (1987) The efficiency of sporozoite transmission in the human malarial, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bull World Health Organ* 65: 375-380.
- Wirtz RA, Burkot TR, Graves PM, Andre RG (1987) Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol* 24: 433-437.
- Gamego-Mendis AC, Rajakaruna J, Weerasinghe S, Mendis C, Carter R, et al. (1993) Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 3-6.
- Rosenberg R, Rungsiwongse J (1991) The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg* 45: 574-577.
- Vaughan JA, Noden BH, Beier JC (1994) Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 51: 233-243.

	Oocyst stage		Sporozoite stage		Prevalence of infection
	Positive	Negative	Positive	Negative	
<i>An. gambiae</i> (N=426)	04.69% (20/426)	95.31% (406/426)	25.35% (108/426)	74.65% (318/426)	27.93% (119/426)
<i>An. funestus</i> (N=216)	01.85% (4/216)	98.15% (212/216)	00.00% (0/216)	100.00% (216/216)	01.85% (4/216)
<i>An. rufipes</i> (N=87)	01.15% (1/87)	98.85% (86/87)	00.00% (0/87)	100.00% (87/87)	01.15% (1/87)

N: Total number of mosquitoes for each species; n: number of mosquitoes for te

Table 1: Summary of mosquito infectivity in the field for different species [% (n/N)].

Title: Comparative Assessment of Viral-Vectored Transmission-Blocking

Vaccine Candidates against *Plasmodium falciparum*

Authors:

M. C. Kapulu¹, **D. F. Da**², K. Miura³, Yuanyuan Li¹, A. M. Blagborough⁴, T. S. Churcher⁵, A. R. Williams¹, A. L. Goodman¹, I. Sangaré², A. V. Turner¹, M. G. Cottingham¹, A. Nicosia^{6,7,8}, U. Straschil⁴, T. Tsuboi⁹, S. C. Gilbert¹, Carole A. Long³, R. E. Sinden^{1,4}, S. J. Draper¹, A. V. S. Hill¹, A. Cohuet², and S. Biswas^{1*}

Affiliations:

¹Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, OX3 7DQ, UK.

²Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) et Institut de Recherche pour le Développement (IRD) - UMR MIVEGEC, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

³Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Disease/ National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA.

⁴Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College London, London, UK.

⁵Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London, UK.

⁶Okairòs AG, Rome, Italy.

⁷CEINGE, Naples, Italy.

⁸Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Naples, Italy.

⁹Cell-Free Science and Technology Research Centre, Ehime University, Ehime, Japan.

*To whom correspondence should be addressed: sumi.biswas@ndm.ox.ac.uk.

One Sentence Summary: Prime-boost vaccination with viral vectors expressing Pfs230-C or Pfs25 give complete transmission-blocking efficacy against both laboratory and field isolates of *Plasmodium falciparum* in two different *Anopheles* species.

Abstract:

Malaria transmission-blocking vaccines (TBVs) target the development of *Plasmodium* parasites within the mosquito, with the aim of preventing the transmission of the parasite from one infected individual to another. Different vaccine platforms, mainly protein-in-adjuvant formulations delivering a range of candidate antigens, have been developed independently and varied transmission-blocking activities have been reported. Surprisingly, the leading TBV candidate antigens have not been compared using a single delivery system to determine which antigen(s) merit further clinical development. Here, recombinant chimpanzee adenovirus 63, ChAd63, and modified vaccinia virus Ankara, MVA, expressing AnAPN1, Pfs230-C, Pfs25, and Pfs48/45 (with or without N-glycosylation site substitution; Pfs48/45_{+NGln} and Pfs48/45_{.NGln}) were generated. Antibody responses primed individually against all five antigens by ChAd63 immunization in BALB/c mice were boosted by the administration of recombinant MVA expressing the same antigen. These antibodies exhibited a hierarchy of inhibitory activity against the NF54 laboratory strain of *P. falciparum* in *Anopheles stephensi* mosquitoes using the standard membrane feeding assay (SMFA), with anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 antibodies giving complete blockade. The observed rank order of inhibition against NF54 was replicated against *P. falciparum* African field isolates in *Anopheles gambiae* in a direct membrane feeding assay (DMFA). The transmission-blocking activity achieved was dependent on the concentration of IgG used. This study provides the first head-to-head comparative analysis of leading TBV candidate antigens using two different parasite sources in two different vector species, and can be used to guide selection of TBV candidate antigens for future clinical development.

Introduction:

Malaria is still one of the world's major infectious diseases and exerts a devastating burden on global public health. The development of an effective vaccine against *Plasmodium falciparum* remains an important but elusive goal, to date, only low-level efficacies have been achieved by a handful of approaches in clinical studies (1). The most advanced malaria vaccine candidate, currently in Phase III clinical trials, is based on the circumsporozoite protein (CSP), and aims to prevent infection of the vaccinated host (2). Transmission-blocking vaccines (TBVs) target antigens expressed by the transmissible sexual-stages of the parasite, as well as those expressed by the mosquito, and aim to reduce and/or block transmission to the vertebrate host (3, 4). Pre-clinical studies investigating TBVs have led to the discovery and development of a number of *P. falciparum* antigens as vaccine candidates of which Pfs230, Pfs25, and Pfs48/45 are the most thoroughly characterized. Different vaccine platforms utilizing these antigens have been used to raise antibodies with demonstrable transmission-blocking activity (TBA) (5). However, to date only Pfs25 and its ortholog in *P. vivax*, Pvs25, have been tested in Phase Ia clinical trials (6, 7). Pfs25 is expressed during macrogametogenesis within the mosquito midgut and persists throughout zygote, ookinete and early oocyst development. Pfs25 antigen-specific IgG demonstrate TBA and titer correlates with ability to block parasite infectivity (8-10). On the other hand, Pfs230 and Pfs48/45 are expressed on the surface of gametocytes within the human host as well as having clear roles in gamete-gamete recognition within the vector blood meal (11, 12). Individuals living in malaria endemic areas can naturally develop antibodies against these two antigens (13-16).

Recently it has been shown that mosquito midgut ligands that mediate parasite invasion can also be targeted as TBV candidate antigens. Expressed midgut proteins of *Anopheles stephensi* and *Anopheles gambiae* such as carboxypeptidase B (4, 17, 18) and a 135 amino acid fragment of the *A. gambiae* midgut glycoprotein, alanyl aminopeptidase N1 (AnAPN1) has been developed as potential TBV candidates. Antibodies raised against this fragment of AnAPN1 have demonstrated TBA in studies using both *P. falciparum* and *P. berghei* parasites in two different anopheline species, *A. gambiae* and *A. stephensi* (19).

Despite the lack of any reported comparison of TBA, Pfs230, Pfs25 and Pfs48/45 are currently considered the leading TBV candidate antigens. Their ability to induce a transmission-blocking response have been examined in different laboratories, antigens have been expressed mainly as recombinant proteins produced in a variety of heterologous expression systems as well as delivered using vectored vaccine technologies. Such expression systems have included plant-based expression, a wheat-germ cell-free platform, DNA vaccines, baculovirus, vaccinia virus, *Escherichia coli*, and yeast. (20-36). Recombinant proteins have often been delivered with adjuvants using different regimens. The highest TBA has been reported with potent adjuvants such as Freund's adjuvant (which is not suitable for use in humans), whereas adjuvants licensed for human use have induced moderate to high TBA depending on the antigen and immunization regime. Adverse reactions were reported with the use of Montanide ISA-51 in a Phase Ia trial testing Pfs25 which precluded its subsequent use (6).

The development of some TBVs, especially members of the six-cysteine family of proteins Pfs230 and Pfs48/45, has been significantly hampered by the difficulties associated with the expression of full-length, correctly folded native protein. The induction of transmission-blocking (TB) antibodies targeting these antigens is critically dependent on conformational correct immunogen (37, 38). In the case of Pfs230, the region spanning amino acids 443-1132, referred

to as region C (Pfs230-C), has been shown to induce the most potent TBA (31). For Pfs48/45, codon harmonization of the native sequence has led to the expression of full-length protein, that induces antibodies giving greater than 95% inhibition of oocyst formation in both rodents and primates when formulated in the Montanide ISA-51 adjuvant (32). Pfs25 protein has been used alone or conjugated to highly immunogenic carriers such as outer-membrane protein complex (OMPC) of *Neisseria meningitidis* serogroup B (39). Pfs25 has been delivered in a heterologous prime-boost regimen using human adenovirus serotype 5 (HuAd5) and modified vaccinia virus Ankara (MVA) viral vectors and the antibodies induced exhibit TBA (40).

Viral vectors have been used in prime-boost regimes primarily for the induction of antigen-specific T cells but HuAd5 and ChAd63, in a prime-boost regimen with MVA, have also been used to induce functional antibodies against blood-stage vaccine candidate antigens in both pre-clinical and Phase I/IIa clinical studies (41-44). Although potent as an antigen delivery vector, HuAd5 has not been favored for translation into the clinic due to the presence of neutralizing antibodies from pre-existing infections in individuals living in malaria endemic areas (45). To circumvent this, chimpanzee adenoviruses that are the target of lower pre-existing neutralizing antibodies have been used (45). This human-compatible delivery system provides a robust and versatile platform to enable the testing and screening of TBV candidate antigens, while avoiding potential differences in potency caused by variable purification and conformational integrity of expressed proteins.

In this study we have used the ChAd63-MVA heterologous prime-boost regime to compare four TBV candidate antigens head-to-head for the first time. We investigated AnAPN1 (AnAPN1_{fl}), Pfs25, Pfs48/45, and region C of Pfs230 (Pfs230-C). We assessed the ability of vaccine-induced IgG against these antigens to inhibit the development of *P. falciparum* oocysts within the mosquito, in order to rationally guide prioritization of these candidates for clinical development. We report that vaccine-induced IgG against Pfs230-C and Pfs25 completely blocked transmission of *P. falciparum* (both the laboratory clone NF54 and field isolates from Burkina Faso).

Results:

Generation and expression of TBV candidate antigens in ChAd63 and MVA viral vectors

Recombinant ChAd63 and MVA vectors expressing Pfs25 were generated previously (40). We designed and generated recombinant ChAd63 and MVA vaccines expressing three additional TBV candidate antigens: AnAPN1 (AnAPN1_{fl}) based on the genome sequence of *A. gambiae* PEST strain; Pfs230-C and two versions of Pfs48/45 (Pfs48/45_{-NGln} and Pfs48/45_{+NGln}) based on the genomic sequence of the *P. falciparum* 3D7 clone (Table 1). For AnAPN1 and Pfs48/45 the signal peptide and glycoposphatidylinositol anchor were not included in the construct. The inserts were used to generate recombinant ChAd63 and MVA expressing the individual respective antigens (Supplementary Methods).

To test the expression of the antigens, pENTR4-LPTOS shuttle plasmid DNA expressing each individual antigen (under the control of the human cytomegalovirus (CMV) major immediate-early promoter (46)) was used to transfect HEK293 cells. Immunoblots of supernatants and cell lysates showed expression of the antigens at the expected size (AnAPN1_{fl} at 112kDa, Pfs230-C at 83.5 kDa, Pfs25 at 22.4kDa and Pfs48/45 at ~50kDa) (Fig. 1). Recombinant proteins were detected in both supernatant and lysate for AnAPN1_{fl}, Pfs230-C, Pfs25 and Pfs48/45_{-NGln}

suggesting that the incorporation of the tPA signal peptide leads to secretion of the antigen which is thought to be optimal for antibody induction (47-49). Higher molecular weight bands were observed for Pfs230-C (~220kDa) and Pfs48/45_{+NGln} (~100kDa) which could be dimers or a result of protein aggregation. In the case of Pfs48/45_{+NGln} the higher molecular weight protein could be the glycosylated form of the protein.

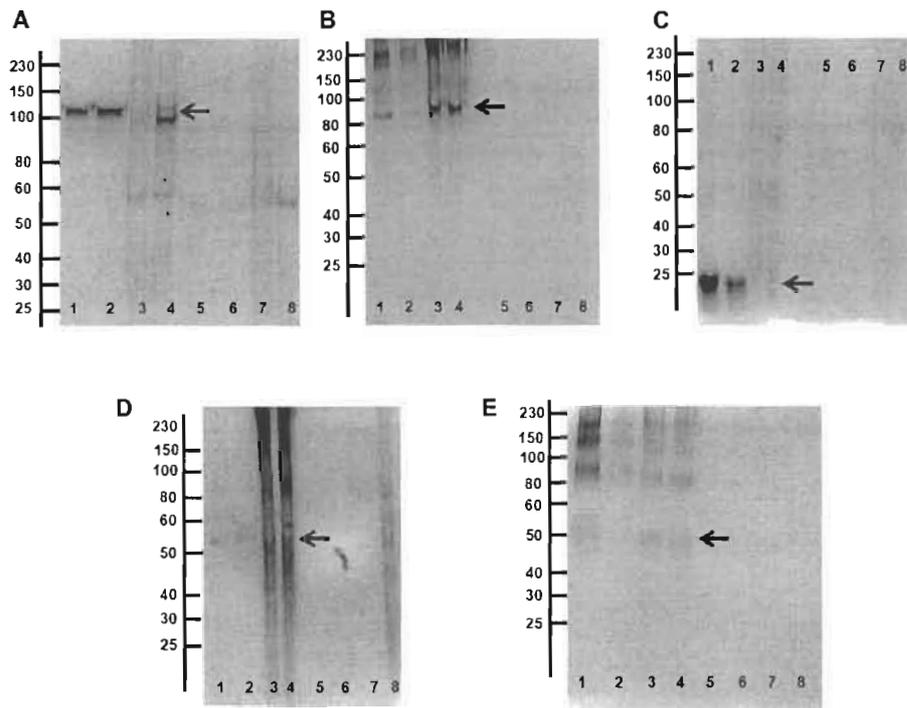


Figure 1: Expression of TBV candidate antigens in adherent HEK293 cells.

pENTR4-LPTOS shuttle plasmid DNA expressing (A) AnAPN1_{fl}, (B) Pfs230-C, (C) Pfs25, (D) Pfs48/45_{-NGln}, and (E) Pfs48/45_{+NGln} was used to transfect HEK293 cells and the supernatant and cell lysate were harvested. The figure shows western blots using day70 anti-serum from after ChAd63_MVA vaccination against the respective antigens. Untransfected supernatant and cell lysate were used as negative controls. Lanes: 1 – antigen-specific supernatant in non-reducing buffer; 2 – antigen-specific supernatant in reducing buffer; 3 – antigen-specific lysate in non-reducing buffer; 4 - antigen-specific lysate in reducing buffer; 5 – 8 control supernatant or lysate respectively. Arrows denote the relative migration mobility expected for each respective antigen.

Heterologous prime-boost immunization induces IgG responses against TBV candidate antigens

We have previously shown that the zygote/ookinete surface antigen, Pfs25, in a HuAd5-MVA heterologous prime-boost vaccine regimen, is able to induce functional antibodies which block the transmission of *P. falciparum* in a standard membrane feeding assay (SMFA) (40). A pilot study was performed to test whether the ChAd63-MVA heterologous prime-boost regimen was able to induce antibodies to AnAPN1_{fl}, Pfs230-C, Pfs48/45_{-NGln}, and Pfs48/45_{+NGln} (Supplementary Materials). Antigen-specific IgG were induced after the priming immunization with ChAd63 expressing the individual antigens which were boosted significantly following the administration of the corresponding recombinant MVA (Fig. S1).

Immune responses observed in the pilot study justified further testing of the longevity of vaccine induced antibody response. It has been previously shown that responses to Pfs25 eight weeks post-prime are similar whether primed with HuAd5 or ChAd63 (40). IgG response in this study were assessed at days 14 and 55 post-prime (Fig. 2). Using Wilcoxon matched-pairs signed rank

test the corresponding recombinant MVA significantly boosted the response to AnAPN1_{fl} ($P=0.008$), Pfs230-C ($P=0.03$) and Pfs48/45_{+NGln} ($P=0.03$). The increase in Pfs25 antibody response after the MVA boost was not statistically significant ($p=0.06$). We have previously reported that MVA significantly boosts the antibody response to Pfs25 primed by HuAd5 (40) and this is reproducible in other experiments when primed with ChAd63. In this particular experiment there was variability in the antibody response in the group of animals vaccinated against Pfs25. The Pfs48/45_{-NGln} ($P=0.09$) antibody response was not significantly boosted by the MVA. When tested against recombinant protein produced using the wheat germ cell-free protein expression system, there was a consistent trend that the vaccine-induced IgG response against Pfs48/45_{+NGln} compared to Pfs48/45_{-NGln} (day70) was higher. In order to assess the longevity of the antibody responses, the animals were monitored for ten and a half months post-boost. The responses were well maintained for all the antigens except Pfs25 (no significant difference between day70 and day350 by Friedman test with Dunn's multiple comparison test).

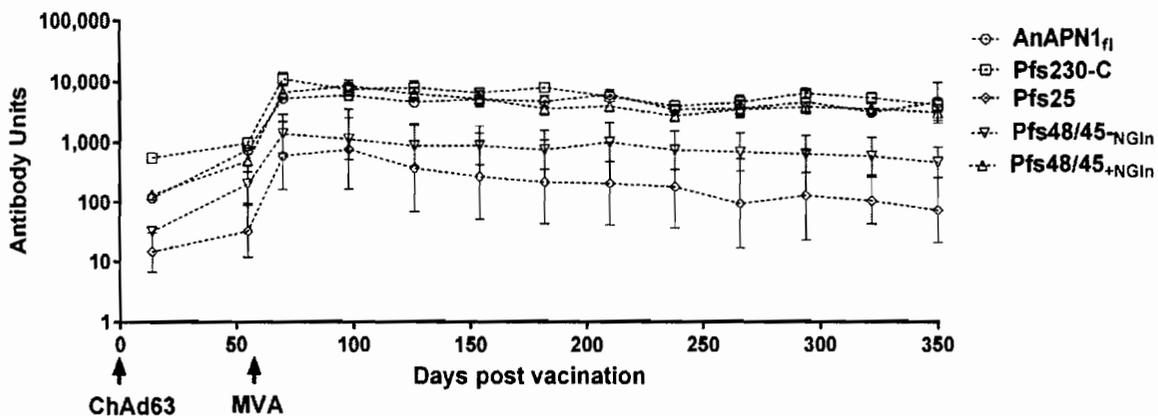


Figure 2: Antigen specific IgG responses in mice after immunization with ChAd63-MVA expressing TBV antigens.

BALB/c mice ($n=5$ /group) were primed with 1×10^8 infectious units (IFU) of ChAd63 (day0) and boosted with 1×10^7 plaque forming units (pfu) of MVA (day56) expressing the individual antigens AnAPN1_{fl}, Pfs230-C, Pfs25, Pfs48/45_{-NGln}, and Pfs48/45_{+NGln}. The figure shows the total IgG response measured by standardized ELISA on days 14, 55, 70 and thereafter every 28 days up to day 350. IgG responses were log-transformed and expressed as antibody units (AU) represented as mean \pm SEM.

Vaccine-induced antibody responses recognize native parasite and mosquito proteins

To determine whether the antibodies induced against Pfs230-C, Pfs25, Pfs48/45_{-NGln}, and Pfs48/45_{+NGln} recognize the respective native parasite proteins, indirect immunofluorescence assays (IFA) were performed on parasite preparations (mature *P. falciparum* gametocytes or Pfs25DR3 *P. berghei* ookinetes) (Fig. 3). Surface staining of macrogametes with vaccine induced anti-Pfs230-C antibodies and ookinetes with anti-Pfs25 antibodies confirmed the ability of the antibodies to recognize native parasite protein. The anti-Pfs48/45_{+NGln} antibodies stained the surface of exflagellating male gametes but no staining was observed with Pfs48/45_{-NGln} antiserum. Naïve and vector control serum (mice immunized with ChAd63-MVA expressing irrelevant antigen) was used as negative control and showed undetectable levels of staining.

Anti-AnAPN1_{fl} serum recognized native AnAPN1 by western blot using midgut lysate, in reducing buffer, from both *A. gambiae* Yaoundé and *A. stephensi* SDA500 with similar banding patterns previously observed and described (19) (Fig. S2A). There was also a positive signal obtained against both strains of *A. gambiae*, Yaoundé and G3 measured using midgut lysate as the coating antigen in an ELISA (Fig. S1A). We also tested the anti-Pfs48/45_{+NGln} and anti-Pfs48/45_{-NGln} serum in a western blot using *P. falciparum* gametocyte lysate and they recognized a protein of ~50kDa, in agreement with the IFA data (Fig. S2).

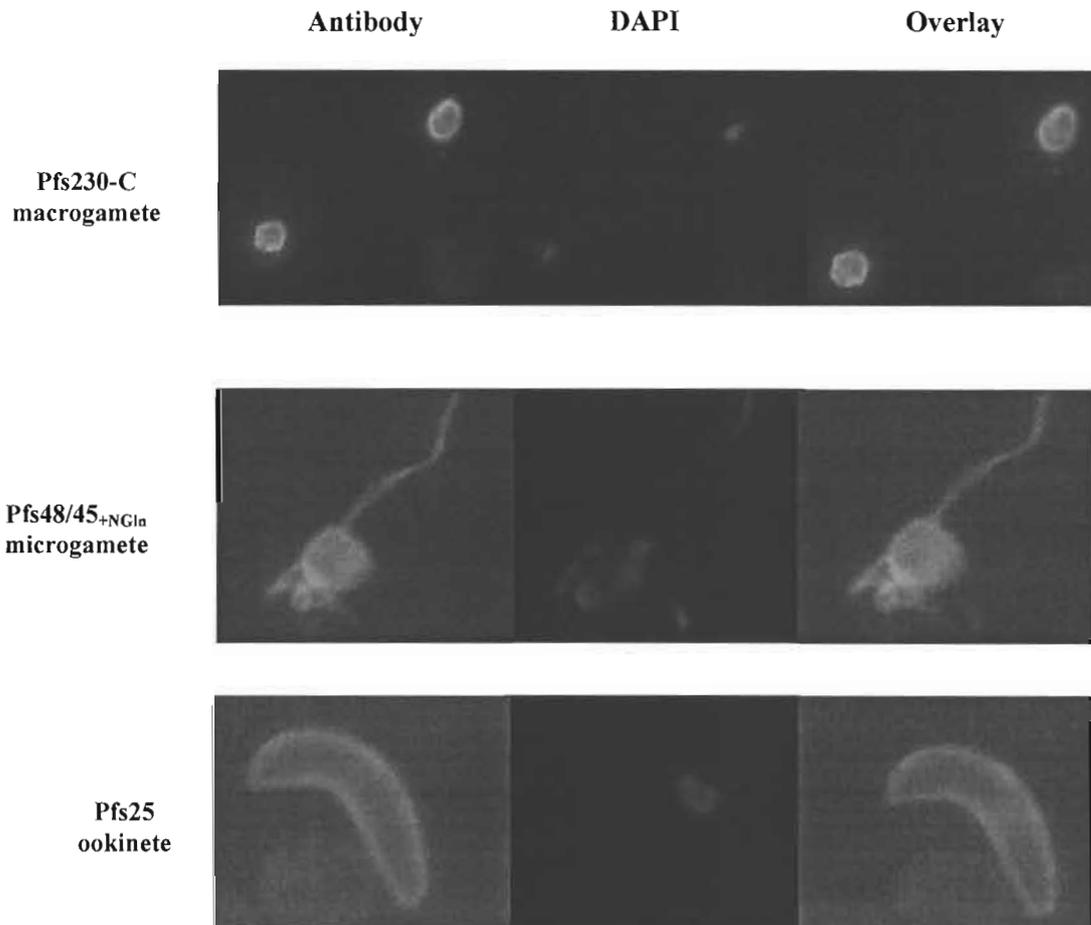


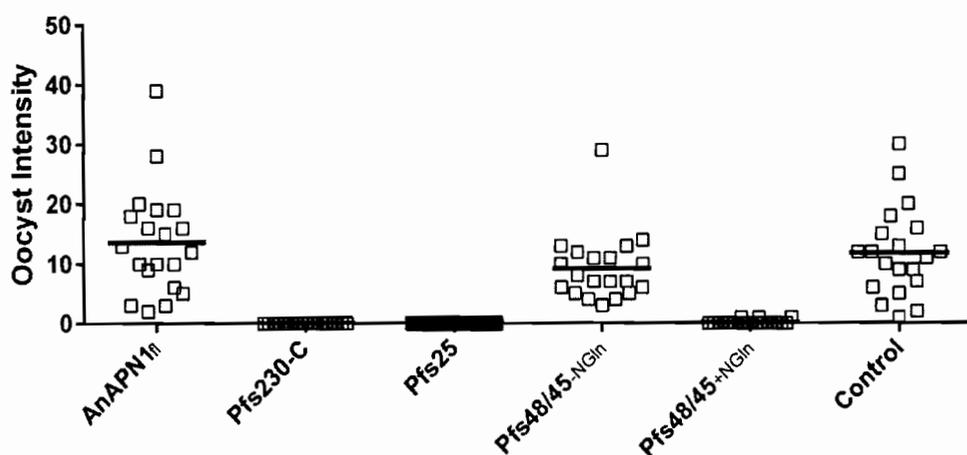
Figure 3: Reactivity of vaccine-induced antibodies against Pfs230-C, Pfs25 and Pfs48/45_{+NGln} to native parasite antigen. *In vitro* cultured *P. falciparum* NF54 microgametes and macrogametes or Pfs25DR3 transgenic *P. berghei* ookinetes were immunostained with antisera against Pfs230-C, Pfs48/45_{+NGln} or purified total IgG against Pfs25 respectively. Antibody binding was detected by Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (green) and the DNA was stained with DAPI (blue).

Inhibition of P. falciparum NF54 development in *A. stephensi* by vaccine-induced IgG

Vaccine-induced antibodies against Pfs230-C, Pfs25, and Pfs48/45 have shown varying TBA against *P. falciparum* depending on the antigen delivery system used (32, 36, 50). Antibodies against AnAPN1 have been shown to inhibit the infectivity of both *P. berghei* and *P. falciparum*

(19, 51). Here we performed a head-to-head comparison of the antigens on the ability of IgG (induced against each antigen with a common vaccine platform) to reduce the intensity and prevalence of *P. falciparum* NF54 parasite infection in a laboratory-reared vector (*A. stephensi*) using a standard membrane feeding assay (SMFA). TBA of antibodies against Pfs230-C has been shown previously to be complement-dependent (52, 53), and thus all assays were performed in the presence of complement. To be able to distinguish antibody-specific inhibition from non-specific effects of mouse serum, total purified IgG was used in the SMFA.

IgG against Pfs230-C and Pfs25 showed complete inhibition of oocyst intensity and prevalence ($p < 0.00001$ for both) whereas anti-Pfs48/45_{+NGIn} IgG showed 99% inhibition of oocyst intensity and 85% inhibition of oocyst prevalence ($p < 0.00001$ for both) (Fig. 4). There was no statistically significant inhibition seen with anti-AnAPN1_n and anti-Pfs48/45_{-NGIn} IgG at the same concentration.



	AnAPN1 _n	Pfs230-C	Pfs25	Pfs48/45 _{-NGIn}	Pfs48/45 _{+NGIn}	Control
N	20	20	20	20	20	20
Mean	13.7	0	0	9.3	0.2	11.8
Inhibition of Infection (%)	-16	100	100	22	99	-
(lower, upper 95% CI)	(-73, 23)	(100, 100)	(100, 100)	(-13, 46)	(95, 99)	-
Inhibition of Prevalence (%)	0	100	100	0	85	-
(lower, upper 95% CI)	(0, 0)	(100, 100)	(100, 100)	(0, 0)	(100, 100)	-

Figure 4: Effect of mouse IgG induced by ChAd63-MVA immunization on *P. falciparum* NF54 parasite infectivity in *A. stephensi* mosquitoes. Pooled day 70 serum ($n=5$) was used to purify total IgG against each of the antigens. 655 μ g/mL of each of the total IgG was mixed with *P. falciparum* NF54 cultured gametocytes and fed to *A. stephensi* mosquitoes ($n=20$) in SMFA. Midguts were dissected 7 days post-feeding. Data points represent the number of oocysts in individual mosquitoes and the lines show the arithmetic mean. The table shows the number of mosquitoes dissected (N) per antigen, mean number of oocyst, % inhibition of infection intensity and prevalence calculated relative to the IgG from vector control immunized mice.

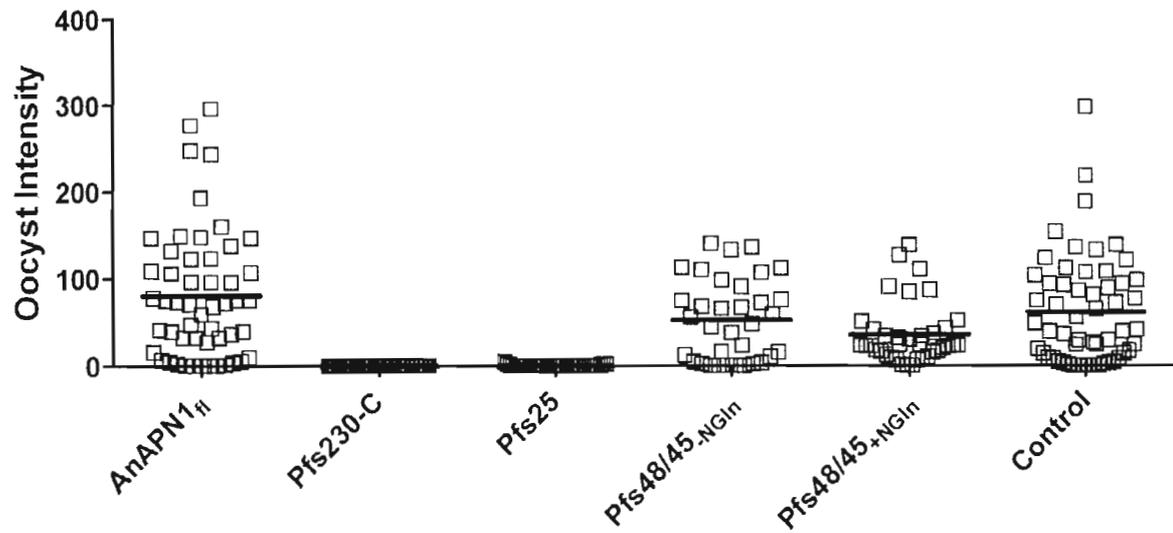
Inhibition of African field isolates of P. falciparum in A. gambiae by vaccine-induced IgG

We also tested the IgG against the individual antigens in a direct membrane feeding assay (DMFAs) using *P. falciparum* parasites collected from gametocyte donors (children aged between 5 and 11) in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. This was tested using laboratory-adapted *A. gambiae* s.s, M molecular form, one of the predominant vectors for malaria transmission in this region. Though most TBV antigens have limited polymorphisms (54), we wanted to assess whether the efficacy and the ranking of the antigens against *P. falciparum* NF54 would be replicated against field isolates in a second vector species.

Significant inhibition of oocyst intensity and prevalence consistent with the previous assay (Fig. 4) was seen with anti-Pfs230-C (complete inhibition, $p < 0.00001$ for both) and Pfs25 (99%, and 81.8% respectively, $p < 0.00001$ for both) IgG (Fig. 5). Anti-Pfs48/45_{+NGln} IgG only significantly inhibited the oocyst intensity (45.5%, $p = 0.007$) and not prevalence in this experiment (Fig. 5). There was no significant inhibition seen with anti-AnAPN1_{fl} and anti-Pfs48/45_{-NGln} IgG. The % inhibition seen with anti-Pfs48/45_{+NGln} IgG was lower than anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 IgG.

Using the viral vectored delivery platform, anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 IgG consistently showed superior TBA (> 99% inhibition of oocyst intensity) than the other antigens (Fig. 5). We investigated the effect of reducing the concentration of anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 IgG in the membrane feeding assay (Fig. 6A and B). When tested at 250 μ g/mL against a different gametocyte donor both anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 IgG still gave essentially complete blockade. Significant inhibition of oocyst intensity and prevalence was seen in this experiment with anti-Pfs230-C ($p = 0.007$ and $p < 0.00001$ respectively) and anti-Pfs25 ($p < 0.00001$ for both) IgG at 62.5 μ g/mL and 125 μ g/mL concentrations respectively.

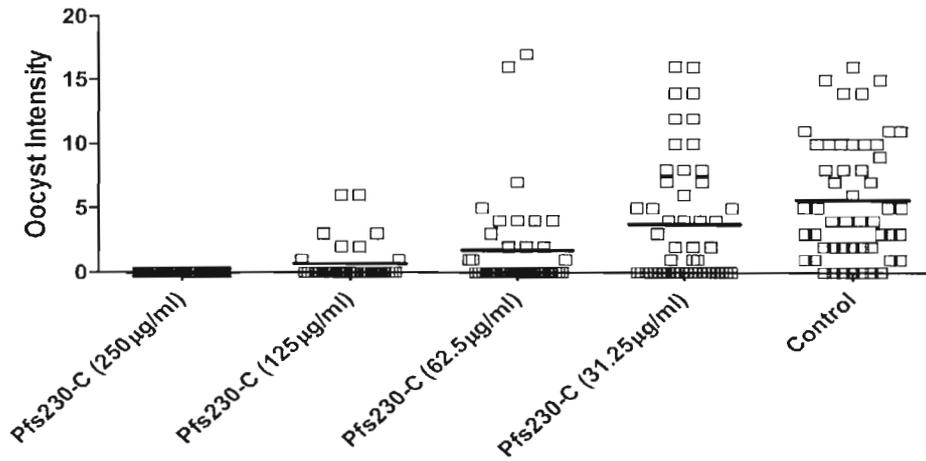
The anti-AnAPN1_{fl}, anti-Pfs48/45_{-NGln} and anti-Pfs48/45_{+NGln} were tested in two further experiments using gametocytes from two different donors. In this study the anti-AnAPN1_{fl} IgG still showed no significant effect on oocyst intensity or prevalence in any of the experiments performed. The anti-Pfs48/45_{-NGln} (82% and 78%, $p = 0.01$ and $p < 0.0001$ respectively) and anti-Pfs48/45_{+NGln} (100%, $p < 0.0001$ for both) IgG showed significant inhibition in one assay (Control 2 in Fig. S3) and not in the other (Control 1 in Fig. S3). This could be due to lower oocyst numbers in the control (8.5 oocyst in Control 2) leading to improved efficacy, polymorphisms in Pfs48/45 which have been reported previously (54, 55) or interassay variability.



	AnAPN1 _{II}	Pfs230-C	Pfs25	Pfs48/45 -NGIn	Pfs48/45 +NGIn	Control
N	52	49	37	34	37	56
Mean	80.7	0	0.4	52.9	35.6	61.8
Inhibition of Infection (%) (lower, upper 95% CI)	-29.5 (-94, 13)	100 (100, 100)	99 (98.9, 99.7)	11.1 (-41.6, 44.2)	45.5 (16.9, 64.3)	-
Inhibition of Prevalence (%) (lower, upper 95% CI)	1.2 (-9.8, 20)	100 (100, 100)	81.8 (58.3, 94.5)	4.5 (-7.7, 32.9)	5.6 (-12.1, 15.2)	-

Figure 5: Effect of mouse IgG induced by ChAd63-MVA immunization on infectivity of field isolates of *P. falciparum* to *A. gambiae* mosquitoes. The purified IgG for each of the antigens and gametocyte positive donor red blood cells were used in a DMFA. The gametocytaemia of the donor was 30 gametocytes per 1000 leucocytes and the ratio of male: female gametocytes was 1.44. The plasma from the gametocyte positive donor blood was replaced by AB serum from a European donor, the purified IgG were added at 500µg/mL in the final mixture and immediately fed to *A. gambiae* mosquitoes. Midguts were dissected 7 days post-feeding. Data points represent the number of oocysts in individual mosquitoes and the lines show the arithmetic mean. The table shows the number of mosquitoes dissected (N) per antigen, mean number of oocyst, % inhibition of infection intensity and prevalence calculated relative to the IgG from vector control immunized mice.

A

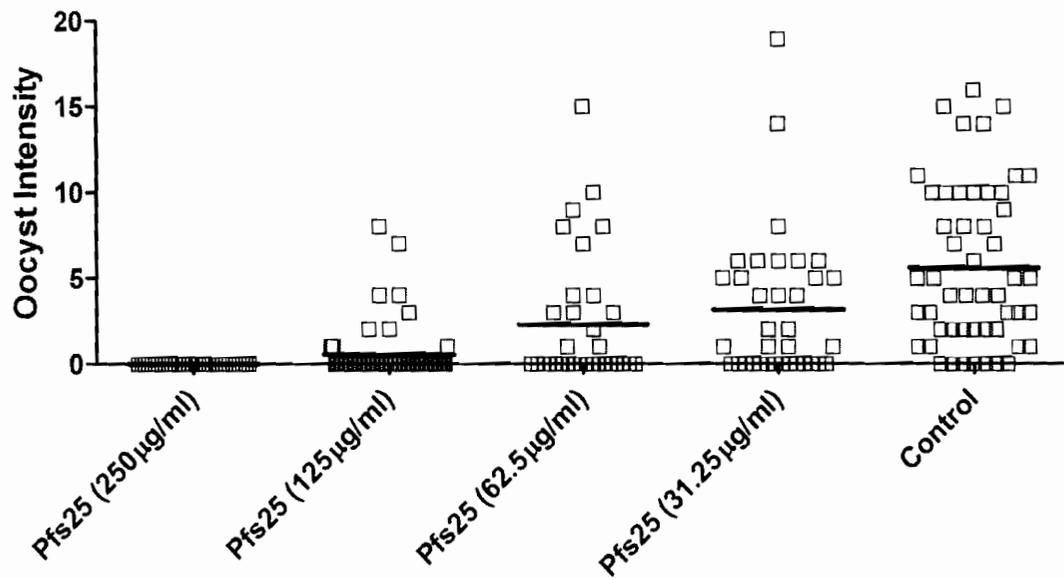


	Pfs230-C (250µg/ml)	Pfs230-C (125µg/ml)	Pfs230-C (62.5µg/ml)	Pfs230-C (31.25µg/ml)	Control
N	59	35	41	51	51
Mean	0	0.7	1.8	3.7	5.6
Inhibition of Infection (%) (lower, upper 95% CI)	100 (100, 100)	87 (76.4, 92.9)	61.8 (20.3, 81.7)	3.7 (-41.6, 34.5)	-
Inhibition of Prevalence (%) (lower, upper 95% CI)	100 (-13.5, 100)	73.5 (41.3, 88.4)	57.6 (25.9, 77.7)	36.4 (10.3, 60.1)	-

Discussion

Here we describe the first head-to-head comparison of the leading transmission-blocking vaccine candidate antigens using a human-compatible vaccine platform (heterologous prime-boost viral-vectored delivery). TBV candidate antigens have been previously assessed individually for their ability to block parasite infectivity to mosquitoes using a wealth of different delivery platforms. In this comparative study, anti-Pfs230-C and Pfs25 antibodies showed superior transmission-blocking activity to Pfs48/45 and AnAPN1. IgG raised against Pfs230-C and Pfs25 have consistently shown better (>99%) TBA on both parasite infectivity and prevalence using both laboratory and field isolates of *P. falciparum* in *A. stephensi* and *A. gambiae* respectively. We have previously reported the use of this delivery system to induce functional antibodies to Pfs25 when expressed from a human adenovirus (HuAd5) and MVA (40). This work provides additional evidence that the viral vectored delivery platform can induce functional antibodies against a range of candidate TBV antigens. This platform has been used successfully to induce functional antibodies against leading blood-stage malaria antigens (in pre-clinical and clinical studies) (43, 44), and used successfully to identify novel target antigens such as the reticulocyte-binding protein homologue 5 for further development (56).

The development of certain TBV candidate antigens has been hampered by the inability to express full-length correctly folded proteins, like the sexual-stage cysteine-rich protein Pfs48/45 which has conformation dependent target epitopes (28, 33). The viral-vector delivery platform enabled us to express these antigens and induce antigen-specific antibodies. The ChAd63 vaccine primed a detectable antibody response that increased over time and was boosted after the administration 8 weeks later of MVA expressing the respective antigen. These data are in accordance with previous findings where an 8-week interval between prime and boost was shown to induce of high-titer antibodies to several blood-stage malaria antigens and Pfs25 (40, 42). The antibody response is sustained for all the antigens (except Pfs25) using this delivery system, without the need for additional booster vaccinations after the initial prime-boost regime in mice. A sustained antibody response for at least one transmission season is likely to be essential to enable effective blockade in endemic areas. The decline in the antibody response to Pfs25 compared to the other antigens could be in part due to the inherent properties of the antigen. It has been reported previously that antibodies against Pfs25 diminish to 50-70% of the peak response in mice after six months of follow up (39). To address this, Pfs25 protein has been conjugated to several carrier proteins in an attempt to make it more immunogenic. A sustained antibody response was achieved in rhesus monkeys only after chemically conjugating Pfs25 to the OMPC of *N. meningitidis* serogroup B and adsorption to aluminum hydroxyphosphate (39). A recent study has demonstrated that the induction of CD4⁺ T cells following an adjuvanted influenza vaccine predicted the persistence of the antibody response (57), and several pre-clinical and clinical studies have shown that viral vectors induce strong T cell responses (43, 44). The role of memory B cells which are important for a rapid recall response was not assessed in this study, but viral vectored vaccination regimes have been shown to induce memory B cells in rhesus macaques (41) and humans (58). It will be important to further assess the role of CD4⁺ T cell help and memory B cells in the context of antibody responses to TBV candidate antigens. In contrast to Pfs25, antibody responses to antigens such as Pfs230 and Pfs48/45 could potentially be boosted by natural infection and gametocyte exposure, but this requires experimental assessment. It has been shown in the *P. berghei* model that antibody responses induced by

B

	Pfs25 (250 µg/ml)	Pfs25 (125 µg/ml)	Pfs25 (62.5 µg/ml)	Pfs25 (31.25 µg/ml)	Control
N	36	60	34	35	51
Mean	0	0.6	2.3	3.2	5.6
Inhibition of Infection (%) (lower, upper 95% CI)	100 (100, 100)	90.2 (82.2, 94.6)	36.8 (-17.9, 66.1)	31.3 (-9.4, 56.9)	-
Inhibition of Prevalence (%) (lower, upper 95% CI)	100 (-13.5, 100)	80.7 (54.4, 91.3)	52.3 (20.3, 74.6)	30.5 (5.3, 56.6)	-

Figure 6: TBA of anti-Pfs230-C and anti-Pfs25 IgG at different concentrations in DMFA. Membrane feeds were performed as described in Figure 5 using a range of anti-Pfs230-C (A) and anti-Pfs25 (B) IgG concentrations (shown in brackets on the x-axis). The gametocytaemia of the donor was 10 gametocytes per 1000 leucocytes and the ratio of male: female gametocytes was 0.59. Data points represent the number of oocysts in individual mosquitoes and the lines show the arithmetic mean. The table shows the number of mosquitoes dissected (N) per antigen, mean number of oocyst, % inhibition of infection intensity and prevalence calculated relative to the IgG from vector control immunized mice.

immunization with DNA encoding Pfs48/45 were boosted after a blood-stage challenge in mice (59).

Our result suggests that there is a possible effect of N-glycosylation site substitution on conformation, immunogenicity and transmission-blocking activity of Pfs48/45. In previously published studies, expression of Pfs48/45 in vaccinia virus resulted in a glycosylated product that was considerably less immunogenic in mice resulting in a lowered ability to inhibit parasite infectivity to *A. stephensi* (29, 60). In contrast to the published data, the IgG against Pfs48/45_{NGIn} (with N-glycosylation site substitutions) did not show any transmission blocking effect in the SMFA against *P. falciparum* NF54. This could be due to the lower antibody response seen with this construct, or due to unintended alterations in functionally important, conformational B cell epitopes caused by amino acid substitutions used to remove the N-glycosylation sites. In only one of the DMFA did IgG against Pfs48/45_{NGIn} show measurable TBA, but this was marginal and needs further investigation. Polymorphisms in Pfs48/45 have also been reported in field isolates and this could also explain the variability in TBA seen in the Burkina Faso studies (54). TBA of antibodies induced by viral vectors against the two versions of Pfs48/45 was variable. The variability could potentially be due to polymorphism in Pfs48/45 in the field isolates which has been reported previously or dependent on the infection intensity in the control. We conclude that further studies need to be done to understand the variability of TBA seen with IgG against Pfs48/45. We are currently investigating further the impact of oocyst numbers in the control mosquitoes and antigen polymorphism on TBA in Burkina Faso. It is critical that such an approach be adopted for the screening of potential TBV candidate antigens as we have recently shown that vaccine efficacy needs to be tested against a range of parasite exposures to interpret laboratory results accurately (61).

It was also surprising that anti-AnAPN1_n IgG induced by viral-vectored prime-boost vaccination did not exhibit any TBA. It has been shown previously that antibodies to an N-terminal fragment of AnAPN1 can block the development of both *P. berghei* and *P. falciparum* (19, 51). This discrepancy in TBA could be due to the difference in construct design, although we have shown that the antibodies induced here recognize native antigen in both immunoblots and ELISA. This antigen remains an attractive candidate due to its effects on diverse *Plasmodium* species in different *Anopheles* species, and thus we are further investigating the TBA of different constructs of AnAPN1.

It has been reported that antibodies against Pfs25 and Pfs28 have synergistic TB efficacy (62) when the IgG against the two antigens are combined in an SMFA or when expressed as fusion protein in *Saccharomyces cerevisiae* (63). We are currently testing if the same synergy could be achieved with anti-Pfs25 and Pfs230-C antibodies, and also investigating ways to combine the two antigens in a single vector delivery platform for clinical development. It will also be important in the future to determine the IC₅₀ (concentration of antigen-specific antibody required to inhibit 50 percent of oocyst development) of the antibodies against Pfs230-C and Pfs25 against field isolates, in order to determine the concentration of IgG required for effective blockade in different transmission settings. The viral vector platform used in this study has a proven safety record in clinical trials targeting a range of pathogens (44, 64, 65). The ability to induce antibody responses with functional activity against TBV candidate antigens with inhibitory effects of up to 100% observed for two antigens is very encouraging for the prospects of successful transmission blocking vaccine development.

Materials and Methods

Design and generation of recombinant viral vectored vaccines

Antigen sequences for AnAPN1, AnAPN1_{fl}, (amino acids (aa) 20–998; AGAP004809-PA, PEST strain), Pfs230 (PF3D7_0209000), Pfs48/45 (aa 28–427; PF3D7_1346700) and Pfs25 (aa 22–192; PF3D7_1031000) were obtained from NCBI protein database. For Pfs230, only region C (aa 443–1132, Pfs230-C) against which antibodies have been shown previously to inhibit parasite development was used (21, 30). All putative N-glycosylation sites were changed from Asn-Xaa-Ser/Thr to Gln-Xaa-Ser/Thr. For Pfs48/45 two different constructs were designed; one with all seven N-glycosylation sites (28) substituted (Pfs48/45_{-NGln}) and the other with the native amino acid sequence (Pfs48/45_{+NGln}). The antigen sequences were codon optimized for expression in humans (GeneArt® Life Technologies, Germany) and the predicted native signal peptide for the antigens were replaced with the human tissue plasminogen activator (tPA) signal peptide. The recombinant viral vaccines were generated as described in Supplementary Materials.

Animal studies and vaccinations

Age-matched female BALB/c mice (Harlan, UK), housed in specific-pathogen free environments, were vaccinated via the intramuscular (i.m.) route using a heterologous prime-boost regime. To determine whether AnAPN1_{fl}, Pfs230-C, Pfs48/45_{-NGln}, and Pfs48/45_{+NGln} were immunogenic when administered in this delivery system, which has been previously shown to elicit anti-Pfs25 specific antibodies (40), a pilot study was undertaken. All the animals were vaccinated with a ChAd63 (day0) priming dose of 1×10^8 IFU and boosted with MVA (day 56) at 1×10^7 pfu expressing the individual test antigens. Control vaccinations were performed with ChAd63 and MVA expressing green fluorescent protein (GFP). Vaccines were prepared in sterile endotoxin-free PBS (Invitrogen, UK). Vaccine-induced antibody responses were assessed on days 14, 55 and 70 and then every month for ten and a half months. All animal experiments and procedures were performed according to the UK Animals (Scientific Procedures) Act Project License (PPL 30/2414 and 30/2889) and approved by the Oxford University Local Ethical Review Committee.

Western Blot Analysis

To determine the expression of the recombinant antigens expressed by the constructs in mammalian cells, 1×10^7 cells/mL HEK293 cells were seeded onto 6 well plates and transfected with pENTR™ (Invitrogen, UK) entry plasmid (containing the tetracycline operator in proximity to the TATA box, pENTR™4LPTOS) (56) using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, UK). Cells were incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. Supernatant and cell lysate were harvested in non-reducing, and reducing, SDS-PAGE loading buffers and boiled at 95°C for 5 min before running on 10 or 12% polyacrylamide gels (Thermo Scientific, UK). Proteins were transferred onto 0.45µm nitrocellulose membranes, which were then blocked in 3% BSA/PBS overnight, washed twice with PBS/0.05% Tween®20 (PBS/T) and incubated with sera (pooled d70 serum from all mice (n=5) immunized with the respective antigens) diluted 1:100 in 3% BSA/PBS for 1 h. The blots were then washed and incubated for 1 h with donkey anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (Strattech Scientific Ltd, UK) diluted at 1:5000, in 3% BSA/PBS. After repeating the washing procedure, the protein bands were detected by chemiluminescence using

ECL Plus substrate (Thermo Scientific, UK) and images captured using a LAS 4000 biomolecular imager. Color plus Pre-stained Protein ladders (NEB, UK) were used to estimate the relative protein mobility.

ELISAs

To detect antigen-specific IgG antibodies induced by vaccination, ELISAs were performed as previously described (6, 50). The recombinant proteins for AnAPN1_{fl}, Pfs230-C and Pfs48/45 were produced using the wheat-germ cell free system (22) and the Pfs25 protein antigen was provided by Yimin Wu (NIH, USA). A standard reference serum was created using pooled day 70 vaccinated mouse serum with high titers (Fig. S1) to the respective antigens. The standard reference was used on a standardized ELISA to determine the ELISA units, expressed as arbitrary units (AU), for each individual antigen. For Pfs25 ELISAs, a previously reported standard serum was used (39).

Indirect Immunofluorescence Assay

P. falciparum gametocytes were cultured as described previously (50) and pelleted. For gametocyte preparations, cultures were split and half were activated in ookinete media (66), following which samples were fixed for 10 min in 4% PFA in PBS. The non-activated and activated preparations were then pipetted onto poly-Lysine coated multiwell slides, air dried and allowed to settle for 12 hours, to allow the adherence of parasites and RBCs to slides. Slides were then washed three times in Tris-buffered saline (TBS) and blocked using 10% goat serum (Sigma, UK) in 1% BSA/PBS for 1 h. The slides were incubated for 1 h with day 70 mouse antisera (Pfs230-C, Pfs48/45_{-NGln}, and Pfs48/45_{+NGln}) diluted 1:100 in 1%BSA/PBS. After washing three times in TBS, goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK; 1:500 in 1% BSA/PBS) was added for 1 h, washed off in TBS and mounted with Vectashield/DAPI (Vector Labs, UK). The slides were visualized under x100 objective magnification using a fluorescence microscope (Leica DMI 3000 B, Leica Microsystems, UK). To assess antibody reactivity with native Pfs25 on ookinetes, Pfs25DR3 transgenic *P. berghei* parasites described previously (40) expressing Pfs25 were used. Phenylhydrazine (6mg/mL in PBS; Sigma, UK) treated female TO (Harlan, UK) mice were injected with 1×10^7 Pfs25DR3 parasitized RBCs (pRBCs). Parasitized blood was harvested from the infected mouse and added 1:25 to ookinete media and left overnight at 19°C. After 24 h, smears were fixed in 4% PFA in PBS after air-drying. Thereafter the procedure was carried out as outlined above.

IgG Purification

Total IgG was purified from day 70 pooled mouse sera from test and control groups as described previously (67) using Protein G columns (Pierce, USA). Briefly, Protein G columns were equilibrated with binding buffer (Immunopure IgG, Pierce, USA) after which a 1:1 mixture of sera and binding buffer was allowed to flow through under gravity, washed and eluted with elution buffer (Immunopure IgG, Pierce, USA). The eluted fraction was collected in 1M Tris-HCl (pH9.0, Teknova, USA) and transferred for buffer exchange to Amicon centrifugal filters (Millipore, USA) using PBS. The eluent was concentrated in PBS (Invitrogen, UK) and filtered using a 0.22µm Millipore Ultrafree sterile centrifugal unit. Total protein was quantified using a NanoDrop spectrophotometer at 280nm and adjusted to either 3.5mg/mL or 2.5mg/mL.

Transmission-Blocking Assays

The ability of vaccine-induced antibodies to block the development of *P. falciparum* strain NF54 was assayed using gametocyte cultures as previously described (50). In case of cultured NF54 parasites, the % of mature Stage V gametocytes was adjusted to $0.15\% \pm 0.05\%$ and the male-female ratio is stable (almost always 1 male: 2-3 female). These were mixed with purified IgG (diluted at 1:5.34 from adjusted total concentration of 3.5mg/mL giving a testing dilution of 0.655mg/mL) and then fed to 4-6 day old starved female *A. stephensi* (SDA 500) via a parafilm[®] membrane. The purified IgG was diluted in non heat-inactivated human AB+ sera to test the antibodies in the presence of complement. Purified IgG from group of mice vaccinated with viral vectors expressing GFP was used as negative control. Infected mosquitoes were then maintained at 26°C at 80% relative humidity. After 7 days midguts from twenty mosquitoes were dissected, oocysts counted and the number of infected mosquitoes recorded. Percent reduction in infection intensity and prevalence were calculated relative to the control.

To determine the TBA against field isolates of *P. falciparum*, children aged between 5-11 years in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, were screened for the presence of asexual and sexual stage *P. falciparum* parasites by thick blood smears. Informed consent from parents or guardians was obtained for children positive for gametocytes (Protocol 003-2009/CE-CM, Centre Muraz institutional ethical committee). 10 mL blood was drawn in heparinized tubes to obtain gametocytes from which plasma was replaced with test or control IgG mixed with non-immune AB serum and immediately fed to a laboratory-adapted colony of *A. gambiae* mosquitoes via a parafilm[®] membrane. Thereafter the procedure was carried out as outlined above.

Statistical Analysis

For the ELISA data, Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to determine statistical significance between pre- and post-boost (day 55 and day 70) response and Mann-Whitney test between Pfs48/45_{-NGln} and Pfs48/45_{+NGln} (day 70 responses). To determine significance of the longevity of the vaccine-induced antibody response, a Friedman test with Dunn's correction was used to assess differences between time points for each individual test antigen. Ability of vaccine-induced antibodies to inhibit oocyst intensity and prevalence of *P. falciparum* in transmission-blocking assays was assessed using generalized linear mixed models according to previously published methods (61). A zero-inflated negative binomial error structure was used to describe oocyst intensity whilst a binomial error structure was used to determine oocyst presence or absence. Models were compared using a likelihood ratio test and confidence intervals generated using bootstrapping methodology. Significance was taken as $p < 0.05$.

Supplementary Materials

Design and Generation of recombinant viral vectored vaccines

All the predicted endogenous signal peptides for the antigens were replaced with the human tissue plasminogen activator (tPA) signal peptide, which has been shown to allow efficient expression of antigens, and a Kozak placed upstream to maximize antigen expression in mammalian cells (47-49, 68). Antigen sequences were optimized to human codon usage bias and potential N-glycosylation sites were removed (except for Pfs48/45_{+NGln}). CMV long promoter with an intron A sequence (that has been shown to enhance insert expression (46)) was used to drive antigen expression in ChAd63 whilst expression was driven by the Vaccinia P7.5 promoter in MVA. To generate replication-deficient, ChAd63 vaccines, the codon optimized antigen inserts were restriction cloned into pENTRTM4LPTOS entry vector (under the control of the human cytomegalovirus (CMV) major immediate-early promoter (46)) using Acc65I and NotI. The entry vector clone was recombined into the destination vector, ChAd63-DEST, by Gateway® cloning (Invitrogen, UK). Replication-deficient recombinant MVA vaccines were generated by cloning into an MVA.GFP shuttle vector between the thymidine kinase sites (TK_L and TK_R) by restriction cloning using Acc65I and XhoI. The resulting clone was linearized and used to generate the recombinant virus by homologous recombination into the MVA genome (parental virus, MVA-RFP). The resulting recombinant viruses were prepared and purified as previously described (42, 69).

Endpoint ELISAs

Vaccine-induced antibody responses were initially quantified by endpoint ELISAs as previously described (42). Nunc-Immuno Maxisorp 96-well plates (NUNC, UK) were coated with recombinant protein overnight at 4°C. The plates were washed in 0.05% Tween-20 in phosphate-buffered saline (PBS/T) the following day and blocked for 1 h with 5% skimmed milk in PBS/T. Test sera were diluted in PBS/T and left to incubate for 2 h after which the plates were washed in PBS/T. Secondary antibody (goat anti-mouse IgG-Alkaline-phosphatase conjugated, Sigma, UK) was added at 1:5000 in PBS/T. After incubation, the plates were washed and developed by adding pNPP substrate diluted in carbonate buffer (15mM sodium carbonate and 35mM sodium bicarbonate in distilled water). The plates were read at OD₄₀₅ until the endpoint detection set for each antigen. The cut-off for determining the endpoint titers was the average OD values for pre-immune sera + three times the standard deviation.

For midgut endpoint ELISAs, midgut lysates from 5-7 day old female *Anopheles gambiae* (Yaoundé and G3 strains, kind gift from Dr George K. Christophides, Imperial College, London) maintained under normal conditions, were prepared as previously described (70). 5µg/mL of the midgut lysate was used to coat plates (NUNC, UK) overnight. Plates were washed (in PBS/T) and blocked (1% BSA in PBS/T) with subsequent steps performed as described above.

Supplementary Figures

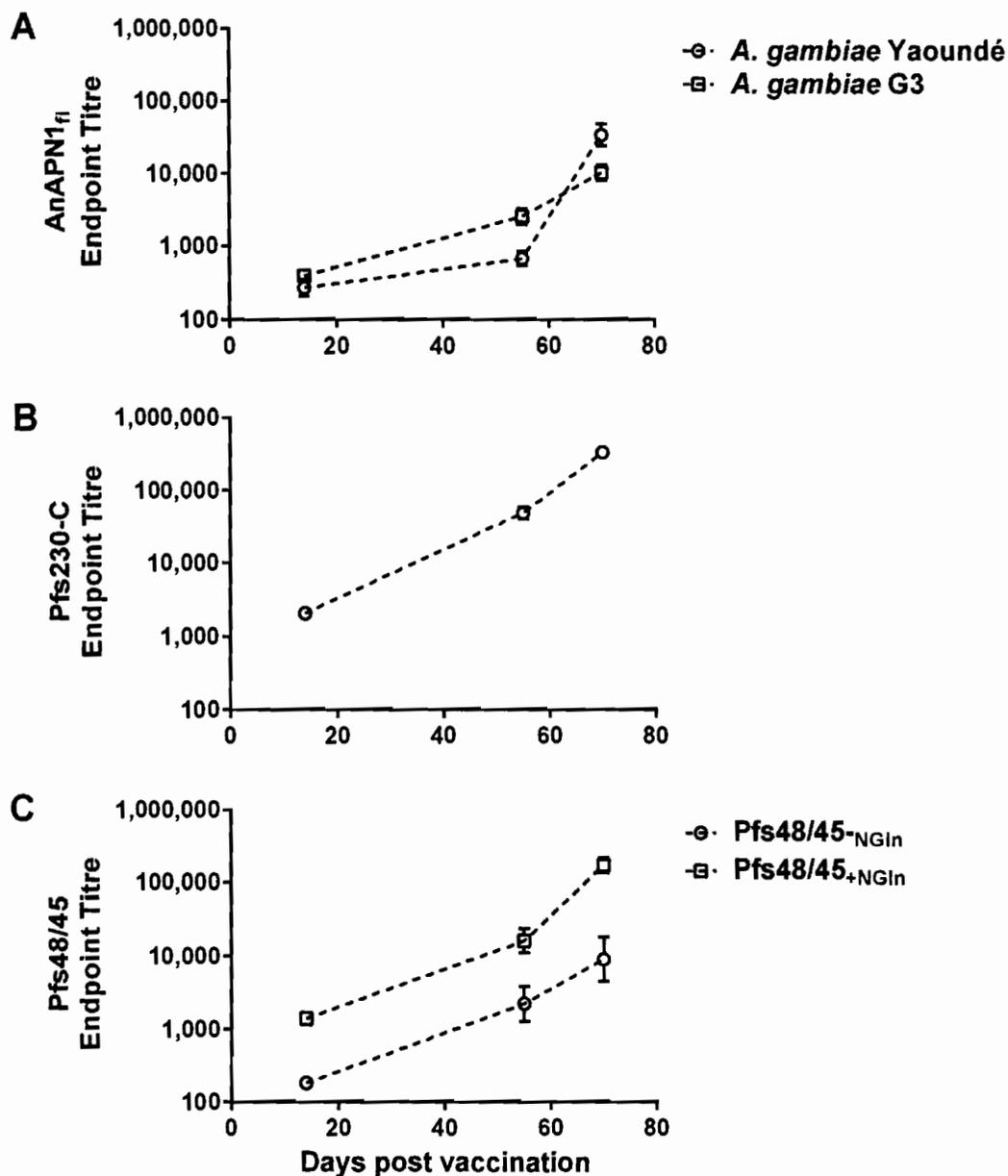


Figure S1: Transmission-blocking antigens induce antibodies when delivered in a ChAd63-MVA prime-boost regimen. BALB/c mice ($n=10$) were vaccinated with ChAd63 (day 0) and boosted with the respective MVA (day 56) expressing the individual antigens AnAPN1_{fl} (A), Pfs230-C (B) and Pfs48/45^{-NGln} and Pfs48/45^{+NGln} (C). Antibody responses were measured on days 14, 55 and 70 by endpoint ELISA using midguts lysates (A) obtained from *A. gambiae* Yaoundé and G3 strains or recombinant protein (B and C). The data was log-transformed and represented as mean \pm SEM for the different time points.

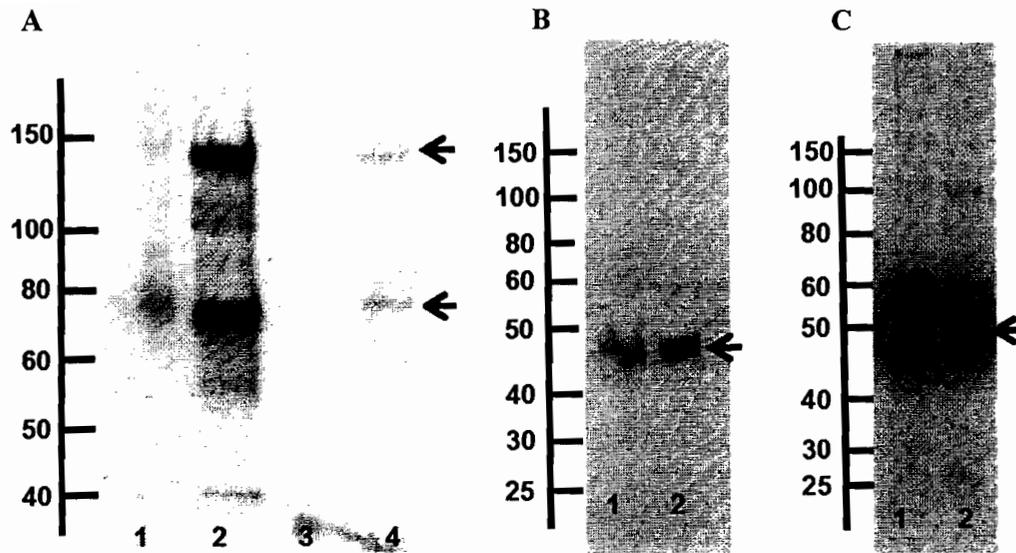
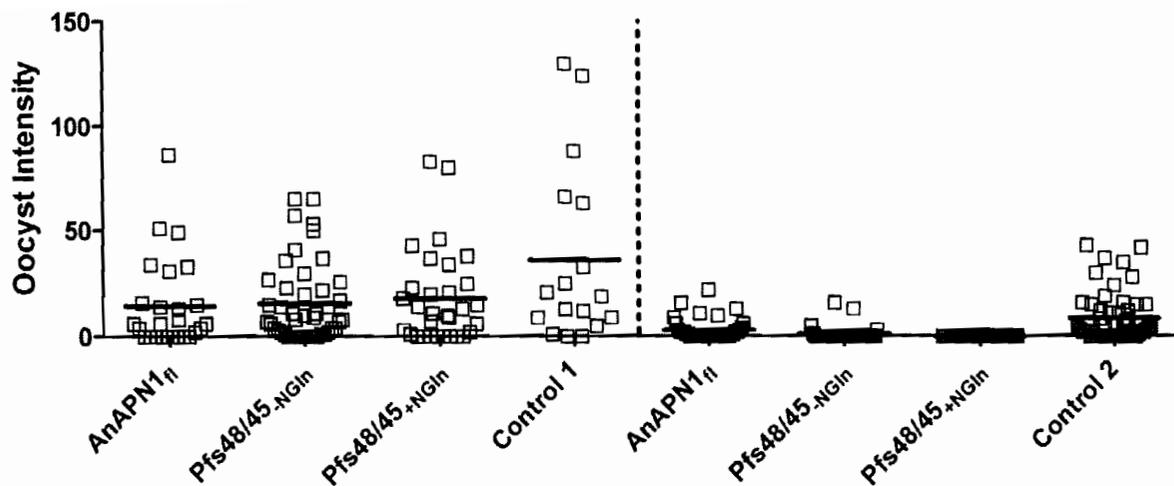


Figure S2: Reactivity of vaccine-induced antibodies against native antigen by western blot. *Anopheles gambiae* Yaoundé and *Anopheles stephensi* SDA500 midgut lysate, and *Plasmodium falciparum* NF54 gametocytes purified by magnetic beads were mixed into either non-reducing or reducing SDS sample loading buffer. 5µg/lane and 10µg/lane of either midgut lysate or gametocyte preparation was loaded onto 8% and 12% polyacrylamide gels respectively, transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblots obtained using day70 pooled sera from mice immunized against AnAPN1fl (A), Pfs48/45_{-NGln} (B) or Pfs48/45_{+NGln} (C). Lanes: 1 – non-reducing; 2 – reducing; 3 – non-reducing; 4 – reducing buffer. (A) Lanes 1 and 2 represent *Anopheles gambiae* Yaoundé, lanes 3 and 4 *Anopheles stephensi* SDA500. Arrows indicate the relative migration mobility observed and expected.



	AnAPN1 _{II}	Pfs48/45 _{.NGIn}	Pfs48/45 _{.NGIn}	Control 1
N	26	45	31	17
Mean	14.6	15.8	18.1	36.4
Inhibition of Infection (%) (lower, upper 95% CI)	50.6 (-7.3, 77)	54.9 (10.4, 77)	43.7 (-11.1, 71.5)	-
Inhibition of Prevalence (%) (lower, upper 95% CI)	25.9 (-3.2, 70.8)	9.3 (-8.2, 50.9)	15.9 (-6.5, 60.8)	-

	AnAPN1 _{II}	Pfs48/45 _{.NGIn}	Pfs48/45 _{.NGIn}	Control 2
N	40	35	34	53
Mean	3	1.1	0	8.5
Inhibition of Infection (%) (lower, upper 95% CI)	63.2 (31.1, 80.3)	81.6 (43.3, 94)	100 (100, 100)	-
Inhibition of Prevalence (%) (lower, upper 95% CI)	22.1 (-2.8, 27.2)	77.7 (23.5, 78.8)	100 (-13.5, 100)	-

Figure S3: Differential inhibition of *P. falciparum* field isolates by anti-Pfs48/45_{.NGIn} and anti-Pfs48/45_{.NGIn} IgG. Membrane feeds were performed as described in Figure 5. The IgG was tested at a concentration of 500µg/mL and the gametocytes were obtained from two separate donors (separated by dotted line). The gametocytaemia were 31 and 15 gametocytes per 1000 leukocytes for control 1 and control 2 respectively and the ratio of male: female gametocytes were 2.34 and 0.47 for control 1 and control 2 respectively. Data point's represent the number of oocysts in individual mosquitoes and the lines show the arithmetic mean. The table shows the number of mosquitoes dissected (N) per antigen, mean number of oocyst, % inhibition of infection intensity and prevalence calculated relative to the IgG from vector control immunized mice.

Table 1. TBV candidate antigen sequences used for generation of ChAd63-MVA viral vectors.

Antigen	Accession No.	Full $\alpha\alpha$ length	$\alpha\alpha$ in construct	Features
AnAPN1 (PEST)	XP_318000.4	1020	20 – 998	SP (1-19 $\alpha\alpha$); GPI anchor (997-1020 $\alpha\alpha$); No TMH; No N-glycan sites.
Pfs230 (3D7)	AAA29725.1	3135	443 – 1132	SP (1-20 $\alpha\alpha$); GPI anchor (3119-3134 $\alpha\alpha$); No TMH; 13 N-glycan sites.
Pfs48/45 (3D7)	CAA80119.2	448	28 – 427	SP (1-27 $\alpha\alpha$); GPI anchor (428-448 $\alpha\alpha$); 1 TMH; 7 N-glycan sites.

Strain shown in parenthesis under antigen abbreviation; $\alpha\alpha$: amino acid; SP: signal peptide; GPI: glycosylphosphatidylinositol; TMH: Transmembrane helix.

Acknowledgments: We thank J. Furze and the Jenner Institute Vector Core Facility for generating the recombinant viral vectors. We would also like to thank S. Moretz, A. Diouf, G. Tullo, and B. Deng for performing the SMFA and Dr Y. Wu for providing the recombinant Pfs25 protein and reference serum used in ELISAs.

Funding: MCK was a recipient of a Commonwealth Scholarship. This work was funded by a Wellcome Trust grant to AVSH. SJD holds a MRC Career Development Fellowship (grant number G1000527). SCG, SJD and AVSH are Jenner Investigators. A.C. received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreements numbers 242095 and 223736 and D.F.D. received an IRD fellowship. A.M.B is funded by Fraunhofer Institute and Medicines for Malaria Venture. SMFA work at NIH MFA Evaluation Centre was supported in part by the intramural program of the NIAID, NIH and in part by the PATH Malaria Vaccine Initiative. TT was supported in part by MEXT/JSPS KAKENHI grant numbers 23117008 and 23406007. ALG was funded by a MRC clinical training fellowship grant number G0600424.

Author contributions: M.C.K performed the experiments, statistical analysis on the immunogenicity data. D.F.D, I.S and A.C performed the feeding assays in Burkina Faso. K.M and C.A.L performed the feeding assays against *P. falciparum* NF54 at the NIH MFA Reference Facility. T.S.C performed statistical analysis on all the feeding assays. M.C.K, A.M.B, and U.S cultured *P. falciparum* NF54 and performed the immunofluorescence assays. S.J.D and A.L.G designed the Pfs25 construct. A.N provided the ChAd63 viral vector. T.T produced the recombinant proteins used in ELISAs. A.R.W, A.V.T, M.G.C, S.J.D and S.C.G provided advice on study design. M.C.K, R.E.S, A.V.S.H and S.B designed the study. M.C.K and S.B wrote the paper.

Competing interests: ALG, SJD, SCG and AVSH are named inventors on patent applications covering malaria vectored vaccines and immunization regimes. AN is an employee and/or shareholder in Okairòs and is a named inventor on patents for ChAd63.

References:

1. A. J. Birkett, V. S. Moorthy, C. Loucq, C. E. Chitnis, D. C. Kaslow, Malaria vaccine R&D in the Decade of Vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities. *Vaccine* **31**, Supplement 2, B233 (2013).
2. S. T. Agnandji, B. Lell, J. F. Fernandes, B. P. Abossolo, B. G. Methogo, A. L. Kabwende, A. A. Adegnika, B. Mordmuller, S. Issifou, P. G. Kremsner, J. Sacarlal, P. Aide, M. Lanaspa, J. J. Aponte, S. Machevo, S. Acacio, H. Bulo, B. Sigauque, E. Macete, P. Alonso, S. Abdulla, N. Salim, R. Minja, M. Mpina, S. Ahmed, A. M. Ali, A. T. Mtoro, A. S. Hamad, P. Mutani, M. Tanner, H. Tinto, U. D'Alessandro, H. Sorgho, I. Valea, B. Bihoun, I. Guiraud, B. Kabore, O. Sombie, R. T. Guiguemde, J. B. Ouedraogo, M. J. Hamel, S. Kariuki, M. Oneko, C. Odero, K. Otieno, N. Awino, M. McMorrow, V. Muturi-Kioi, K. F. Laserson, L. Slutsker, W. Otieno, L. Otieno, N. Otsyula, S. Gondi, A. Otieno, V. Owira, E. Oguk, G. Odongo, J. B. Woods, B. Ogotu, P. Njuguna, R. Chilengi, P. Akoo, C. Kerubo, C. Maingi, T. Lang, A. Olotu, P. Bejon, K. Marsh, G. Mwambingu, S. Owusu-Agyei, K. P. Asante, K. Osei-Kwakye, O. Boahen, D. Dosoo, I. Asante, G. Adjei, E. Kwara, D. Chandramohan, B. Greenwood, J. Lusingu, S. Gesase, A. Malabeja, O. Abdul, C. Mahende, E. Liheluka, L. Malle, M. Lemnge, T. G. Theander, C. Drakeley, D. Ansong, T. Agbenyega, S. Adjei, H. O. Boateng, T. Rettig, J. Bawa, J. Sylverken, D. Sambian, A. Sarfo, A. Agyekum, F. Martinson, I. Hoffman, T. Mvalo, P. Kamthunzi, R. Nkomo, T. Tembo, G. Tegha, M. Tsidya, J. Kilembe, C. Chawinga, W. R. Ballou, J. Cohen, Y. Guerra, E. Jongert, D. Lapiere, A. Leach, M. Lievens, O. Ofori-Anyinam, A. Olivier, J. Vekemans, T. Carter, D. Kaslow, D. Leboulleux, C. Loucq, A. Radford, B. Savarese, D. Schellenberg, M. Sillman, P. Vansadia, S. C. T. P. Rts, A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *The New England journal of medicine* **367**, 2284 (2012).
3. R. Carter, Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**, 2309 (2001).
4. C. Lavazec, C. Bourgooin, Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. *Microb Infect* **10**, 845 (2008).
5. R. Carter, K. Mendis, L. Miller, L. Molineaux, A. Saul, Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med* **6**, 241 (2000).
6. Y. Wu, R. D. Ellis, D. Shaffer, E. Fontes, E. M. Malkin, S. Mahanty, M. P. Fay, D. Narum, K. Rausch, A. P. Miles, J. Aebig, A. Orcutt, O. Muratova, G. Song, L. Lambert, D. Zhu, K. Miura, C. Long, A. Saul, L. H. Miller, A. P. Durbin, Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. *PLoS One* **3**, e2636 (2008).
7. E. M. Malkin, A. P. Durbin, D. J. Diemert, J. Sattabongkot, Y. Wu, K. Miura, C. A. Long, L. Lambert, A. P. Miles, J. Wang, A. Stowers, L. H. Miller, A. Saul, Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine* **23**, 3131 (2005).
8. D. Kaslow, I. Quakyi, C. Syin, M. Raum, D. Keister, J. Coligan, T. McCutchan, L. Miller, A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74 (1988).
9. P. Barr, K. Green, H. Gibson, I. Bathurst, I. Quakyi, D. Kaslow, Recombinant Pfs25 protein of Plasmodium falciparum elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J Exp Med* **174**, 1203 (1991).
10. K. Miura, A. C. Orcutt, O. V. Muratova, L. H. Miller, A. Saul, C. A. Long, Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine* **26**, 193 (2008).
11. S. Eksi, B. Czesny, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, W. Eling, K. C. Williamson, Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol* **61**, 991 (2006).
12. M. R. van Dijk, C. J. Janse, J. Thompson, A. P. Waters, J. A. Braks, H. J. Dodemont, H. G. Stunnenberg, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, W. Eling, A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**, 153 (2001).
13. T. Bousema, W. Roeffen, H. Meijerink, H. Mwerinde, S. Mwakalinga, G.-J. van Gemert, M. van de Vegte-Bolmer, F. Moshia, G. Targett, E. M. Riley, R. Sauerwein, C. Drakeley, The Dynamics of Naturally

- Acquired Immune Responses to *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Antigens Pfs230 and Pfs48/45 in a Low Endemic Area in Tanzania. *PLoS ONE* **5**, e14114 (2010).
14. J. Bousema, C. Drakeley, J. Kihonda, J. Hendriks, N. Akim, W. Roeffen, R. Sauerwein, A longitudinal study of immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunol* **29**, 309 (2007).
 15. J. Healer, D. McGuinness, R. Carter, E. Riley, Transmission-blocking immunity to Plasmodium falciparum in malaria-immune individuals is associated with antibodies to the gamete surface protein Pfs230. *Parasitology* **119** (Pt 5), 425 (1999).
 16. W. Roeffen, B. Mulder, K. Teelen, M. Bolmer, W. Eling, G. A. Targett, P. J. Beckers, R. Sauerwein, Association between anti-Pfs48/45 reactivity and P. falciparum transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol* **18**, 103 (1996).
 17. C. Lavazec, C. Boudin, R. Lacroix, S. Bonnet, A. Diop, S. Thiberge, B. Boisson, R. Tahar, C. Bourgouin, Carboxypeptidases B of Anopheles gambiae as Targets for a Plasmodium falciparum Transmission-Blocking Vaccine. *Infect. Immun.* **75**, 1635 (2007).
 18. A. Raz, N. Dinparast Djadid, S. Zakeri, Molecular Characterization of the Carboxypeptidase B1 of Anopheles stephensi and Its Evaluation as a Target for Transmission-Blocking Vaccines. *Infection and immunity* **81**, 2206 (2013).
 19. R. R. Dinglasan, D. E. Kalume, S. M. Kanzok, A. K. Ghosh, O. Muratova, A. Pandey, M. Jacobs-Lorena, Disruption of Plasmodium falciparum development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13461 (2007).
 20. C. E. Farrance, A. Rhee, R. M. Jones, K. Musiyuchuk, M. Shamloul, S. Sharma, V. Mett, J. A. Chichester, S. J. Streatfield, W. Roeffen, M. van de Vegte-Bolmer, R. W. Sauerwein, T. Tsuboi, O. V. Muratova, Y. Wu, V. Yusibov, A Plant-Produced Pfs230 Vaccine Candidate Blocks Transmission of Plasmodium falciparum. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1351 (2011).
 21. M. Tachibana, Y. Wu, H. Iriko, O. Muratova, N. J. MacDonald, J. Sattabongkot, S. Takeo, H. Otsuki, M. Torii, T. Tsuboi, N-Terminal Prodomain of Pfs230 Synthesized Using a Cell-Free System Is Sufficient To Induce Complement-Dependent Malaria Transmission-Blocking Activity. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1343 (2011).
 22. T. Tsuboi, S. Takeo, H. Iriko, L. Jin, M. Tsuchimochi, S. Matsuda, E.-T. Han, H. Otsuki, O. Kaneko, J. Sattabongkot, R. Udomsangpetch, T. Sawasaki, M. Torii, Y. Endo, Wheat Germ Cell-Free System-Based Production of Malaria Proteins for Discovery of Novel Vaccine Candidates. *Infect. Immun.* **76**, 1702 (2008).
 23. S. L. Fanning, B. Czesny, M. Sedegah, D. J. Carucci, G. J. van Gemert, W. Eling, K. C. Williamson, A glycosylphosphatidylinositol anchor signal sequence enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Plasmodium falciparum sexual-stage antigen, Pfs230. *Vaccine* **21**, 3228 (2003).
 24. C. A. Lobo, R. Dhar, N. Kumar, Immunization of mice with DNA-based Pfs25 elicits potent malaria transmission-blocking antibodies. *Infect. Immun.* **67**, 1688 (1999).
 25. R. LeBlanc, Y. Vasquez, D. Hannaman, N. Kumar, Markedly enhanced immunogenicity of a Pfs25 DNA-based malaria transmission-blocking vaccine by in vivo electroporation. *Vaccine* **26**, 185 (2008).
 26. C. Coban, M. T. Philipp, J. E. Purcell, D. B. Keister, M. Okulate, D. S. Martin, N. Kumar, Induction of Plasmodium falciparum transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations. *Infect. Immun.* **72**, 253 (2004).
 27. G. Mlambo, N. Kumar, S. Yoshida, Functional immunogenicity of baculovirus expressing Pfs25, a human malaria transmission-blocking vaccine candidate antigen. *Vaccine* **28**, 7025 (2010).
 28. C. H. M. Kocken, J. Jansen, A. M. Kaan, P. J. A. Beckers, T. Ponnudurai, D. C. Kaslow, R. N. H. Konings, J. G. G. Schoenmakers, Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 59 (1993).

29. R. L. Milek, A. A. DeVries, W. F. Roeffen, H. Stunnenberg, P. J. Rottier, R. N. Konings, Plasmodium falciparum: heterologous synthesis of the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 in recombinant vaccinia virus-infected cells. *Exp Parasitol* **90**, 165 (1998).
30. P. J. Bustamante, D. C. Woodruff, J. Oh, D. B. Keister, O. Muratova, K. C. Williamson, Differential ability of specific regions of Plasmodium falciparum sexual-stage antigen, Pfs230, to induce malaria transmission-blocking immunity. *Parasite Immunol* **22**, 373 (2000).
31. K. C. Williamson, D. B. Keister, O. Muratova, D. C. Kaslow, Recombinant Pfs230, a Plasmodium falciparum gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of Plasmodium falciparum to mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol* **75**, 33 (1995).
32. D. R. Chowdhury, E. Angov, T. Kariuki, N. Kumar, A potent malaria transmission blocking vaccine based on codon harmonized full length Pfs48/45 expressed in Escherichia coli. *PLoS One* **4**, e6352 (2009).
33. N. S. Outchkourov, W. Roeffen, A. Kaan, J. Jansen, A. Luty, D. Schuiffel, G. J. van Gemert, M. van de Vegte-Bolmer, R. W. Sauerwein, H. G. Stunnenberg, Correctly folded Pfs48/45 protein of Plasmodium falciparum elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4301 (2008).
34. D. Kaslow, J. Shiloach, Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Biotechnology N Y* **12**, 494 (1994).
35. L. Zou, A. Miles, J. Wang, A. Stowers, Expression of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25 in Pichia pastoris for use in human clinical trials. *Vaccine* **21**, 1650 (2003).
36. R. L. Milek, H. G. Stunnenberg, R. N. Konings, Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in yeast. *Vaccine* **18**, 1402 (2000).
37. M. R. van Dijk, B. C. van Schaijk, S. M. Khan, M. W. van Dooren, J. Ramesar, S. Kaczanowski, G. J. van Gemert, H. Kroeze, H. G. Stunnenberg, W. M. Eling, R. W. Sauerwein, A. P. Waters, C. J. Janse, Three members of the 6-cys protein family of Plasmodium play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog* **6**, e1000853 (2010).
38. K. C. Williamson, H. Fujioka, M. Aikawa, D. C. Kaslow, Stage-specific processing of Pfs230, a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 161 (1996).
39. Y. Wu, C. Przysiecki, E. Flanagan, S. N. Bello-Irizarry, R. Ionescu, O. Muratova, G. Dobrescu, L. Lambert, D. Keister, Y. Rippeon, C. A. Long, L. Shi, M. Caulfield, A. Shaw, A. Saul, J. Shiver, L. H. Miller, Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18243 (2006).
40. A. L. Goodman, A. M. Blagborough, S. Biswas, Y. Wu, A. V. Hill, R. E. Sinden, S. J. Draper, A Viral Vectored Prime-Boost Immunization Regime Targeting the Malaria Pfs25 Antigen Induces Transmission-Blocking Activity. *PLoS ONE* **6**, e29428 (2011).
41. S. J. Draper, S. Biswas, A. J. Spencer, E. J. Remarque, S. Capone, M. Naddeo, M. D. J. Dicks, B. W. Faber, S. C. de Cassan, A. Folgori, A. Nicosia, S. C. Gilbert, A. V. S. Hill, Enhancing Blood-Stage Malaria Subunit Vaccine Immunogenicity in Rhesus Macaques by Combining Adenovirus, Poxvirus, and Protein-in-Adjuvant Vaccines. *J Immunol* **185**, 7583 (2010).
42. S. J. Draper, A. C. Moore, A. L. Goodman, C. A. Long, A. A. Holder, S. C. Gilbert, F. Hill, A. V. S. Hill, Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat Med* **14**, 819 (2008).
43. S. H. Sheehy, C. J. Duncan, S. C. Elias, K. A. Collins, K. J. Ewer, A. J. Spencer, A. R. Williams, F. D. Halstead, S. E. Moretz, K. Miura, C. Epp, M. D. Dicks, I. D. Poulton, A. M. Lawrie, E. Berrie, S. Moyle, C. A. Long, S. Colloca, R. Cortese, S. C. Gilbert, A. Nicosia, A. V. Hill, S. J. Draper, Phase Ia clinical evaluation of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen MSP1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *Mol Ther* **19**, 2269 (2011).
44. S. H. Sheehy, C. J. A. Duncan, S. C. Elias, S. Biswas, K. A. Collins, G. A. O'Hara, F. D. Halstead, K. J. Ewer, T. Mahungu, A. J. Spencer, K. Miura, I. D. Poulton, M. D. J. Dicks, N. J. Edwards, E. Berrie, S.

- Moyle, S. Colloca, R. Cortese, K. Gantlett, C. A. Long, A. M. Lawrie, S. C. Gilbert, T. Doherty, A. Nicosia, A. V. S. Hill, S. J. Draper, Phase Ia Clinical Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigen AMA1 in ChAd63 and MVA Vaccine Vectors. *PLoS ONE* **7**, e31208 (2012).
45. M. Dudareva, L. Andrews, S. C. Gilbert, P. Bejon, K. Marsh, J. Mwacharo, O. Kai, A. Nicosia, A. V. Hill, Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan children, in the context of vaccine vector efficacy. *Vaccine* **27**, 3501 (2009).
 46. S. Sridhar, A. Reyes-Sandoval, S. J. Draper, A. C. Moore, S. C. Gilbert, G. P. Gao, J. M. Wilson, A. V. S. Hill, Single-Dose Protection against Plasmodium berghei by a Simian Adenovirus Vector Using a Human Cytomegalovirus Promoter Containing Intron A. *J. Virol.* **82**, 3822 (2008).
 47. S. Biswas, M. D. Dicks, C. A. Long, E. J. Remarque, L. Siani, S. Colloca, M. G. Cottingham, A. A. Holder, S. C. Gilbert, A. V. Hill, S. J. Draper, Transgene Optimization, Immunogenicity and In Vitro Efficacy of Viral Vected Vaccines Expressing Two Alleles of Plasmodium falciparum AMA1. *PLoS One* **6**, e20977 (2011).
 48. A. S. Malin, K. Huygen, J. Content, M. Mackett, L. Brandt, P. Andersen, S. M. Smith, H. M. Dockrell, Vaccinia expression of Mycobacterium tuberculosis-secreted proteins: tissue plasminogen activator signal sequence enhances expression and immunogenicity of M. tuberculosis Ag85. *Microb Infect* **2**, 1677 (2000).
 49. A. Golden, D. A. Austen, M. R. van Schravendijk, B. J. Sullivan, E. S. Kawasaki, M. S. Osburne, Effect of Promoters and Signal Sequences on the Production of Secreted HIV-1 gp120 Protein in the Baculovirus System. *Protein Express Purif* **14**, 8 (1998).
 50. K. Miura, D. Keister, O. Muratova, J. Sattabongkot, C. Long, A. Saul, Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malar J* **6**, 107 (2007).
 51. D. K. Mathias, J. L. Plieskatt, J. S. Armistead, J. M. Bethony, K. B. Abdul-Majid, A. McMillan, E. Angov, M. J. Aryee, B. Zhan, P. Gillespie, B. Keegan, A. R. Jariwala, W. Rezende, M. E. Bottazzi, D. G. Scorpio, P. J. Hotez, R. R. Dinglasan, Expression, immunogenicity, histopathology, and potency of a mosquito-based malaria transmission-blocking recombinant vaccine. *Infect. Immun.* **80**, 1606 (2012).
 52. J. Healer, D. McGuinness, P. Hopcroft, S. Haley, R. Carter, E. Riley, Complement-mediated lysis of Plasmodium falciparum gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect. Immun.* **65**, 3017 (1997).
 53. D. Read, A. H. Lensen, S. Begarnie, S. Haley, A. Raza, R. Carter, Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the Plasmodium falciparum gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasite Immunol* **16**, 511 (1994).
 54. I. Niederwieser, I. Felger, H. P. Beck, Limited polymorphism in Plasmodium falciparum sexual-stage antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **64**, 9 (2001).
 55. A. A. Escalante, A. A. Lal, F. J. Ayala, Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Genetics* **149**, 189 (1998).
 56. A. D. Douglas, A. R. Williams, J. J. Illingworth, G. Kamuyu, S. Biswas, A. L. Goodman, D. H. Wyllie, C. Crosnier, K. Miura, G. J. Wright, C. A. Long, F. H. Osier, K. Marsh, A. V. Turner, A. V. Hill, S. J. Draper, The blood-stage malaria antigen PfrH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun* **2**, 601 (2011).
 57. G. Galli, D. Medini, E. Borgogni, L. Zedda, M. Bardelli, C. Malzone, S. Nuti, S. Tavarini, C. Sannicelli, A. K. Hilbert, V. Brauer, A. Banzhoff, R. Rappuoli, G. Del Giudice, F. Castellino, Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 3877 (2009).
 58. S. C. Elias, K. A. Collins, F. D. Halstead, P. Choudhary, C. M. Bliss, K. J. Ewer, S. H. Sheehy, C. J. A. Duncan, S. Biswas, A. V. S. Hill, S. J. Draper, Assessment of Immune Interference, Antagonism, and Diversion following Human Immunization with Biallelic Blood-Stage Malaria Viral-Vected Vaccines and Controlled Malaria Infection. *J Immunol* **190**, 1135 (2013).

59. D. Haddad, J. Maciel, N. Kumar, Infection with *Plasmodium berghei* boosts antibody responses primed by a DNA vaccine encoding gametocyte antigen Pbs48/45. *Infect. Immun.* **74**, 2043 (2006).
60. G. G. Bushkin, D. M. Ratner, J. Cui, S. Banerjee, M. T. Duraisingh, C. V. Jennings, J. D. Dvorin, M.-J. Gubbels, S. D. Robertson, M. Steffen, B. R. O'Keefe, P. W. Robbins, J. Samuelson, Suggestive Evidence for Darwinian Selection against Asparagine-Linked Glycans of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell* **9**, 228 (2010).
61. T. S. Churcher, A. M. Blagborough, M. Delves, C. Ramakrishnan, M. C. Kapulu, A. R. Williams, S. Biswas, D. F. Da, A. Cohuet, R. E. Sinden, Measuring the blockade of malaria transmission--an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int J Parasitol* **42**, 1037 (2012).
62. P. E. Duffy, D. C. Kaslow, A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum* malaria transmission-blocking vaccines. *Infect. Immun.* **65**, 1109 (1997).
63. M. M. Gozar, V. L. Price, D. C. Kaslow, *Saccharomyces cerevisiae*-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. *Infect. Immun.* **66**, 59 (1998).
64. T. K. Berthoud, M. Hamill, P. J. Lillie, L. Hwenda, K. A. Collins, K. J. Ewer, A. Milicic, H. C. Poyntz, T. Lambe, H. A. Fletcher, A. V. Hill, S. C. Gilbert, Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1. *Clin Infect Dis* **52**, 1 (2011).
65. M. D. Tameris, M. Hatherill, B. S. Landry, T. J. Scriba, M. A. Snowden, S. Lockhart, J. E. Shea, J. B. McClain, G. D. Hussey, W. A. Hanekom, H. Mahomed, H. McShane, Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet* **381**, 1021 (2013).
66. A. M. Blagborough, R. E. Sinden, *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. *Vaccine* **27**, 5187 (2009).
67. L. Cheru, Y. Wu, A. Diouf, S. E. Moretz, O. V. Muratova, G. Song, M. P. Fay, L. H. Miller, C. A. Long, K. Miura, The IC50 of anti-Pfs25 antibody in membrane-feeding assay varies among species. *Vaccine* **28**, 4423 (2010).
68. M. Kozak, At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947 (1987).
69. M. G. Cottingham, F. Carroll, S. J. Morris, A. V. Turner, A. M. Vaughan, M. C. Kapulu, S. Colloca, L. Siani, S. C. Gilbert, A. V. Hill, Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. *Biotechnol Bioeng* **109**, 719 (2012).
70. R. R. Dinglasan, I. Fields, M. Shahabuddin, A. F. Azad, J. B. Sacci, Jr., Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*. *Infect. Immun.* **71**, 6995 (2003).

1 Environment dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium*
2 *falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*

3

4 I. Sangare^{1,2}, R. K. Dabire¹, B. Yameogo¹, D. F. Da^{1,2}, Y. Michalakis^{2,¥} and A. Cohuet

5 ^{1,2,*¥}

6 ¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale, 399 avenue de la liberté,
7 01 BP 545 Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso

8 ² Institut de Recherche pour le Développement, unité MIVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-
9 IRD 224) 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France

10 * corresponding author : anna.cohuet@ird.fr

11 ¥ equally contributed

12

13 **Abstract**

14 Unraveling selective forces that shape vector-parasite interactions has critical implications for
15 malaria control. However, it remains unclear whether *Plasmodium* infection induces a fitness
16 cost to their natural mosquito vectors. Moreover, environmental conditions are known to
17 affect infection outcome and may impact the effect of infection on mosquito fitness. We
18 investigated in the laboratory the effects of exposition to and infection by field isolates of
19 *Plasmodium falciparum* on fecundity and survival of a major vector in the field, *Anopheles*
20 *coluzzii* under different conditions of access to sugar resources after blood feeding.

21 The results evidenced fitness costs induced by exposition and infection. When sugar was
22 available after blood meal, infected and exposed mosquitoes had either reduced or equal to
23 survival to unexposed mosquitoes while fecundity was either increased or decreased
24 depending on the blood donor. Under nutritional stress, survival was reduced for exposed and
25 infected mosquitoes in all assays.

26 We therefore provide here strong evidence of an environmental-dependant reduced survival in
27 mosquitoes exposed to infection in a natural and one of the most important mosquito species
28 associations for human malaria transmission.

29

30 **Keywords** : malaria transmission, vector-parasites interactions, environment, infection cost,
31 mosquito fitness

32

Transmission blocking activity of *Azadirachta indica* and *Guiera senegalensis* extracts on the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* field isolates in *Anopheles coluzzii* mosquitoes.

Rakiswendé S Yerbanga^{a,*}, Leonardo Lucantoni^b, Robert K Ouédraogo^a, Dari F Da^a, Franck A Yao^a, Koudraogo B Yaméogo^a, Thomas S Churcher^c, Giulio Lupidi^b, Orazio Taglialatela-Scafati^d, Louis Clément Gouagna^e, Anna Cohuet^e, George K Christophides^f, Jean Bosco Ouédraogo^a and Annette Habluetzel^b

^aInstitut de Recherche en Sciences de la Santé, 01 BP545 Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.

^bScuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, 62032 Camerino (MC), Italy. ^cDepartment of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London W2 1PG, United Kingdom. ^dDipartimento di Farmacia, Università di Napoli "Federico II", via D. Montesano, 49, I-80131, Napoli, Italy. ^eInstitut de Recherche pour le Développement, Unité MIVEGEC (IRD 224- CNRS 5290-UM1-UM2), BP 64501, Montpellier Cedex 5 34394, France. ^fDepartment of Life Sciences, Imperial College London, London, United Kingdom.

*Corresponding author: Tel.: +226 71484866. Email: yrserge@yahoo.fr (RS. Yerbanga).

Abstract

Targeting the stages of the malaria parasites responsible for transmission from the human host to the mosquito vector is a key pharmacological strategies for malaria control. Research efforts to identify compounds that are active against these stages have significantly increased in recent years. However, at present, only two drugs are available, namely primaquine and artesunate, which reportedly act on late stage gametocytes. In this study, we assessed the antiplasmodial effects of 5 extracts obtained from the neem tree *Azadirachta indica* and *Guiera senegalensis* against the early vector stages of *Plasmodium falciparum* field isolates in an *ex vivo* assay. Gametocytaemic blood was supplemented with the plant extracts and offered to *Anopheles coluzzii* females by membrane feeding. Transmission blocking activity was evaluated by assessing oocyst prevalence and intensity on the mosquito midguts.

Initial screening of the 5 plant extracts at 250 ppm revealed transmission blocking activity in two neem preparations. At 250 and 70 ppm the commercial extract NeemAzal® completely blocked transmission and at 60 ppm mosquitoes were uninfected in 4 out of 5 replicate groups of mosquitoes. Mosquitoes fed on the ethyl acetate phase of neem leaves at 250 ppm showed a mean oocyst number per midgut of 0.63 (CI₉₅ 0.19 - 1.06) compared to 6.67 (CI₉₅ 4.42 - 8.92) in controls, while the ethanol extract from the same plant part did not exhibit any activity. No evidence of transmission blocking activity was found using *G. senegalensis* ethyl acetate extract from stem galls. The results of this study highlight the potential of antimalarial plants for the discovery of novel transmission blocking molecules, and open up the potential of developing standardized transmission blocking herbal formulations as malaria control tools to complement currently used antimalarial drugs and combinations treatments.

Keywords

Plasmodium falciparum, gametocytes, sporogonic stages, plant extracts, transmission-blocking drugs.