

MINISTÈRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPÉRIEUR

SECRETARIAT GÉNÉRAL

UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

ÉCOLE DOCTORALE DES
SCIENCES DE LA SANTÉ (ED- SDS)

FORMATION DOCTORALE EN
PARASITOLOGIE MÉDICALE



BURKINA FASO
Unité-Progrès -Justice

Année académique 2013-2014

Thèse N° 02

**Écologie des interactions *Anopheles gambiae*
s.l.- *Plasmodium falciparum* et implications
dans la transmission du paludisme.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 10 Avril 2014

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

Par

Ibrahim SANGARE

Directeur de thèse :

M. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche

Co-Directeur

Mme Anna COHUET, Chargée de Recherche 1

JURY

Président :

M. Robert Tinga GUIGUEMDE, Professeur Titulaire, UPB

Membre :

M. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche,
IRSS/CNRST

Rapporteurs:

M. Oumar NDIR, Professeur Titulaire, UCAD, Sénégal

M. Adrien M. G. BELEM, Professeur Titulaire, UPB

M. Antoine SANON, Professeur Titulaire, UO

MINISTERE 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° 02

**Écologie des interactions *Anopheles gambiae*
s.l.- *Plasmodium falciparum* et implications
dans la transmission du paludisme.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 10 Avril 2014

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

Par

Ibrahim SANGARE

Directeur de thèse :

M. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche

Co-Directeur

Mme Anna COHUET, Chargée de Recherche 1

JURY

Président :

M. Robert Tinga GUIGUEMDE, Professeur Titulaire, UPB

Membre :

M. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche,
IRSS/CNRST

Rapporteurs:

M. Oumar NDIR, Professeur Titulaire, UCAD, Sénégal

M. Adrien M. G. BELEM, Professeur Titulaire, UPB

M. Antoine SANON, Professeur Titulaire, UO

DEDICACES

In memoriam À notre Père Feu Lamine SANGARE : merci pour le sacrifice consenti pour notre éducation. Vous n'avez pas eu la chance de voir l'achèvement de ce travail qui vous tenait à cœur mais soyez réconforté car nous serons toujours dans la direction de l'intégrité que vous avez souhaitée. Que votre âme repose en paix.

À notre mère Madame SANGARE/DIAKITE Maïmouna : vous vous êtes occupée de nous durant toutes ces années, nous vous en remercions. Que ce travail vous réconforte pour une partie de vos sacrifices quotidiens. Que le TOUT-PUISSANT vous accorde longue vie auprès de nous.

À mon épouse Alima et mon fils Abdeldjalil : ce travail est le vôtre car vous avez participé activement en acceptant des sacrifices durant mon absence, les périodes dures nous les avons traversées ensemble. Que le SEIGNEUR puisse nous offrir un lendemain meilleur à la suite de cette thèse.

À mes frères et sœurs et toute la famille: merci pour vos conseils, vos prières. Soyons toujours un modèle dans la société.

À mes amis de toujours...

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce document ont été menés au sein de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé/ Direction Régionale de l'Ouest (IRSS/DRO) et l'Unité Mixte de Recherche Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (UMR MIVEGEC IRD-UM2-UM2-CNRS) dans le cadre du Projet TransMalariaBloc (Malaria Transmission Blocking by Vaccines, Drugs and Immune Mosquitoes : Efficacy Assessment and Targets) financé par l'Union Européenne (UE FP7-HEALTH-2007-2.3.2-9).

J'ai bénéficié d'une Allocation de Recherche pour une thèse au Sud (ARTS) de la Direction des Programmes de recherche et de la Formation au Sud (DPF) de l'IRD qui m'a permis d'effectuer mes travaux au Burkina Faso et également à Montpellier en France.

Je remercie également la Direction de tutelle des hôpitaux publics du Ministère de la santé du Burkina Faso pour avoir payé mes frais d'inscription en thèse.

À toutes les institutions au sein desquelles j'ai effectué mes travaux, je dédie des remerciements au personnel et aux responsables, Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO, Directeur régional de l'IRSS/DRO, au Dr. Didier FONTENILLE, Directeur de l'UMR MIVEGEC.

Je remercie le Laboratoire Mixte International sur les Vecteurs (LAMIVECT) pour avoir bénéficié du plateau technique et les formations organisées.

Au Pr. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche à l'IRSS/Centre MURAZ, mon Directeur de thèse, vous m'avez fait confiance dès mon DEA. J'ai bénéficié de votre appui depuis lors, jusqu'à cette présente thèse. Votre énorme contribution à ma formation doctorale et votre soutien dans l'orientation, par de précieux conseils, m'a été très bénéfique. Je vous suis très reconnaissant.

Au Dr. Anna COHUET, Chargée de Recherche 1 à l'IRD, ma co-Directrice de thèse, merci de m'avoir fait confiance dès le Master recherche en me proposant un sujet original et d'actualité qui a abouti à cette présente thèse. Votre disponibilité, votre soutien et votre culture scientifique m'ont été très précieux pour mener à bien ce travail. Je vous remercie très sincèrement.

Au Pr. Robert T. GUIGUEMDE, Directeur de l'INSSA, ma découverte du monde passionnant du savoir scientifique et mon envie pour la recherche ont été initiés grâce à votre rencontre. Vous m'avez accueilli au sein l'Unité Paludisme et Maladies tropicales Négligées du Centre MURAZ et au Département de Parasitologie-Mycologie de l'INSSA depuis mon admission à l'internat des CHU du Burkina. Vous m'offrez ainsi, l'opportunité de poursuivre ma carrière. Pour tout, je

Remerciements

vous remercie du fond du cœur. Pour tous ces bienfaits, en mon nom propre et au nom de ma famille, trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements. C'est un immense honneur pour nous que vous présidez notre jury de thèse.

Aux Dr. Abdoulaye DIABATE, Dr. Halidou TINTO, Dr. Zékiba TARNGADA, Dr. Léa PARE/TOE, Dr. Serges YERBANGA, Dr. Hama DIALLO, Dr. Innocent VALEA, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines et votre disponibilité à participer à l'encadrement des jeunes chercheurs, ici et ailleurs, font de vous des séniors aimables.

Aux partenaires de MIVEGEC : Dr. Yannis MICHALAKIS (pour les statistiques et les discussions passionnantes), Dr. Karine MOULINE (merci pour les données météorologiques de la station expérimentale de Bama), Dr. Thierry LEFEVRE (pour les analyses statistiques, les discussions enrichissantes), Dr. Haoues ALOUT (pour les discussions pertinentes), Dr. Frédéric SIMARD (pour sa disponibilité), Luc ABATE, Cécile BRENGUES.

À toute l'équipe de la plate-forme « Infection expérimentale » : Bienvenue YAMEOGO, Dari DA, Baudoin DABIRE, Jean BAZIE, Raymond HIEN, Aminata FOFANA, DIASSO, TAMBOULA, Fulgence DA, recevez l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir beaucoup aidé dans la partie terrain, analyses de laboratoire de ce travail.

Aux camarades doctorants et nouveaux Ph D de Bobo-Dioulasso et de Montpellier : Dari Da, Adama SANOU, Issa WONNI, Frédéric BALDACHINNO, Moussa NAMOUNTOUGOU, Simon SAWADOGO, Hamidou MAIGA, Hyacinthe TOE, Abdoulaye NIANG, Mamai WADAKA, François HIEN, Bienvenue SOMDA, je vous remercie pour les aides.

À mes amis et collègues du CHUSS et de l'INSSA : Yacouba SOURABIE, Soufiane SANOU, Sanata BAMBA, Abdoul Salam OUEDRAOGO, Ollo DA, Salifo SAWADOGO, Souleymane FOFANA, Armel SANOU, Wilfried BAZIE, Valentin KONSEGRE et à l'ensemble du personnel, je vous remercie pour l'accompagnement dont j'ai bénéficié.

Au Président, à tous les Membres du jury et surtout aux Rapporteurs :

Pr. Oumar NDIR : je suis très honoré par votre participation à mon jury de thèse. Je vous présente ici mes sincères remerciements pour les remarques et suggestions pertinentes que vous avez rapportées.

Pr. Adrien Marie Gaston BELEM: Aujourd'hui, vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail et je vous en remercie pour l'excellent rapport que vous avez fait.

Pr. Antoine SANON : je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et de l'intérêt que vous apportez à ce travail en siégeant dans le jury.

«Si l'on considérait une théorie comme parfaite et si l'on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine» Claude BERNARD
Physiologiste français (1813-1878) considéré comme le fondateur de la médecine expérimentale.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABBREVIATIONS..... | 3 |
| LISTE DES FIGURES..... | 6 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 7 |
| RESUME / ABSTRACT..... | 8 |
| INTRODUCTION GENERALE | 10 |
| CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME, L'AGENT PATHOGENE, LES VECTEURS ET LEURS INTERACTIONS..... | 14 |
| I.1. Définition du paludisme..... | 15 |
| I.2. Ampleur de la paludisme | 15 |
| I.3. Les anophèles vecteurs : le complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l..... | 16 |
| I.3.1.Systématique: structure génétique et spéciation au sein du complexe <i>An. gambiae</i> s.l..... | 16 |
| I.3.2.Le cycle biologique des anophèles : bioécologie, physiologie de la reproduction d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s.et d' <i>Anopheles arabiensis</i> | 21 |
| I.4. L'agent pathogène | 24 |
| I.4.1. Classification et espèces pathogènes pour l'Homme | 24 |
| I.4.2. Cycle de vie du <i>Plasmodium</i> | 255 |
| I.4.2.1. Chez l'Homme | 25 |
| I.4.2.2. Chez le vecteur : biologie de <i>Plasmodium</i> au cours de son développement sporogonique | 26 |
| I.5. La lutte contre le paludisme | 30 |
| I.5.1. Méthode de lutte antivectorielle actuelle | 30 |
| I.5.2. Concepts innovants de lutte antivectorielle : la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme...32 | |
| I.6. Diversité génétique de <i>P. falciparum</i> et principes d'épidémiologie moléculaire :..... | 36 |
| I.6.1. Diversité génétique de <i>P. falciparum</i> | 36 |
| I.6.2. Génétique des populations appliquée au paludisme | 37 |
| I.7. Les interactions <i>Anopheles-Plasmodium</i> | 39 |
| I.7.1. La capacité vectorielle : importance de la longévité et de la fécondité dans la transmission..... | 41 |
| I.7.2. Compétence vectorielle : Gènes et déterminants environnementaux impliqués dans la susceptibilité/résistance du moustique à l'infection..... | 44 |
| I.7.3. Notion générale sur le parasitisme et de son impact sur les traits d'histoire de vie de l'hôte | 48 |
| CHAPITRE II :METHODOLOGIE GENERALE | 51 |
| II.1. Origine et élevage des moustiques | 52 |
| II.2. Prospections parasitologiques : recherche des porteurs de gamétocytes | 53 |
| II.3. Technique d'infection expérimentale | 54 |
| II.4. Mesure du niveau d'infection des moustiques | 56 |

| | |
|---|------------|
| II.5. Mesure de la quantité de repas sanguin ingérée par les moustiques..... | 58 |
| II.6. Mesure de la taille de l'aile du moustique..... | 59 |
| CHAPITRE III :COMPETENCE VECTORIELLE DANS LE COMPLEXE <i>AN. GAMBIAE</i> | 60 |
| III.1.INTRODUCTION..... | 61 |
| III.2.MATERIEL et METHODES..... | 64 |
| III.3.RESULATS | 70 |
| III.4.DISCUSSION | 76 |
| III.5.CONCLUSION PARTIELLE..... | 79 |
| CHAPITRE IV :COUT DE L'INFECTION A <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> CHEZ..... | 80 |
| <i>ANOPHELES COLUZZII</i>..... | 80 |
| IV.1.INTRODUCTION..... | 81 |
| IV.2.MATERIEL ET METHODES..... | 85 |
| IV.2.1 Vue d'ensemble du protocole..... | 85 |
| IV.2.2 Analyse statistique..... | 90 |
| IV.3. RESULTATS | 90 |
| IV.3.1. Validation du contrôle négatif (Expérience 1) | 90 |
| IV.3.2. Etude du coût de l'infection en condition optimale de vie (Expériences 2 et 3)..... | 93 |
| IV.3.3. Etude du coût de l'infection sur la survie du moustique en condition de limitation de glucose (Expérience 4) | 97 |
| IV.3.4. Etude du coût de l'infection en condition de stress climatique (Expériences 5 et 6) | 99 |
| IV.4.DISCUSSION..... | 103 |
| IV.5.CONCLUSION PARTIELLE | 107 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 108 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 113 |
| ANNEXES..... | 129 |

LISTE DES ABBREVIATIONS

| | |
|---------|---|
| % : | Pourcentage |
| °C : | Degré Celsius |
| µl : | Microlitre |
| µM : | Micromolaire |
| Ace1® : | Acétylcholinestérase Insensible |
| ACT : | Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine |
| ADN : | Acide Désoxyribo Nucléique |
| AgORs : | <i>Anopheles gambiae</i> Odourant Receptor |
| An. : | <i>Anopheles</i> |
| APL1 : | <i>Anopheles Plasmodium</i> -responsive Leucine-rich repeat 1 |
| ARN : | Acide RiboNucléique |
| ARNi : | ARN interférant |
| ARNm : | Acide RiboNucléique Messenger |
| C : | Cytosine |
| CDPK4 : | Calcium-Dependent Protein Kinases 4 |
| Cm : | Centimètre |
| CNRS : | Centre National de Recherche Scientifique |
| CS : | CircumSporozoïte |
| CSP : | Circumsporozoïte Surface Protein |
| CTA : | Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine |
| CTAB : | Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide |
| CTL4 : | C-Type Lectin 4 |
| CV : | Compétence vectorielle |
| DDT : | Dichloro Diphényl Trichloroéthane |
| DMFA : | Direct Membran Feeding Assay |
| dNTP : | Desoxy Nucléotide Phosphate |
| DPF : | Direction des Programmes de recherche et de la Formation au Sud |
| ECPI : | Egress Cysteine Protease 1 |
| EGFP : | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| ELISA : | Enzyme Linked ImmunoSorbentAssay |
| F : | Forward |
| Fis : | F statistique « Individual within Sub-population » |

| | |
|---------------------|---|
| Fit : | F statistique « Individual within total » |
| FITC : | Fluorescéine IsoThioCyanate |
| Fst : | F statistique « Sub-population within total » |
| GLMM : | Generalized Linear Mixte Model |
| INSSA : | Institut Supérieur des Sciences de la Santé |
| IRD : | Institut de Recherche pour le Développement |
| IRSS/DRO : | Institut de Recherche en Sciences de la Santé/ Direction Régionale de l'Ouest |
| KB : | Kilo Base |
| KD : | Kilo Dalton |
| Kdr : | Knock Down Resistance |
| LAMIVECT : | Laboratoire Mixte International sur les Maladies à Vecteurs en Afrique de l'Ouest |
| LRIM1 : | Leucin Rich repeat Immune protein 1 |
| MAEBL : | Apical Membrane Antigen Erythrocyte Binding-Likeprotein |
| MAOP : | Membrane-Attack Ookinete Protein |
| MgCl ₂ : | Chlorure de Magnésium |
| MGM : | Moustiques Génétiquement Modifiés |
| MII : | Moustiquaire Imprégnée d'Insecticides |
| min : | Minute |
| MIVEGEC : | Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle |
| mm : | Millimètre |
| mM : | Millimolaire |
| MSP1 : | Merozoite Surface Protein 1 et 2 |
| MSP2 : | Merozoite Surface Protein 2 |
| OMS : | Organisation Mondiale de la Santé |
| <i>P.</i> | <i>Plasmodium</i> |
| Pb : | Paires de Bases |
| PBS : | Phosphate Buffer Saline |
| PCR : | Polymérase Chain Réaction |
| Pfert : | <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter |
| Pfdhfr : | <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase |
| PIB : | Produit Intérieur Brut |
| PID : | Pulvérisation Intra Domiciliaire |

| | |
|-----------------|---|
| Pmol : | Picomolaire |
| QTL : | Quantitative Trait Loci |
| qPCR : | Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| R : | Reverse |
| RFLP : | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RIDL : | Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene |
| rpm: | Rotation Par Minute |
| RT PCR : | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SERA8 : | Serine Repeat Antigen 8 |
| SNP : | Single Nucleotid Polymorphism |
| SOAP : | Secreted Ookinète Adhesive Protein |
| SSLP : | Simple Sequence Length Polymorphism |
| SSR : | Simple Sequence Repeats |
| STR : | Short Tandem Repeats |
| T° : | Température |
| TBD : | Transmission Blocking Drugs |
| TBI : | Transmission Blocking Interventions |
| TBV : | Transmission Blocking Vaccine |
| TEP1 : | Thio Ester-containing Protein 1 |
| TIS : | Technique d’Insecte Stérile |
| TRAP : | Thrombopondin-Related Adhesive Protein |
| UE : | Union Européenne |
| UM1 : | Université de Montpellier 1 |
| UM2 : | Université de Montpellier 2 |
| UMR : | Unité Mixte de Recherche |
| UPB : | Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso |
| VNTR : | Variable Number Tandem Repeats |
| WARP : | von Willebrand factor A domain-related protein |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| FIGURE 1 : Divergence génomique entre les 3 chromosomes d'espèces sympatriques <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> | 20 |
| FIGURE 2 : Cycle évolutif de <i>Plasmodium falciparum</i> | 29 |
| FIGURE 3 : Mécanismes d'activation des voies de signalisation immune toll et imd chez <i>Anopheles</i> suite à l'infection à <i>Plasmodium</i> | 46 |
| FIGURE 4 : Dynamique des facteurs environnementaux affectant la compétence vectorielle..... | 48 |
| FIGURE 5 : Aperçu de l'élevage des souches d'anophèles à l'insectarium | 52 |
| FIGURE 6 : Aperçu du dispositif d'infection expérimentale : | 55 |
| FIGURE 7 : Ookinète de <i>P. falciparum</i> au microscope à fluorescence après broyage de l'estomac du moustique | 56 |
| FIGURE 8 : Oocystes de <i>P. falciparum</i> coloré au mercurochrome sur un estomac d' <i>An. gambiae</i> .. | 56 |
| FIGURE 9 : Gel de migration après PCR diagnostic <i>P. falciparum</i> | 57 |
| FIGURE 10 : Tubes à drosophile (A) et plaque ELISA (B) avec solution de hématine diluée dans du LiCO ₃ | 58 |
| FIGURE 11 : Mesure de la taille de l'aile à la base distale de l'aile..... | 59 |
| FIGURE 12 : Exemple de génotypage microsatellite d'oocyste de <i>P. falciparum</i> après analyse logiciel genemapper 4.0 | 67 |
| FIGURE 13 : Prévalence de l'infection comparée chez les 3 espèces vectrices..... | 71 |
| FIGURE 14 : Intensité de l'infection comparée chez les 3 espèces vectrices | 72 |
| FIGURE 15 : Chambre climatique, 0 ... 50 °C, 294 l/MLR-352, MLR-352h-SANYO..... | 88 |
| FIGURE 16 : Données météorologiques de 2012 des mois de février, août, décembre, de la station expérimentale de Bama:..... | 89 |
| FIGURE 17 : Courbe de survie de Kaplan Meier en fonction du type de sang ingéré (chauffé vs non chauffé) (fig. 17B) et en fonction du donneur du sang (fig. 17B)..... | 91 |
| FIGURE 18 : Nombre d'œufs développés par les femelles nourris sur du sang chauffé vs sang non chauffé en fonction du patient..... | 92 |
| FIGURE 19 : Courbes de survie de kaplan-meier des femelles infectées versus non infectées. | 95 |
| FIGURE 20 : Nombre d'œufs développés par les femelles nourris en fonction du statut d'infection. | 97 |
| FIGURE 21 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des femelles infectées versus non infectées sous différents régimes de glucose | 99 |
| FIGURE 22 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des femelles infectées versus non infectées sous différentes conditions climatiques. | 101 |
| FIGURE 23 : Nombre moyen d'œufs développés par les femelles en fonction des 3 replicats..... | 102 |
| FIGURE 24 : Nombre moyen d'œufs développés par les femelles en fonction des 3 conditions climatiques. | 103 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| TABLEAU I: Récapitulatif des amorces utilisées pour le génotypage microsatellites des oocystes de <i>P. falciparum</i> | 68 |
| TABLEAU II: Récapitulatif des effectifs de moustiques testés..... | 70 |
| TABLEAU III: Nombre d'oocystes isolées par estomac, par souches et par replicat | 73 |
| TABLEAU IV: Résumé des paramètres génétiques des loci microsatellites entre les 3 espèces de moustique en fonction des replicats de l'expérience | 74 |
| TABLEAU V: Différenciation génétique entre les oocystes issus des 3 espèces de moustiques | 75 |
| TABLEAU VI: Analyse statistique de l'effet du chauffage du sang, du patient, de leurs interactions, de la taille de l'aile, du taux d'hématine excrétée sur la survie des moustiques testés ... | 91 |
| TABLEAU VII: Analyse de régression nominale des effets sur la probabilité de pondre au moins un œuf..... | 92 |
| TABLEAU VIII: Analyse de variance des effets sur le nombre d'œufs développés..... | 93 |
| TABLEAU IX: Analyse de variance des effets sur la taille du repas sanguin | 93 |
| TABLEAU X: Récapitulatif des données des expériences 2 et 3..... | 94 |
| TABLEAU XI: Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, leurs interactions, de la taille de l'aile et de la quantité d'hématine excrétée sur la survie des moustiques (condition optimale)..... | 97 |
| TABLEAU XII: Analyse de l'effet de l'infection, du patient, et leurs interactions, de la quantité d'hématine, et de la taille de l'aile sur la fécondité (condition optimale)..... | 97 |
| TABLEAU XIII: Récapitulatif des données de l'expérience 4..... | 97 |
| TABLEAU XIV : Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, regime de glucose et leurs interactions sur la survie des moustiques (différents régimes de glucose) | 98 |
| TABLEAU XV: Récapitulatif des données de l'expérience 5 et 6..... | 100 |
| TABLEAU XVI: Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, mois, de la chambre climatique et leurs interactions avec l'infection sur la survie des moustiques..... | 100 |
| TABLEAU XVII: Analyse de l'effet de l'infection, du patient, du mois et de leurs interactions sur la fécondité..... | 102 |

RESUME

Le développement de *Plasmodium* est l'aboutissement d'interactions complexes avec l'hôte vertébré et l'hôte moustique, qui constituent l'environnement du parasite.

Le transit et le développement du parasite dans le moustique est un parcours dangereux et difficile avec une perte parasitaire importante. Le parasite est soumis à une forte pression de sélection des enzymes digestives de l'hôte, des barrières physiques et surtout du système immunitaire. La connaissance des forces évolutives de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae* est instructive en termes de recherche fondamentale sur les interactions vecteur-parasite mais aussi essentielle pour l'amélioration des stratégies de contrôle du paludisme par blocage du parasite chez le vecteur. Cette présente thèse avait pour objectif d'étudier les déterminants écologiques des interactions *An. gambiae* et *P. falciparum* dans la transmission du paludisme.

Dans un premier temps, nous avons comparé la susceptibilité des 3 espèces majeures du complexe *An. gambiae* vis-à-vis de souches de terrain de *P. falciparum* d'une même aire géographique. Les moustiques ont été élevés dans des conditions identiques et nourris sur le sang du même porteur de gamétocytes en utilisant un système d'infection expérimentale. *Anopheles coluzzii* avait une forte charge en oocystes ($21 \pm 1,3$) comparativement à *An. gambiae* ($19,2 \pm 1,7$) et *An. arabiensis* ($16,4 \pm 1,4$). Nous avons observé une corrélation positive entre la gamétocytemie, la taille du repas de sang sur la charge oocystique chez les 3 espèces de moustiques. Enfin, il y avait un effet négatif de la taille de moustique sur l'intensité de l'infection par les plus grosses femelles hébergeant nettement moins d'oocystes que les petites femelles indépendamment de l'espèce de moustique. Par contre, nous n'avons pas noté de différence significative en termes de prévalence de l'infection chez les 3 espèces de moustiques. Ni la gamétocytemie, ni la taille de l'aile n'ont eu un impact sur la prévalence de l'infection. L'analyse de la structuration génétique entre les oocystes au sein des 3 espèces en utilisant les marqueurs microsatellites n'a pas montré de différenciation génétique significative. Le nombre d'allèles par locus était compris entre 2 à 5 et l'hétérozygotie attendue entre 0,2491 et 0,3055.

Le second volet de notre étude a consisté à déterminer le coût de l'infection et de la résistance à *P. falciparum* chez *An. gambiae*. Après avoir validé un contrôle négatif adapté, nous avons effectué des infections d'*An. coluzzii* par leurs parasites naturels, *P. falciparum*, en utilisant un système de gorgement sur membrane sous différentes conditions nutritionnelles et climatiques. *Plasmodium falciparum* avait un impact négatif sur la survie et souvent sur la fécondité de son vecteur. L'effet de l'exposition ou de l'infection parasitaire était d'autant plus net en condition de stress. La notification d'un coût de l'infection pourrait avoir des implications cruciales dans la lutte contre le paludisme en mettant en évidence des « points faibles » des vecteurs du paludisme pour la mise au point des mesures de lutte antivectorielle ciblant spécifiquement les moustiques infectés.

Mots clés : Interactions *Anopheles-Plasmodium*, compétence vectorielle, coût de l'infection, valeur sélective, environnement.

ABSTRACT

Plasmodium needs to complete a complex life cycle in the female *Anopheles* mosquitoes and human host, which constitute the parasite environment. The transit and development in the mosquito is a dangerous and difficult journey that result in substantial parasite losses. The parasite is under strong selection pressure of the digestive enzymes, physical barriers and particularly the host immune system.

Knowledge of the *P. falciparum* infection evolutionary forces on *An. gambiae* is instructive in terms of basic research on vector-parasite interactions but is also essential for developing and improving strategies that aim to control malaria by blocking the parasite in the vector. The objective of the present thesis was to study the ecological determinants of the *P. falciparum*-*An. gambiae* interactions in malaria transmission.

In the first time, we compared the susceptibility of three major species of *An. gambiae* complex to sympatric *P. falciparum* field strains. The different mosquito species were reared under identical conditions and fed on the same gametocyte-infected blood using an experimental infection system. *Anopheles coluzzii* had a heavy load in oocysts (21 ± 1.3) compared to *An. gambiae* (19.2 ± 1.7) and *An. arabiensis* (16.4 ± 1.4). We observed a positive correlation between gametocytes, the blood meal size on the oocyst load in the three mosquito species. Finally, there was a negative effect between mosquitoes wing size and infection intensity with larger females harboring significantly less oocysts than small females regardless of the species of mosquito. However, no difference in the infection prevalence was observed. Neither gametocytaemia nor wing size had an impact on infection prevalence. Analysis of the genetic structure between oocysts in three species using microsatellite markers showed no genetic significant differentiation. The number of alleles per locus ranged from 2 to 5 in this population and the expected heterozygosity ranged between 0.2491 and 0.3055.

The second part of our study was to determine the *P. falciparum* infection cost and resistance on *An. gambiae*. After validating an accurate method for producing control non-infected mosquitoes, we performed infections of *An. coluzzii* by natural parasites, *P. falciparum*, using a direct membrane feeding assay under different nutritional and climatic conditions. *P. falciparum* had a negative impact on its vector survival and often fecundity. Exposition or parasitic infection effect was more pronounced under stress. The notification of the cost of infection could have crucial implications in malaria control by highlighting specific weaknesses of infected malaria vectors that would help to design vector control measures by targeting infected mosquitoes.

Keyds words: *Anopheles-Plasmodium* interactions, vectorial competence, infection cost, fitness, environment.

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme reste de nos jours un des grands fléaux de l'humanité, causant plus de 216 millions de cas et près moins d'un million de décès chaque année, principalement en Afrique (OMS 2012). À cela, il faut ajouter le fardeau socio-économique considérable. En effet, le coût économique du paludisme est estimé à 12 milliards USD par an pour l'Afrique seule. Au niveau individuel, l'impact économique inclut les frais de soins et d'hospitalisation, les jours de travail ou d'école perdus, et la baisse de productivité. Dans certains pays particulièrement touchés par le paludisme, la maladie peut être responsable de 40% des dépenses publiques de santé, 30 à 50% des patients admis à l'hôpital, et jusqu'à 50% des motifs de consultations (CHIMA *et al.* 2003; MARTIN *et al.* 2012).

Cette maladie est due à l'infection par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis par un moustique femelle appartenant au genre *Anopheles*. Plus de 90% de la mortalité associée au paludisme, a lieu en Afrique Sub-Saharienne et est causée par *P. falciparum* dont le vecteur majeur est *Anopheles gambiae*. Le couple *P. falciparum*-*An. gambiae* a donc un impact particulièrement important en termes de santé publique.

Le contrôle du paludisme intègre la lutte contre le parasite et contre le vecteur. La lutte antiparasitaire consiste à utiliser des molécules antipaludiques en chimiothérapie et chimioprophylaxie. Elle avait suscité de très bons espoirs pour l'éradication du paludisme dans le passé. Malheureusement des mécanismes de résistance sont apparus face à la majorité des molécules disponibles (WONGSRICHANALAI et SIBLEY 2013). C'est dans ce contexte que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise depuis 2002, l'usage des combinaisons à base d'artémisinine (ACT) pour freiner l'expansion de la résistance, sans pour autant pouvoir l'éviter. Une baisse de sensibilité, et pire une résistance des parasites aux dérivés de l'artémisinine, a été notée dans un nombre croissant de pays d'Asie du sud-Est (MIOTTO *et al.* 2013; PHYO *et al.* 2012). La stratégie vaccinale conventionnelle montre aujourd'hui des progrès, avec des essais vaccinaux encourageants avec le vaccin RTS'S dont le Burkina Faso fait partie du consortium des pays participant à l'essai (ALONSO *et al.* 2011; AGNANDJI *et al.* 2011). Cependant les résultats montrent encore une immunité acquise courte et partielle et ne permettent donc pas d'espérer, à l'heure actuelle, une éradication du paludisme par la voie vaccinale seule (VON SEIDLEIN et BEJON 2013).

Quant à la lutte antivectorielle classique, l'espoir suscité avec l'utilisation d'insecticides (DTT, carbamates, pyréthriinoïdes...) pour éliminer le vecteur dans les gîtes et habitations,

s'est estompé avec la mise en évidence dès les années 1950 des gènes de résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs (RIVERO *et al.* 2010). Par exemple, une résistance aux pyréthrinoïdes, les insecticides utilisés pour l'élaboration des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) et couramment utilisés pour les pulvérisations intradomiciliaires (PID), a été observée dans 27 pays d'Afrique et 41 pays dans le monde (FANE *et al.* 2012; NAMOUNTOUGOU *et al.* 2013; SANTOLAMAZZA *et al.* 2008; YADOLETON *et al.* 2010).

L'action de la communauté scientifique est donc urgente pour établir de nouvelles stratégies et voies de recherches de contrôle et voire d'éradication du paludisme, dont il est question actuellement (BREMAN et BRANDLING-BENNETT 2011). Aujourd'hui, bloquer le développement du parasite dans le vecteur apparaît comme une stratégie prometteuse en complément des stratégies plus conventionnelles. En effet, le passage du parasite dans le moustique vecteur a été identifié comme étant une des étapes critiques dans le cycle de la transmission du *Plasmodium*. Pendant les premières étapes de développement du parasite dans le moustique, le nombre de parasites atteint son niveau le plus bas et il ne réalise pas de multiplication exponentielle comme aux autres stades de développement. Ce goulot d'étranglement représente donc un point de vulnérabilité du cycle parasitaire qui pourrait constituer une cible pour bloquer la transmission (SINDEN *et al.* 2004).

Plusieurs concepts basés sur le blocage de la transmission du *Plasmodium* du moustique à l'homme ont été développés (KASLOW 1990; KASLOW 1997). Les stratégies développées ciblent les deux paramètres clés de la transmission qui sont : la compétence vectorielle et la capacité vectorielle. Le blocage de la transmission peut être envisagé par une formulation de médicaments administrés à l'homme pouvant agir pour bloquer la transmission chez l'anophèle femelle suite au repas de sang de ce dernier sur l'homme, on parle de médicaments bloquant la transmission ou Transmission Blocking Drugs (TBD) (PONSA *et al.* 2003; TANAKA *et al.* 2013). Également, le concept des vaccins altruistes ou vaccins bloquant la transmission ou Transmission Blocking Vaccine (TBV) pour lesquels des antigènes ont stimulé la production d'anticorps chez l'homme pour bloquer la transmission des stades de parasites dans le moustique vecteur est également en expérimentation (BOUSEMA *et al.* 2011; CARTER 2001; DA *et al.* 2013; OUEDRAOGO *et al.* 2011). Il est par ailleurs envisageable de bloquer la transmission via l'immunité des moustiques ou Transmission Blocking *via* Immunity (TBI). Ce concept consiste à amplifier ou modifier la résistance naturelle du

moustique aux plasmodies (BLANDIN et LEVASHINA 2004; OSTA *et al.* 2004; THOMAS *et al.* 2000; YASSINE and OSTA 2010). Enfin, certains chercheurs ambitionnent de modifier la préférence trophique des espèces anthropophiles en espèces zoophiles (TKACHUK *et al.* 2011). Toutes ces stratégies ont pour but de diminuer la compétence vectorielle et secondairement la capacité vectorielle.

Il est également envisageable de baisser la densité des populations naturelles par la stratégie de lâchers massifs des mâles stériles (ALPHEY 2002; CATTERUCCIA *et al.* 2009) ou d'abaisser la longévité des populations locales par la diffusion dans la population locale de vecteurs, des gènes létaux (ALPHEY *et al.* 2011). Ces dernières stratégies auront un impact sur la densité vectorielle et/ou la longévité des vecteurs, et par conséquent la capacité vectorielle.

Ces stratégies ne seront efficaces à long terme sans une connaissance approfondie des cycles de transmission dans les différents faciès, de la biologie et de l'écologie des vecteurs locaux. La non prise en compte de l'hétérogénéité comportementale et génétique des vecteurs impliqués dans le système de transmission, c'est-à-dire, la méconnaissance de la biologie et de l'écologie des vecteurs, a été à la base des échecs enregistrés dans l'éradication du paludisme en Afrique (NAJERA *et al.* 2011). La réussite de la stratégie du blocage de la transmission du paludisme repose donc sur une parfaite connaissance du vecteur et surtout des mécanismes physiologiques, moléculaires et environnementaux des interactions *Plasmodium-Anopheles* (TRIPET *et al.* 2008).

L'objectif général de cette thèse était donc d'étudier les déterminants écologiques des interactions *Anopheles gambiae* et *Plasmodium falciparum* dans la transmission du paludisme.

Plus spécifiquement, il s'agissait

- i) de comparer la compétence vectorielle des 3 espèces de vecteurs majeurs du complexe *An. gambiae*, à savoir *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. arabiensis*, vis-à-vis de *P. falciparum* ;
- ii) de déterminer le rôle de l'espèce vectrice dans la diversité des génotypes de parasites transmis ;
- iii) de déterminer le coût de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae* en conditions optimales et de stress.

**CHAPITRE I: GENERALITES SUR LE
PALUDISME, L'AGENT PATHOGENE,
LES VECTEURS ET LEURS
INTERACTIONS**

I.1. DEFINITION DU PALUDISME

Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire, endémo-épidémique, tropicale et intertropicale, caractérisée par la présence dans l'organisme, associée ou non à des signes cliniques, d'un parasite appartenant au genre *Plasmodium* et transmis à l'Homme par la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*. On distingue le paludisme-infestation ou paludisme asymptomatique correspondant à la présence du parasite chez un sujet sans signes cliniques, et le paludisme-maladie correspondant à la présence du parasite associée à des signes cliniques dont le plus souvent la fièvre. Cinq espèces de *Plasmodium* sont responsables du paludisme humain; ce sont : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* (COX-SINGH *et al.* 2008). La mortalité est principalement due à *P. falciparum* qui est l'espèce la plus pathogène.

I.2. AMPLEUR DU PALUDISME

Le paludisme représente un problème majeur de santé publique dans le monde, surtout en Afrique. En effet, selon le rapport 2011 de l'OMS sur le paludisme dans le monde, les estimations font état de 216 millions d'épisodes en 2010, dont 81% dans la région Afrique de l'OMS. Dans les régions sub-sahariennes d'Afrique, cette affection parasitaire constitue la première cause de morbidité et de mortalité. Le nombre de décès dus au paludisme est estimé à 655 000 pour l'année 2010, dont 91% en Afrique. À l'échelle mondiale, 86% des décès imputables au paludisme frappent des enfants de moins de 5 ans. (OMS 2012)

Sur le plan économique, plus de 12 milliards de dollars de perte annuelle de PIB (Produit Intérieur Brut) sont dues au paludisme en Afrique. Il y est responsable de 40% des dépenses annuelles de santé publique. On estime qu'un seul épisode de la maladie coûte environ dix jours de travail. Des recherches montrent que les familles touchées ne défrichent que 40% de la superficie de leur terre pour la culture contrairement aux familles en bonne santé (SACHS et MALANEY 2002).

Le Burkina Faso, pays situé au cœur de l'Afrique de l'ouest, n'échappe pas à cette maladie. Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique et reste une endémie qui touche tout le pays. On distingue trois (3) strates de transmissions :

- une transmission permanente dans les régions du sud et du sud-ouest, toute l'année avec un renforcement en saison de pluies et début de saison sèche;

- une transmission longue, d'environ 4 mois au centre du pays, où 80% des accès palustres sont enregistrés entre juillet et octobre.
- une transmission courte au nord du pays, dans la pointe sahélienne, d'une durée de 2 à 3 mois.

Selon les données statistiques du système national d'information sanitaire, le paludisme constitue la principale cause de consultation, d'hospitalisation et de décès dans les formations sanitaires. En 2012, les structures de santé ont enregistré 6 507 734 cas de paludisme dont 444 207 cas de paludisme grave (MINISTÈRE DE LA SANTÉ, 2013). Les espèces plasmodiales responsables du paludisme au Burkina Faso sont : *P. falciparum* dans plus de 90% des cas, suivi de *P. malariae* (3-8%) et de *P. ovale* (0,5-2%). (CARNEVALE *et al.* 1999).

Les données de chimiosurveillance de 2003 ont révélé des taux d'échecs thérapeutiques allant de 26,9% à 63,3% pour la chloroquine et de 10% pour la sulfadoxine-pyriméthamine. Ces forts taux de chimiorésistances ont nécessité en février 2005, l'adoption d'une nouvelle politique de traitement du paludisme simple au Burkina Faso avec l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. La sulfadoxine-pyriméthamine a été réservée pour le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte.

I.3. LES ANOPHELES VECTEURS : LE COMPLEXE *ANOPHELES GAMBIAE S.L.*

I.3.1. Systématique: structure génétique et spéciation au sein du complexe *An. gambiae s.l.*

Les anophèles sont des diptères nématocères appartenant à la famille des *Culicidae*. Parmi plus de 500 espèces d'anophèles recensées dans le monde, seule une vingtaine sont considérées comme vecteurs majeurs du paludisme, d'autres espèces pouvant jouer un rôle secondaire. Cette aptitude à transmettre le parasite découle des particularités biologiques, écologiques et génétiques très spécifiques qui déterminent la capacité vectorielle d'une espèce.

L'intérêt que portent les scientifiques à l'étude des anophèles et plus particulièrement aux membres du complexe *An. gambiae s.l.* est très étroitement lié à l'importance de la menace qu'ils représentent pour la santé publique. Ce sont les vecteurs les plus efficaces du paludisme en Afrique subsaharienne mais ils sont également impliqués dans la transmission de *Wuchereria bancrofti*, agent de la filariose lymphatique.

Bien que semblables morphologiquement, tous les membres du complexe *An. gambiae* semblent ne pas posséder la même aptitude à transmettre le paludisme ce qui rend particulièrement nécessaire l'identification des différentes espèces qui le constituent. La spéciation au sein des membres d'un complexe d'espèces morphologiquement identiques se traduit généralement par des différences au niveau comportemental et génomique. Les premières indications d'une hétérogénéité au sein des populations d'*An. gambiae* furent en effet basées sur des considérations purement écologiques avec la description de « variants » capables de coloniser des gîtes larvaires saumâtres (MUIRHEAD-THOMSON 1951). Les travaux du Pr. Mario COLUZZI en cytogénétique (COLUZZI *et al.* 1977; COLUZZI *et al.* 1979) ont permis une avancée considérable des moyens d'identification des différentes espèces constitutives du complexe *An. gambiae*, basée sur l'existence d'inversions chromosomiques visualisées dans les chromosomes géants isolés des glandes salivaires des larves au stade IV ou des ovaires des femelles semi-gravides (GREEN 1972). L'identification par cytogénétique, malgré sa mise en œuvre difficile et le niveau d'expertise qu'elle requiert, est longtemps restée la technique de choix dans ce domaine. Les progrès de la biologie moléculaire ont alors permis le développement des sondes ADN spécifiques (COLLINS *et al.* 1986; CRAMPTON et HILL 1993) qui ont débouché sur la mise au point d'un test diagnostique basé sur l'amplification par PCR des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (SCOTT *et al.* 1993). Ce test permet l'identification rapide des spécimens collectés sur le terrain, quels que soient le sexe et le stade de développement.

Le complexe *An. gambiae* comprend aujourd'hui sept espèces bien différenciées :

- An. gambiae s.s* Giles, 1902.
- An. arabiensis* Patton, 1904.
- An. bwambae* White, 1985.
- An. melas* Theobald, 1903.
- An. merus* Boenitz, 1902.
- An. quadriannulatus* Theobald, 1911.
- An. quadriannulatus* B, Hunt, 1998.

An. gambiae s.s. et *An. arabiensis*, à elles seules, sont globalement responsables de 90% de la transmission du paludisme dans la zone intertropicale africaine (CARNEVALE *et al.* 1988). Ce sont ces espèces que nous avons utilisées pour répondre à nos questions de recherche.

Les deux espèces, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, présentent des limites de distribution en Afrique qui semblent être déterminées par des conditions climatiques (MOUCHET *et al.* 2004).

An. gambiae s.s. est l'une des espèces les plus répandues du complexe *An. gambiae*. Elle occupe les zones de forêt mais remonte loin dans les savanes humides jusqu'à la limite de la ceinture sahélienne pré-désertique. *Anopheles arabiensis* est présent au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Elle s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, englobant la zone de répartition d'*An. gambiae s.s.* (MOUCHET *et al.* 2004).

Les femelles d'*An. gambiae s.s.* sont hautement anthropophiles, s'alimentant préférentiellement sur des humains (COLUZZI *et al.* 1979). Toutefois, en Afrique de l'Ouest, elles peuvent être moins spécialistes et se nourrir facilement sur d'autres animaux comme le bétail (DIATTA *et al.* 1998). À la différence d'*An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* a un comportement beaucoup plus flexible avec une anthropophilie partielle en présence d'hôtes alternatifs (COSTANTINI *et al.* 1996). Il est capable de se développer dans des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile (DUCHEMIN *et al.* 2001). En général, *An. gambiae s.s.*, à cause de son anthropophilie préférentielle, a développé une tendance forte pour l'endophagie et l'endophilie, tandis que le plus zoophile, *An. arabiensis* a une tendance plus exophage et exophile.

Les différenciations génétiques entre les espèces majeures du complexe *An. gambiae* ont été très étudiées. En effet, les études génétiques ont été initiées par le fait qu'il existe une stérilité totale ou partielle chez les hybrides. Au début des années 1980, les études de cytogénétique menées sur les inversions paracentriques identifiables sur les chromosomes polythènes ont révélé l'existence d'un système complexe d'inversions polymorphes à l'intérieur de l'espèce *An. gambiae* (COLUZZI 1984; COLUZZI *et al.* 1979; TOURE *et al.* 1994; TOURE *et al.* 1998). *Anopheles arabiensis* se différencie donc d'*An. gambiae s.s.* sur le plan caryotype par la présence d'inversion chromosomique Xbcd et 2La (COLUZZI *et al.* 1979)..

Anopheles gambiae s.s., quant à elle, est en cours de spéciation. En effet, *An. gambiae s.s.* a présenté certaines hétérogénéités génétiques qui confèreraient un certain niveau d'isolement reproductif (DELLA TORRE *et al.* 2001; DIABATE *et al.* 2009). En Afrique de l'Ouest, des investigations portant sur les bras chromosomiques, en particulier les inversions sur le bras droit du chromosome 2 (2R), ont révélé l'existence d'un polymorphisme au sein de cette espèce qui serait composée de plusieurs sous-populations non panmictiques (COLUZZI 1984; COLUZZI *et al.*

2002; PETRARCA *et al.* 1987; TOURE *et al.* 1994). Ainsi un déficit systématique d'hybrides entraînant une déviation de l'équilibre d'Hardy-Weinberg a permis d'isoler cinq formes chromosomiques Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savane sur la base des inversions 2Rbc, 2Ru, 2Rd. Des études moléculaires ont permis de regrouper ces 5 formes chromosomiques en deux formes moléculaires nommées M et S (FAVIA *et al.* 2001).

En Afrique de l'Ouest, la forme moléculaire S est caractérisée par une fréquence élevée de l'arrangement standard sur le chromosome 2 en zones humides (Côte d'Ivoire, Bénin) et par une augmentation de la fréquence des inversions 2Rb et 2La en zones de savanes sèches. D'autres inversions chromosomiques sur le bras 2R (j, c, u et d) ont aussi été trouvées dans les échantillons du Mali et de Guinée. Lors du génotypage de l'ADN ribosomal du chromosome X réalisé sur les trois formes chromosomiques Mopti, Savane et Bamako présents au Mali et Burkina Faso, deux sites RFLP polymorphes dans les fragments intergéniques ont été mis en évidence (DELLA TORRE *et al.* 2002; DELLA TORRE *et al.* 2001; FAVIA *et al.* 1997; FAVIA et LOUIS 1999; GENTILE *et al.* 2001). Au Mali, les échantillons déterminés S par PCR-RFLP présentent les arrangements chromosomiques typiques de la forme Bamako (2Rjcu, 2Rjbcu et 2La). La forme moléculaire M est caractérisée par une fréquence élevée de l'arrangement standard du chromosome 2 en zones humides (Côte d'Ivoire, Bénin, Cameroun, São Tomé) et par les inversions typiques de la forme Mopti (2Rbc, 2Ru et 2La) au Mali et au Burkina Faso. Les deux formes moléculaires M et S rencontrées au Burkina Faso correspondent ainsi respectivement aux formes chromosomiques Mopti et Savane-Bamako (DELLA TORRE *et al.* 2001). La prévalence de ces formes répond essentiellement aux variations climatiques (BAYOH *et al.* 2001). Au Burkina Faso, on rencontre les formes chromosomiques Mopti et Savane (PETRARCA *et al.* 1986).

Quelles que soient les régions, il a été clairement démontré que les flux de gènes entre la forme M et la forme S sont réduits, démontrant un phénomène de spéciation en cours (CHANDRE *et al.* 1999; DELLA TORRE *et al.* 2001; FAVIA *et al.* 2001; SIMARD *et al.* 2009; WHITE *et al.* 2010). De plus, les hybrides de formes moléculaires M/S sont rares dans la nature (COLUZZI *et al.* 1979; SIMARD *et al.* 2009). Les études génomiques basées sur la technique Microarray ont montré des îlots génomiques de spéciation entre les 2 formes moléculaires (TURNER *et al.* 2005; WHITE *et al.* 2010). Récemment il a été montré un nombre important de Single Nucléotide Polymorphisme (SNP) dans la région centromérique du chromosome X entre les formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* comme l'atteste la figure 1 (NWAKANMA *et al.* 2013; REIDENBACH *et al.* 2012).

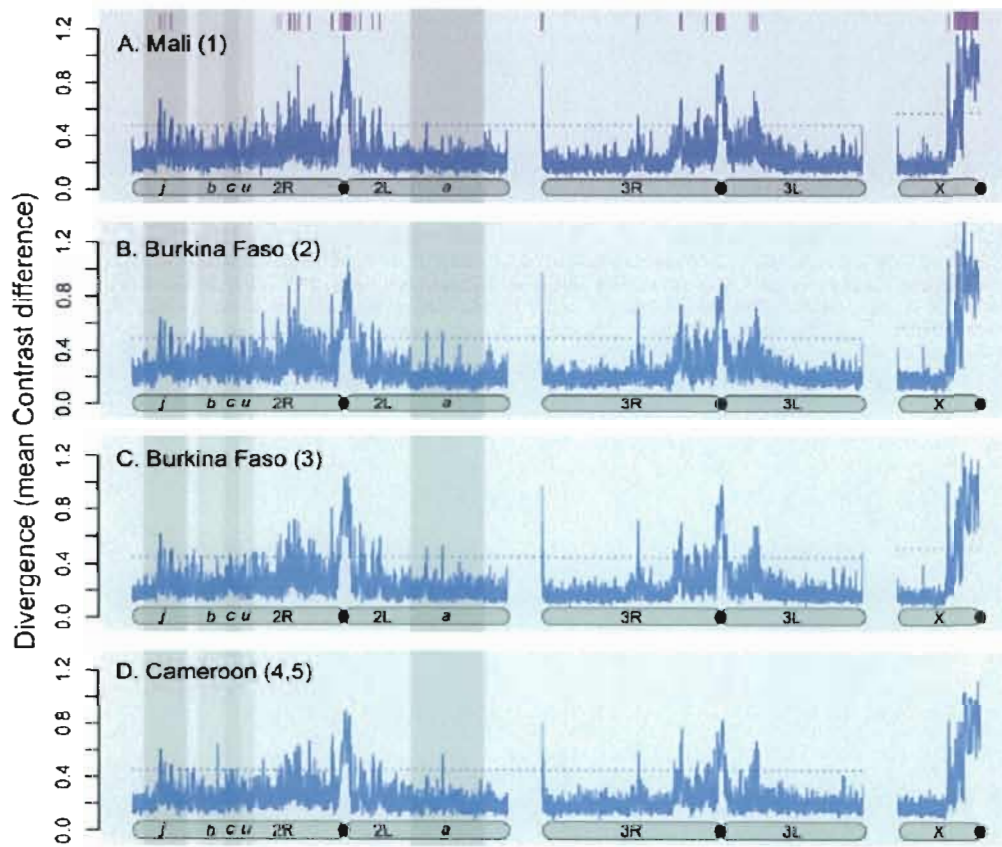


Figure 1 : Divergence génomique entre les 3 chromosomes d'espèces sympatriques *An. coluzzii* et *An. gambiae* (les différences sont élevées dans la région centromériques du chromosome X) (REIDENBACH *et al.* 2012)

Les formes moléculaires M et S présentent des préférences écologiques différentes. *Anopheles gambiae* S se développent préférentiellement dans des gîtes larvaires typiques temporaires alors que les formes moléculaires M d'*An. gambiae* se retrouvent majoritairement dans les gîtes anthropiques semi-permanents ou permanents (DELLA TORRE *et al.* 2002; GIMONNEAU *et al.* 2012b). Elles présentent des sensibilités différentielles aux différents insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes (DIABATE *et al.* 2003b; DIABATE *et al.* 2004). Vue ces différences génétiques et écologiques, on parle d'espèce naissantes ou en cours de spéciation pour *Anopheles gambiae* formes moléculaires M et S. Par conséquent, il a été proposé très récemment de nommer la forme moléculaire M, *Anopheles coluzzii*, et la forme moléculaire S, *Anopheles gambiae* (COETZEE *et al.* 2013).

Les études entomologiques menées relèvent que les principaux vecteurs sont : *An. gambiae s.l.*, *An. funestus* et *An. nili*. En 2011, une nouvelle espèce d'*An. gambiae*, dénommée temporairement *Anopheles gambiae* goundry a été signalée au Burkina Faso, dans une zone aride de savane. Elle diffère des autres sous espèces *An. gambiae*, groupes endophiles traditionnellement, par leur comportement exophile, leur génétique, mais surtout une sensibilité supérieure au *Plasmodium* (58% d'infection à *P. falciparum* contre 35%) (RIEHLE *et al.* 2011).

Les recherches s'intéressent maintenant aux causes et aux mécanismes génétiques à l'origine de ces spéciations au sein du complexe *An. gambiae s.s* et à l'étude d'éventuelle différences de capacité et compétence vectorielles entre ces espèces naissantes.

I.3.2. Le cycle biologique des anophèles : bioécologie, physiologie de la reproduction d'*Anopheles gambiae s.s.* et d'*Anopheles arabiensis*

Comme tous les Diptères, les anophèles sont holométaboles, c'est-à-dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes.

Le cycle biologique des anophèles comprend deux phases :

- une phase aquatique pour les stades préimaginaux ou immatures, œufs, larves (avec 4 stades larvaires entrecoupés chacun d'une mue) et nymphe; les stades larvaires concernent une période de croissance avec une augmentation notable de taille du stade I au stade IV.
- une phase aérienne pour le stade adulte ou imaginal, avec des mâles et des femelles.

✓ Biologie des stades larvaires

Une ponte d'anophèle est composée habituellement de 50 à 300 œufs (SUMBA *et al.* 2004) de forme allongée, ayant 0,5 mm de longueur. Les œufs sont pondus de couleur blanche, puis brunissent. Les œufs d'anophèles sont pondus isolément, en vol, sur la surface de l'eau, et possèdent deux flotteurs latéraux.

Les œufs d'anophèles ne résistent généralement pas à la dessiccation et éclosent dans les 48 heures après l'oviposition (BEIER *et al.* 1990), dès que l'embryon est entièrement développé. Ce délai est allongé lorsque la température diminue. Au cours de son développement, la larve subit 3 mues et passe ainsi par 4 stades larvaires morphologiquement comparables; la mue qui survient entre chaque stade permet l'accroissement de la taille de la larve pendant que la nouvelle cuticule durcit. Au stade IV, la larve d'anophèle mesure environ 12 à 15 mm. Les larves d'anophèles vivent dans l'eau, sont détritiphages et se nourrissent près de la surface de l'eau où elles doivent remonter pour respirer (elles n'ont pas de siphon respiratoire). La durée de vie larvaire est de 5 à 14 jours selon les espèces et les conditions écologiques dont la température qui est l'un des facteurs les plus importants.

À la fin de la vie larvaire survient une métamorphose complète, la cuticule de la larve se fend longitudinalement pour laisser place à une nymphe. La nymphe est remarquable par la coalescence de la tête et du thorax qui forment un céphalothorax volumineux auquel fait suite un abdomen de 10 segments (dont 8 sont bien visibles), terminé par 2 palettes natatoires. Elle est mobile grâce à des contractions brusques de l'abdomen qui lui permettent de se déplacer efficacement et d'échapper aux prédateurs ; elle ne s'alimente pas. Contrairement aux larves, il existe un net dimorphisme sexuel, les nymphes mâles sont plus petites que les femelles et se développent plus rapidement. La durée de vie de la nymphe est courte, un à deux jours généralement. La nymphe respire en utilisant l'oxygène de l'air atmosphérique mais ne s'alimente pas, elle n'est donc pas touchée par les insecticides d'ingestion de type *Bacillus thuringiensis*.

La nymphe représente le dernier stade de la vie pré-imaginale, et de la phase aquatique.

✓ Biologie des adultes

La biologie de l'adulte est caractérisée par deux comportements principaux : l'alimentation et la reproduction qui, chez la femelle, s'accompagnent de la dispersion à la recherche successive de l'hôte vertébré, du site de repos et du gîte de ponte. L'ensemble de ces comportements s'inscrit

dans le « cycle gonotrophique » qui ne concerne évidemment que la femelle puisque le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés et n'est pas hématophage.

Après émergence, les moustiques doivent se reposer au moins 24 heures pour que leur exosquelette durcisse, pour atteindre leur maturité sexuelle et la femelle pour que ses pièces buccales durcissent assez pour pouvoir percer l'épiderme des hôtes vertébrés et prendre un repas de sang. Il leur faut également prendre un repas sucré pour satisfaire leurs besoins énergétiques de vol. Chez les femelles, le sucre peut aussi stimuler le début de développement des ovarioles. L'alimentation sucrée est prise par la femelle tout au long de sa vie et à n'importe quel moment de son cycle biologique selon ses besoins.

L'accouplement se fait peu après l'éclosion imaginale chez la femelle (2^e ou 3^e jour), avant ou après le premier repas de sang. Les mâles sont fertiles après le 3^e jour de vie imaginale, ce délai est nécessaire pour le bon fonctionnement des organes reproducteurs après l'hémi rotation de 180° de l'appareil génital et de l'extrémité abdominale. L'accouplement a alors lieu au crépuscule lors d'essaimages (CHARLWOOD *et al.* 2002; DIABATE *et al.* 2003a; MUIRHEAD-THOMSON 1951)

La femelle n'est probablement fécondée qu'une seule fois (ONYABE *et al.* 1997) et les spermatozoïdes, stockés dans une spermathèque, seront relargués au cours de chaque ponte. Les ovocytes sont fécondés lors de leur passage dans l'oviducte. Seules les femelles sont hématophages. Elles trouvent dans le sang de vertébrés les protéines nécessaires à la maturation des œufs. Par conséquent, seules les femelles sont susceptibles de transmettre le *Plasmodium*. Les mâles se nourrissent de jus sucré. Chez les femelles, la prise de repas de sang sur l'hôte vertébré est primordiale pour la maturation des ovocytes et conditionne la ponte. Les études sur la physiologie de l'appareil reproducteur des femelles de moustique ont montré qu'après l'éclosion imaginale, la croissance normale des follicules de la jeune femelle peut être divisée en deux périodes. D'abord un développement jusqu'au stade de repos (« resting stage ») qui peut être considéré comme une diapause ovarienne. Ensuite, après l'ingestion du repas de sang, un développement complet jusqu'à la formation des œufs matures. Cette vitellogenèse initiale peut se faire aux dépens des réserves nutritives accumulées pendant la vie larvaire. Elle peut également résulter de la digestion de substances hydrocarbonées ou d'une première alimentation sanguine (DETNOVA 1955). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce besoin d'un repas supplémentaire pour stimuler le début de l'ovogénèse. Il est généralement admis que les

imagos provenant des larves sous-alimentées ne formeraient pas, ou pas assez, de vitellus pour que les follicules atteignent le stade 2 moyen (CARNEVALE et MOLINIER 1980). On pense aussi que les femelles néonates s'alimentant très tôt après leur émergence auraient encore leurs follicules au stade 1 et devraient alors prendre deux repas de sang pour mûrir leurs œufs. Par contre, les femelles s'alimentant 2 à 3 jours après leur éclosion auraient des follicules au stade 2 moyen et un seul repas leur suffirait alors pour que la maturation ovarienne soit complète (CHRISTIE 1958). On peut donc distinguer deux catégories de femelles nullipares : celles qui n'ont besoin que d'un seul repas de sang et celles qui doivent piquer au moins deux fois avant de déposer leur première série d'œufs.

L'ensemble des processus qui débute par la recherche de l'hôte, se poursuit par la prise d'un repas de sang puis sa digestion concomitante au développement des ovocytes et se termine par la ponte est connu sous le nom de cycle gonotrophique. Après la ponte, la femelle se met en quête d'un nouvel hôte et un autre cycle commence. Pour la plupart des espèces tropicales, la durée d'un cycle gonotrophique est de 2 à 3 jours. C'est au moment de la prise de sang que le transfert de parasites s'effectue entre l'hôte et le vecteur, et entre le vecteur et l'hôte.

La durée de vie des mâles d'anophèle est nettement inférieure à celle des femelles et se limite à quelques jours.

La fécondité des anophèles varie selon les espèces, l'âge, la saison. Pour *An. gambiae s.l.*, le nombre moyen par ponte est de l'ordre de 150 œufs et la fécondité diminue avec l'âge (BRIEGEL et HORLER 1993; CARNEVALE et MOLINIER 1980).

I.4.L'AGENT PATHOGENE

I.4.1.Classification et espèces pathogènes pour l'Homme

Les agents étiologiques du paludisme humain sont des protozoaires du phylum des *Apicomplexa*, de la classe des *Sporozoea*, de l'ordre des *Haemosporidia*, de la famille des *Plasmodidae*.

Cinq espèces sont à l'origine du paludisme humain :

- *Plasmodium falciparum*, Welch, 1887 est responsable de la fièvre tierce maligne. Il est le plus fréquent en Afrique subsaharienne où 80 à 95% des cas de la maladie lui sont associés. Il est aussi le plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement approprié.

- *Plasmodium vivax*, Grassi, 1890, responsable de la fièvre tierce bénigne. Elle est aussi très répandue dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme. Elle est rare en Afrique subsaharienne, plus fréquente en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Centrale.
- *Plasmodium ovale*, Stephens, 1922 est aussi l'agent d'une fièvre tierce bénigne. Il est très proche de *P. vivax*. Il est considéré comme peu pathogène. Il est rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest.
- *Plasmodium malariae*, Laveran 1881, est responsable d'une fièvre quarte et de troubles rénaux. Elle est rencontrée surtout en Amérique du Sud où il est très fréquent dans certaines tribus d'Amérindiens.
- *Plasmodium knowlesi* proche génétiquement de *P. vivax*, et macroscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie mais était connu antérieurement chez le singe (COX-SINGH *et al.* 2008).

I.4.2. Cycle de vie du *Plasmodium*

I.4.2.1. Chez l'Homme

Chez l'homme, le cycle est divisé en 2 phases : la phase hépatique et la phase sanguine ou érythrocytaire.

✓ Cycle exo-érythrocytaire ou cycle hépatique

Les sporozoïtes sont inoculés à l'homme par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin. Ils vont ensuite passer dans la circulation sanguine et rapidement se diriger vers le foie et pénétrer les hépatocytes. Chaque sporozoïte traverse activement deux hépatocytes, avant d'aller se loger au sein d'une vacuole parasitophore. Au sein de cette vacuole, les sporozoïtes se différencient en trophozoïtes puis en schizontes hépatiques, qui, au bout de 5 à 6 jours, libèrent dans la circulation sanguine jusqu'à 30 000 mérozoïtes (PRUDENCIO *et al.* 2006). La schizogonie hépatique est unique dans le cycle car la cellule hépatique ne peut être infectée que par des sporozoïtes.

✓ Cycle érythrocytaire ou cycle sanguin

Très rapidement les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges. Une fois dans l'érythrocyte, le mérozoïte passe successivement du stade trophozoïte au stade schizonte en 48 ou 72 heures (en fonction de l'espèce). On assiste alors à la destruction du globule rouge hôte et à la libération de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes pénètrent dans de nouveaux globules rouges et

débutent un nouveau cycle de réplication. Cette partie du cycle correspond à la phase clinique : la parasitémie s'élève, le sujet devient fébrile, c'est l'accès palustre. En l'absence de traitement, tous les parasites évoluent progressivement au même rythme. Les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique. La périodicité étant liée à l'espèce, on a : 24 heures pour *P. knowlesi* (COX-SINGH *et al.* 2008), 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*. Après un ou plusieurs cycles érythrocytaires certains mérozoïtes, par un processus encore non élucidé, se transforment en gamétocytes mâles et femelles entamant ainsi le cycle sexué du parasite. Les gamétocytes restent en attente dans leurs hématies circulantes et ne se divisent plus. Ils ont la capacité de persister ainsi plusieurs mois dans la circulation périphérique du malade après sa guérison tout en restant infectants pour le vecteur (NASSIR *et al.* 2005).

Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, une schizogonie hépatique retardée (hypnozoïtes) peut entraîner la libération de mérozoïtes dans le sang plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces 2 espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas dans l'infection à *P. falciparum* et ils n'ont pas été mis en évidence non plus dans l'infection à *P. malariae*.

1.4.2.2. Chez le vecteur : biologie de Plasmodium au cours de son développement sporogonique

Comme évoqué dans l'introduction, le développement du *Plasmodium* dans le moustique est un processus complexe (figure 2), dont le succès détermine la transmission du paludisme. L'anophèle femelle est non seulement le vecteur du *Plasmodium* mais aussi, l'hôte définitif, car c'est chez elle que se passe la multiplication sexuée du *Plasmodium*. La femelle est infectée quand elle ingère du sang contenant des gamétocytes. Dans la lumière de l'estomac, les gamétocytes mâles et femelles matures après exflagellation donnent respectivement des gamètes mâles et femelles après exposition à l'environnement (température, pH, exposition à l'acide xanthurenique) et à des facteurs spécifiques de l'anophèle, qui peuvent varier en fonction des espèces de *Plasmodium* et d'anophèles (BILLKER *et al.* 2004; BILLKER *et al.* 1998; BILLKER *et al.* 1997; MUHIA *et al.* 2001). Dans l'heure qui suit l'ingestion du sang, la fécondation a lieu avec l'entrée du noyau, petit et dense, du microgamète mâle dans le macrogamète femelle, suivie de la

fusion des deux noyaux. Cette fusion est accompagnée de l'appariement des chromosomes qui permet la recombinaison entre les génomes paternel et maternel. Les molécules activatrices tels le CDPK4 (calcium-dependent protein kinases), régulent le développement des gamétocytes mâles et la MAPK (gametocyte-specific mitogen-activated) stimule la formation des gamètes mâles (BILLKER *et al.* 2004).

À ce stade, l'immunité du sujet humain interviendrait par l'intermédiaire d'anticorps tels que anti-Pfs25 et Pfs48/45, qui peuvent limiter, voire empêcher, cette fécondation laissant suspecter l'implication des protéines correspondantes dans la reconnaissance entre les gamètes mâles et femelles avec, pour conséquence, un blocage de la transmission (KASLOW 1990; LENSEN *et al.* 1992).

Entre 5 et 7 heures (h) après le repas, le zygote diploïde subit une endoméiose qui débute comme une méiose classique mais qui ne se termine pas par une division cellulaire, le produit final étant une seule cellule. La prise de repas de sang par le moustique stimule la formation de la membrane péritrophique. Cette membrane est une barrière physique pour l'invasion des ookinètes. Les ookinètes sécrètent des chitinases qui perforent la membrane péritrophique.

Entre 9 et 24 h après le repas, ce zygote entreprend une différenciation en un ookinète en passant par une forme dite *retort* vu son aspect en forme de virgule. Sur l'ookinètes ont été trouvées des molécules dont deux, P25 et P28, ont été identifiées pour la préparation d'un vaccin qui bloquerait le développement ultérieur du *Plasmodium*, donc la transmission homme – anophèle du parasite (AMBROISE-THOMAS 1997; DUFFY et KASLOW 1997).

Dans les 24 h suivant l'ingestion du repas de sang infectant, l'ookinète traverse la matrice péritrophique qui entoure le sang dans l'estomac, puis passe dans le faible espace entre cette matrice et les cellules de l'épithélium stomacal, adhère à ces cellules, principalement dans la zone distale de l'estomac, et passe entre elles (ou à travers elles). Plusieurs protéines clés du parasite facilitent l'invasion des ookinètes parmi lesquelles, on peut citer, l'ookinète circumsporozoïte (CS), le thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), secreted ookinète adhesive protein (SOAP), von Willebrand factor A domain-related protein (WARP), Membrane-attack ookinète protein (MAOP) (BARILLAS-MURY and KUMAR 2005).

Suite à l'invasion des ookinètes, les cellules épithéliales présentent des modifications pathologiques rapides, incluant une mort cellulaire programmée (apoptose), une lyse rapide et une extrusion hors de l'épithélium dans la lumière de l'estomac. Des études histologiques ont

montré que la traversée de la membrane de l'estomac d'*An. stephensi* par *P. falciparum* entraînent une modification dramatique dans la coloration, une condensation du noyau des cellules épithéliales, et une perte de villosité de l'estomac (BATON and RANFORD-CARTWRIGHT 2004).

Entre 24 et 36 h après le repas de sang, l'ookinète se positionne entre la couche cellulaire et la membrane basale de l'estomac et se transforme en un oocyste. La réponse humorale de l'anophèle serait capable d'attaquer les oocystes et de les mélaniser grâce à l'intervention des molécules effectrices transcrites.

Entre 9 et 15 jours après le repas infectant, l'oocyste, situé sous la membrane basale, grossit régulièrement pour atteindre un diamètre de l'ordre de 20 à 60 μm . On se rappelle que c'est ce grossissement qui a particulièrement attiré l'attention de Ross en 1897 et lui a permis d'incriminer l'anophèle dans le déroulement du cycle de développement du *Plasmodium*. Le noyau du jeune oocyste entreprend une série d'endomitoses synchrones qui vont produire les sporoblastes, puis les sporozoïtes haploïdes (BATON et RANFORD-CARTWRIGHT 2004). On estime que 13 divisions mitotiques ont lieu et produisent jusqu'à 8 000 sporozoïtes par oocystes (SINDEN 2009).

Les sporozoïtes quittent l'oocyste, soit individuellement à travers des microperforations de la paroi oocystique, soit massivement à la faveur d'une rupture importante de cette paroi. Les facteurs déclenchant cette rupture (mécaniques et enzymatiques) ne sont pas encore bien connus. Les gènes tels que ECP1 (Egress Cysteine Protease 1) (ALY and MATUSCHEWSKI 2005), SERA8 (Serine Repeat Antigen 8) seraient impliqués dans ce processus de sortie des sporozoïtes de l'oocyste à travers un mécanisme de clivage protéolytique des oocystes (ALY et MATUSCHEWSKI 2005). Les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires via l'hémolymphe, qui est le système circulatoire des moustiques contenant des cellules de phagocytes appelées hemocytes (aenocytoides, pro-haemocytes et granulocytes) (CASTILLO *et al.* 2006). Les sporozoïtes doivent arriver dans les glandes salivaires pour achever leur maturation. L'adhésion, la pénétration et la sortie des sporozoïtes de la membrane des cellules acineuses pour arriver au canal salivaire font intervenir essentiellement 2 protéines sporozoïtiques, le CSP (circumsporozoïte surface protein), le MAEBL (apical membrane antigen/erythrocytebinding-likeprotein) (KAPPE *et al.* 2004).

Les sporozoïtes libérés par l'oocyste sont morphologiquement matures, mais ils sont moins infectants que ceux des glandes salivaires (NAITZA *et al.* 1998). On considère que les anophèles

qui ont des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires restent potentiellement infectants tout le reste de leur vie, suggérant que les glandes salivaires constituent un environnement très favorable aux sporozoïtes.

La durée totale du cycle sporogonique est variable selon la température et l'espèce plasmodiale considérée. Dans les conditions climatiques tropicales, entre 25° et 30 °C, la durée du développement extrinsèque est de l'ordre de 8 à 12 jours pour *P. falciparum* chez *An. gambiae* (ROBERT et BOUDIN 2003).

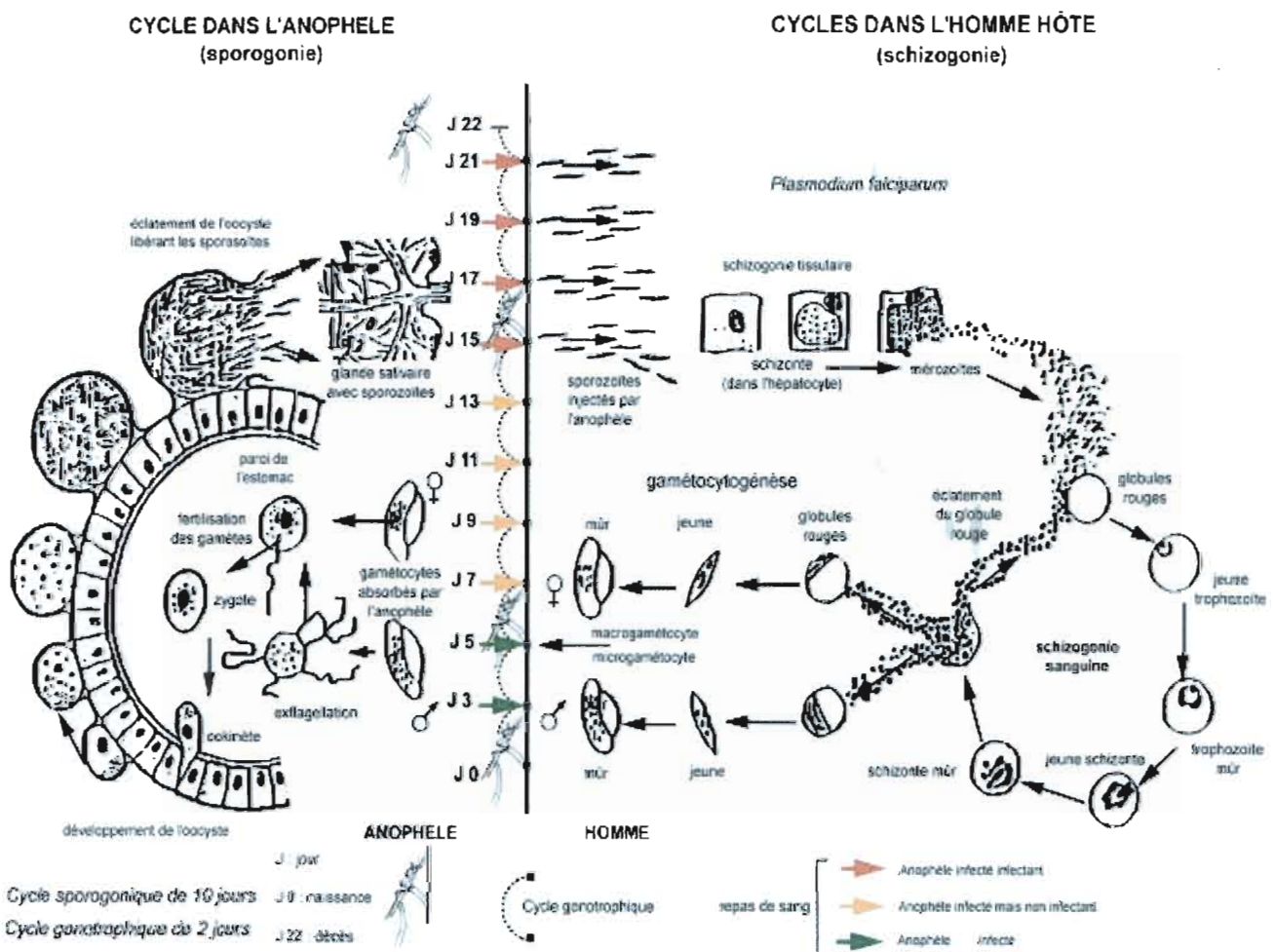


Figure 2 : Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum* (MOUCHET et al. 2004).

(Ce schéma illustre l'importance de la longévité des vecteurs dans la transmission du parasite : une femelle ayant pris un repas infectant a besoin d'au moins 15 jours d'espérance de vie pour transmettre au moins une fois le parasite).

I.5.LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME

Compte tenu de l'apparition de résistances aux antimalariques chez *P. falciparum*, agent infectieux responsable du paludisme grave, la chimioprophylaxie antipaludique n'est envisageable que dans des cas bien particuliers (voyageurs de zones indemnes de paludismes, femmes enceintes, enfants de moins de 5 ans).

La lutte antivectorielle est donc actuellement la seule méthode de prévention de masse applicable en zone d'endémie palustre.

I.5.1. Méthode de lutte antivectorielle actuelle

La lutte contre la transmission du paludisme a pour but de diminuer soit la densité des moustiques, soit la réduction du contact homme-vecteur.

✓ Réduction de la densité de moustiques

- **La lutte antilarvaire** : La plupart des méthodes de lutte visant à réduire la production de moustiques nécessitent le traitement des gîtes larvaires. Cependant, une lutte antilarvaire bénéfique au plan épidémiologique contre le paludisme implique une réduction quasi-totale des gîtes à anophèles, principalement dans les zones à paludisme stable où la transmission est assurée par un petit nombre de vecteurs. Des rares exemples de contrôle efficace utilisant des poissons larvivores culiciphages ont été observés dans des zones de paludisme instable, où les gîtes larvaires éteint limités et facilement repérables.

- **La lutte imagocide** : La principale méthode de lutte « imagocide » est l'aspersion intradomiciliaire. Cette technique est encore utilisée en Afrique pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. funestus* et *An. gambiae*. Le DDT fut longtemps l'insecticide de choix pour les aspersion de par sa rémanence et son efficacité contre les moustiques et autres insectes nuisibles (cafards et punaises ...). Cependant, il fut au fur et à mesure remplacé par des insecticides moins rémanents dans l'environnement comme certains organophosphorés (malathion), carbamates (bendicarb) ou pyréthrinoïdes (perméthrine). Le traitement intradomiciliaire présente cependant l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles (*An. arabiensis* par exemple), qui continuent de prendre des repas sanguins, assurant ainsi un niveau minimal de transmission.

✓ Réduction du contact homme-vecteur

Cette stratégie vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique. Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (SNOW 1987). Leur efficacité s'est vue renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (DARRIET 1991), ajoutant à la barrière physique, un effet répulsif et létal. En effet, l'effet répulsif des pyréthrinoïdes empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque celles-ci sont trouées après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques quant à lui contribue à la protection communautaire conférée par les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). En effet, avec une couverture de la population supérieure à 80%, elles entraînent une diminution de la transmission palustre (« effet de masse ») en réduisant la densité vectorielle, la durée de vie du moustique, ainsi que les indices sporozoïtiques (LENGELER 2004). La recherche de nouveaux composés a abouti à la mise sur le marché d'insecticides organophosphorés (malathion et fénithion), de carbamates (propoxur et bendicarb utilisés en aérosol comme imagocides) et surtout les pyréthrinoïdes synthétiques tels que la perméthrine, la deltaméthrine et la lambdacyhalothrine. Ces derniers sont très utilisés actuellement pour les traitements intradomiciliaires, mais le problème des résistances et de leur rémanence dans l'environnement deviennent très préoccupants.

Ces outils de lutte et de prévention utilisés seuls ou de manière intégrée ont permis de faire baisser les taux de mortalité par le paludisme de plus de 25% à l'échelle mondiale depuis l'an 2000 à nos jours et de 33% dans la région africaine de l'OMS.

L'idée de l'élimination voire d'éradication du paludisme connaît actuellement de réels engouements. L'élimination du paludisme est l'interruption de la transmission localement ; alors que l'éradication est la réduction à zéro de l'incidence mondiale de l'infection palustre.

Les pays tels que les Émirats Arabes Unis, le Maroc, le Turkménistan ont été inscrits au registre officiel des zones où l'élimination du paludisme a été réalisée depuis que l'OMS a repris les procédures de certification en 2004. Cette élimination est due en partie à l'efficacité de la lutte antivectorielle qui utilise principalement les insecticides chimiques. Toutefois, la résistance des anophèles aux insecticides pourrait compromettre ces avancées. Il n'existe pas encore de vaccins antipaludiques efficaces disponibles. Cela constitue une grave menace pour la lutte contre le paludisme surtout dans les zones endémiques, à transmission stable où la situation est alarmante. Le développement d'outils de lutte alternative visant la transmission, très efficaces sur le plan

santé publique et moins couteux constitue un enjeu prioritaire de recherche pour atteindre le défi de l'élimination du paludisme. La lutte génétique et les vaccins altruistes dirigés contre les antigènes de stades sexués du parasite chez le vecteur sont à l'étude. Ils pourraient permettre de bloquer la transmission chez le moustique.

I.5.2. Concepts innovants de lutte antivectorielle : la lutte génétique contre les vecteurs du paludisme

Les recherches sur le génome des moustiques et le génie génétique («entomologie moléculaire» (MULLA 1994)) sont en plein essor et la manipulation des vecteurs pour en altérer la compétence vectorielle ou la capacité vectorielle ouvre de larges perspectives. L'intérêt de cette nouvelle orientation en termes de lutte antivectorielle réside dans l'auto-propagation du principe actif (diffusion d'un ou plusieurs gènes au sein de populations naturelles).

L'élimination voire l'éradication de la transmission du paludisme par les méthodes génétiques a pour but de diminuer leur capacité vectorielle voire d'éradiquer la population vectorielle ou de diminuer la compétence vectorielle. D'une manière générale, diminuer la capacité vectorielle peut être envisagé par différentes stratégies, généralement classées selon le facteur de transmission qu'elles touchent. En effet, certaines méthodes ont pour objectif de réduire la densité de moustiques, la longévité des femelles adultes tandis que d'autres visent à réduire le contact homme-vecteur.

La diminution de la compétence vectorielle implique le remplacement des populations sauvages par de nouvelles populations de moustiques génétiquement modifiées réfractaires à l'infection plasmodiale ou par des populations modifiées génétiquement qui ne piquent pas l'homme.

✓ La réduction de la population de vecteurs et leur longévité :

Deux techniques innovantes de diminution de la population vectorielle en voie d'expérimentation sont la technique de lâcher massif des mâles stériles ou technique d'insectes stériles (TIS) et le relâchement d'insectes à gènes létaux dominants (en anglais Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene, RIDL[®]) (ALPHEY *et al.* 2002; THOMAS *et al.* 2000).

La stérilisation par manipulation génétique, par des techniques chimiques (chimiostérilisation) ou par irradiation des anophèles mâles pourrait potentiellement empêcher la croissance de la population de moustiques et ainsi réduire le risque de paludisme. L'une des limites majeures avec

la TIS est attribuée à une faible compétitivité sexuelle des mâles stérilisés comparativement aux mâles sauvages (REISEN *et al.* 1980).

Le concept de lâcher d'insectes à gènes dominants létaux, RIDL, basé sur l'utilisation de gènes létaux dominants chez la femelle, a été proposé comme une amélioration possible de la technique TIS. Les moustiques à gènes létaux dominants lorsqu'ils sont nourris avec la tétracycline expriment le lacZ létaux pour les femelles. L'accouplement des mâles transgéniques avec des femelles sauvages entraîne la mort des progénitures femelles. La technique RIDL a été développée chez la drosophile (THOMAS *et al.* 2000) et est en utilisation chez *Aedes*.

✓Le remplacement de la population de vecteurs

Théoriquement, les vecteurs naturels de *Plasmodium* peuvent être remplacés par des anophèles transgéniques réfractaires à ce parasite (CATTERUCCIA *et al.* 2000; PERERA *et al.* 2002). La lutte anti vectorielle par moustiques transgéniques réfractaires à l'infection nécessite en premier lieu l'identification de gènes cibles à modifier afin de rendre les populations vectorielles réfractaires aux *Plasmodium*. Les recherches dans ce domaine sont nombreuses et progressent rapidement. Différents niveaux de réfraction à la transmission de *Plasmodium* ont été réalisés en utilisant les moustiques génétiquement modifiés (MGM) exprimant une multitude de gènes effecteurs (CIRIMOTICH *et al.* 2010; ITO *et al.* 2002; MOREIRA *et al.* 2002). Plusieurs approches sont utilisées pour générer les MGM réfractaires à l'infection plasmodiales en exploitant les inhibiteurs de gènes codant pour les récepteurs protéiques indispensables à l'invasion tissulaire et/ou les agonistes et antagonistes immunitaires du vecteur.

Actuellement deux modèles d'anophèles transgéniques sont développés avec comme cibles des récepteurs protéiques utilisés par le parasite lors de sa pénétration tissulaire.

Une lignée transgénique d'*An. stephensi*, exprimant artificiellement un peptide appelé, SM1, liée à la glande salivaire et à l'estomac d'*An. stephensi*, inhibe significativement le passage des ookinètes de *P. berghei* à travers l'épithélium stomacal du moustique (ITO *et al.* 2002).

Auparavant, il a été montré que le venin du serpent riche en phospholipase A2 (PLA2) a une activité sur l'inhibition de la traversée stomacale des ookinètes (ZIELER *et al.* 2001). Une souche transgénique d'*An. stephensi* exprimant la production et l'activité de l'enzyme PLA2 a été

produite en utilisant comme promoteur une carboxypeptidase. Le mécanisme d'action de la PLA2 n'est pas bien connu (MOREIRA *et al.* 2002).

Le séquençage complet du génome d'*An. gambiae* (HOLT *et al.* 2002), a également permis de noter une famille de 79 gènes de récepteurs olfactifs, noté AgOR1 à AgOR79. Certains de ces récepteurs se révèlent être dotés d'une sensibilité élevée pour un odorant humain spécifique. Des pièges à odeur pourraient être développés. Également une manipulation des gènes impliqués dans l'odorat peut être envisagée afin de dévier les comportements des femelles impliqués dans la transmission, par exemple transformer les espèces anthropophiles en espèces zoophiles, donc une diminution du contact homme-vecteur. Ou encore, une modification des gènes impliqués le choix du partenaire sexuel au cours de la reproduction des anophèles, ou des gènes impliqués dans la reconnaissance des gîtes de ponte par la femelle gravide, pourraient être envisagées (DUGASSA *et al.* 2013; HOFFMAN *et al.* 2012; RINKER *et al.* 2013).

La **paratransgénèse** a également été évoquée comme une alternative en cas de limites techniques de modification génétique des vecteurs. Il s'agit là, d'une manipulation génétique des bactéries de la flore intestinale pour exprimer ou sécréter des peptides bloquant l'invasion ou entraînant la mort du parasite dans l'estomac du moustique. Cette stratégie a été implémentée au laboratoire avec succès dans le contrôle de la transmission de *Trypanosoma cruzi* par *Rhodnius prolixus* (BEARD *et al.* 2002). Dans les cas de l'anophèle, les recherches s'orientent d'abord sur l'identification de la flore bactérienne et le rôle de la flore sur la réponse immune des anophèles (BOISSIERE *et al.* 2012; CHAVSHIN *et al.* 2012; CIRIMOTICH *et al.* 2010; DINPARAST DJADID *et al.* 2011). Chez *An. gambiae*, des symbiontes tels que des bactéries des genres *Enterobacter* et *Asaia* semblent être d'excellents candidats (CAPONE *et al.* 2013; PUMPUNI *et al.* 1996; RIEHLE *et al.* 2007)

Une autre approche de la paratransgénèse est l'utilisation de bactéries telles que *Wolbachia*. Cette bactérie symbiotique chez de nombreux arthropodes, non chez l'anophèle, est transmise maternellement par les œufs. Ne conférant pas d'avantages physiologiques intrinsèques à leurs hôtes, elles manipulent leur sexualité de différentes manières incluant la féminisation des mâles génétiques, la parthénogenèse, le male-killing ou encore l'incompatibilité cytoplasmique qui conduisent à une mort prématurée des embryons. Chez les anophèles, l'introduction des *Wolbachia* grâce à des outils génétiques (RASGON *et al.* 2006) et leur maintien dans les populations permettrait alors de limiter la croissance des populations de moustiques (ITURBE-

ORMAETXE *et al.* 2011; WALKER et MOREIRA 2011). Récemment, il a été montré que les *Wolbochia* diminueraient la susceptibilité d'*An. stephensi* et d'*An. gambiae* à l'infection par *P. falciparum* (BIAN *et al.* 2013; HUGHES *et al.* 2011).

L'utilisation de moustiques transgéniques nécessite évidemment un nombre considérable de recherches en amont pour s'assurer de la faisabilité de l'approche : l'innocuité, acceptabilité par les populations humaines. Elle nécessite également une connaissance approfondie de la structure génétique des populations naturelles de vecteurs, des souches sauvages de parasites et de leurs interactions. En effet, une condition *sine qua non* à la mise en pratique de la transgénèse est d'étudier la réponse évolutive du vecteur et du parasite aux transgènes. La modification du gène d'intérêt doit être le moins couteux pour le moustique et doit apporter un bénéfice afin d'assurer sa capacité reproductive et de diffusion dans les populations naturelles.

✓ Les vaccins bloquant la transmission (TBV)

Ils visent à interrompre le développement des parasites chez le moustique. Ces vaccins ont pour principe d'activer le système immunitaire de l'homme grâce à des antigènes exprimés durant les stades sexués du développement de *P. falciparum* (gamétocyte, gamète, zygote, ookinète) ou encore contre des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal du moustique sur lesquels les parasites se fixent pour produire des anticorps capables d'agir chez le moustique.

Plusieurs candidats vaccins ont été développés : P48/45 et P230 sont des protéines cibles présentes sur les gamètes mâles et femelles des *Plasmodium* et également sur les gamétocytes circulantes (QUAKYI *et al.* 1987); HAP2, spécifiquement exprimée sur les gamètes mâles (BLAGBOROUGH et SINDEN 2009); P25/28 est exprimée à la surface des zygotes et des ookinètes (GOZAR *et al.* 1998; KASLOW *et al.* 1988); APN1, une protéine de la surface de l'épithélium intestinal. Tous ces candidats vaccins sont en évaluation (DINGLASAN *et al.* 2007; LAL *et al.* 2001). Le vaccin le plus prometteur aujourd'hui est celui dirigé contre les antigènes P25 et P28 (DA *et al.* 2013; WU *et al.* 2008). En plus de l'identification des molécules immunogènes bloquant la transmission, la recherche sur les TBV s'oriente actuellement sur l'évaluation de l'efficacité des antigènes en condition semi-naturelle, les systèmes de production des antigènes *in vitro*, et des formulations de vaccins avec des adjuvants tolérés.

I.6. DIVERSITE GENETIQUE DE *P. FALCIPARUM* ET PRINCIPES D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE :

I.6.1. Diversité génétique de *P. falciparum*

Le développement de vaccins a été la motivation première pour l'étude de l'ADN de *P. falciparum* (DAY *et al.* 1992; WALLIKER 2005).

L'analyse des chromosomes de *P. falciparum* a été relativement tardive car ils ne se condensent pas et ne sont donc pas visibles. La séparation des chromosomes par leur taille a pu se faire par électrophorèse. Le parasite possède 14 chromosomes. Ces 14 chromosomes codent pour 5300 gènes dont une large proportion est dévolue à l'évasion immune et aux interactions hôte-parasite. L'extrême plasticité du génome de *P. falciparum* induit une diversité génétique et antigénique importante. La comparaison des profils alléliques de différentes populations plasmodiales, par calcul de dissemblance comme les *F_{st}* (F statistique « Sub-population within total »), montre une structuration des populations de *P. falciparum* plus ou moins marquée selon les continents et les régions (ANDERSON *et al.* 2000b; BOGREAU *et al.* 2006). La détermination du nombre d'allèles sur différents chromosomes met ainsi en évidence un niveau de diversité génétique élevé en Afrique, intermédiaire en Asie du Sud-Est et plus faible en Amérique du Sud (ANDERSON *et al.* 2000b).

La diversité génétique des populations de *P. falciparum* peut être affectée par divers types de pressions de sélection, par exemple immunes (chez l'homme comme chez le moustique), ou médicamenteuses. Cette diversité s'observe tout à la fois sur des séquences non codantes, c'est-à-dire supposées neutres, comme les microsatellites, et sur des séquences exprimées (antigènes de surface MSP1 et 2 par exemple), ou médicamenteuses (pour les gènes codant pour des protéines impliquées dans la chimiorésistance comme PfCRT par exemple) (BOGREAU *et al.* 2006).

Afin de s'affranchir de profils particuliers dus à des pressions de sélection sur certains gènes, les études d'épidémiologie moléculaires doivent reposer sur l'analyse de polymorphismes génétiques sélectivement neutres (BOGREAU *et al.* 2006). Les microsatellites, particulièrement nombreux chez *P. falciparum* (SU et WELLEMS 1996), représentent des marqueurs d'intérêt (ANDERSON *et al.* 2000b; BOGREAU *et al.* 2006), à condition qu'ils soient situés à distance des loci soumis à des pressions de sélection comme les gènes impliqués dans la chimiorésistance. Les microsatellites en déséquilibre de liaison (c'est-à-dire une association non aléatoire) avec des

marqueurs soumis à pression de sélection pourraient en effet subir une restriction de polymorphisme, comme cela a été montré pour les microsatellites proches des gènes *Pfprt* et *Pfdhfr* (SU *et al.* 2007; WOOTTON *et al.* 2002).

Lorsqu'un moustique ingère des gamétocytes de parasites génétiquement différents, de nombreuses recombinaisons méiotiques ou crossing-over se produisent au sein du moustique lors de la courte phase diploïde issue de la fécondation. Ainsi, la fécondation est à l'origine d'un brassage des gènes à l'origine de nouvelles combinaisons alléliques et de nouveaux haplotypes (SU *et al.* 2007).

Le polymorphisme génétique est donc plus important dans les régions où la transmission du paludisme est intense, car le parasitisme humain est fréquemment polyclonal, et les recombinaisons méiotiques chez le moustique surviennent alors fréquemment entre parasites génétiquement différents. Il apparaît au contraire limité dans les zones de faible transmission (ANDERSON *et al.* 2000b; BOGREAUX *et al.* 2006).

I.6.2. Génétique des populations appliquée au paludisme

I.6.2.1. Principe

La génétique des populations est l'étude de la répartition de la diversité génétique entre et au sein de populations naturelles et des forces génétiques, écologiques ou environnementales qui la gouvernent. Ces forces, nombreuses et interactives, sont notamment la mutation, la recombinaison, la sélection, la migration, la distance géographique entre individus et le système de reproduction. Reconnaître et quantifier ces facteurs est essentiel pour déterminer ou prédire l'évolution des populations de parasites et leurs vecteurs permettant de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie transmise

En effet, les forces régissant la structure génétique des populations de vecteurs et des pathogènes hébergés vont également jouer un rôle primordial dans la capacité à transmettre l'agent pathogène ou à résister à un moyen de contrôle.

La complexité de ces systèmes nécessite le recours à des modèles mathématiques reposant sur un certain nombre de postulats simples qui permettront l'analyse des structures génétiques existantes. (SIMARD 1999)

I.6.2.2. Modèles mathématiques

Le modèle de Hardy-Weinberg est le modèle le plus simple des modèles mathématiques, et il sert de base à la génétique des populations. Il a été publié simultanément et indépendamment par le mathématicien anglais, GH Hardy et par le médecin allemand, W. Weinberg en 1908. Ce modèle décrit les relations entre fréquences alléliques et génotypiques dans une population idéale.

Les hypothèses permettant de simplifier les calculs sont :

- les gamètes s'associent au hasard (panmixie),
- la population est de taille infinie,
- la fréquence des gènes n'est pas modifiée d'une génération à l'autre par la mutation, la sélection, ou l'apport extérieur de nouveaux gènes (migration).

Dans ces conditions, les fréquences alléliques restent stables au cours des générations et les fréquences génotypiques se déduisent des fréquences alléliques par la relation :

- Homozygotes : $A_i A_i = p_i^2$
- Hétérozygotes : $A_i A_j = 2p_i p_j$

p_i et p_j sont les fréquences des allèles, A_i et A_j , respectivement dans la population. La population est alors dite en équilibre de Hardy-Weinberg.

Cette relation entre fréquences alléliques et génotypiques est vraie dès qu'il y'a panmixie. L'influence de la taille de la population, de la mutation, de la sélection et de la migration n'intervient qu'au niveau de la constance des fréquences alléliques au cours des générations.

Deux méthodes peuvent être utilisées dans le but d'étudier la structure génétique des populations et plus particulièrement les flux des gènes :

✓ **Méthode directe** : elle consiste à l'observation directe sur le terrain des flux migratoires et de la dispersion des individus et fait notamment appel par exemple aux techniques de capture-marquage-recapture. Cependant, elle est impossible à appliquer dans l'étude de la structuration des populations parasitaires.

✓ **Méthode indirecte** : cette méthode s'appuie sur l'observation de la répartition des fréquences alléliques par l'utilisation des marqueurs génétiques. La méthode d'analyse des données la plus utilisée est celle développée par Wright afin d'estimer la variance standardisée des fréquences alléliques entre les sous-populations. Wright a construit un ensemble d'outils mathématiques basé sur les rapports d'hétérozygotie observée et attendues

sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans chaque sous-population et sur la population totale, les **statistiques F**. Trois coefficients sont utilisés : le **Fis** (F statistique «Individual within subpopulation »), le **Fst** et le **Fit** (F statistique «Individual within total»).

Ces trois paramètres sont reliés par l'équation : $(1-Fit) = (1-Fis) (1-Fst)$.

De façon générale, Les populations naturelles d'organismes sont subdivisées à 3 niveaux, en individus, en sous-populations et en populations totales. La variance entre individu au sein d'une sous-population estime la **Fis**. La variance entre sous-population au sein de la population totale estime la **Fst**. Et enfin, la variance entre individus au sein de la population totale estime la **Fit**.

Le **Fst** estime la différence de fréquence allélique entre deux ou plusieurs populations à un locus donné. Les valeurs **Fst** sont comprises entre 0 (aucune différenciation) et 1 (chaque sous population est différenciées par des fréquences alléliques différentes). Ce test est réalisé après 1500 permutations de génotypes. Le calcul de probabilité *p* non significatif correspond à la probabilité que l'hypothèse nulle soit vraie, c'est-à-dire que la différenciation génétique (la valeur **Fst**) observée soit due au simple hasard. Le seuil de signification a été fixé à 5%.

Cependant, les populations naturelles de vecteurs sont fragmentées et hiérarchisées dans les individus hôtes, pouvant être d'espèces différentes, distribuées dans le temps et l'espace. Pour le cas des parasites à transmission vectorielle, comme le *Plasmodium*, la structuration des oocystes se fait au sein de l'estomac d'une espèce de moustique donnée, entre espèce de moustique et population de moustique. Cet exemple montre une hiérarchie à 3 niveaux. L'analyse de la distribution de la variabilité génétique neutre du parasite doit donc prendre en compte l'effet de l'individu oocyste, moustique et homme, sur la structuration de la diversité.

1.6.2.3. Outils moléculaires : le cas des microsatellites

Ce sont de petites séquences d'ADN non codant de 2 à 5 paires de bases répétées en tandem, le nombre de répétition présente souvent un polymorphisme, ce qui engendre un polymorphisme de longueur de la région qui contient les répétitions. Les microsatellites sont très répandus sur le génome des eucaryotes (TAUTZ et RENZ 1984). Leurs allèles sont codominants et, étant situés dans des régions non codantes du génome, ils sont généralement considérés comme des marqueurs génétiques neutres, qui les rendent intéressants pour les études de génétique de population. Leur fonction biologique reste peu connue (EPPLEN *et al.* 1993).

Les séquences microsatellites sont extrêmement abondants dans le génome de *P. falciparum* (SU and WELLEMS 1996). Douze marqueurs microsatellites, TA1 (chromosome 6), TA40 (chromosome 10), Polyα (chromosome 4), TAA60 (chromosome 13), ARA2 (chromosome 11), Pfg377 (chromosome 12), Pfpk2 (chromosome 12), TAA87, TAA109 (chromosome 6), TAA81 (chromosome 5), TAA 42, 2490, semblent être intéressants pour les études de génétique de population et d'épidémiologie de *P. falciparum* pour les caractéristiques suivantes :

- **Une mise en évidence aisée des allèles** : une amplification de ces loci microsatellites par PCR nichée grâce à des amorces spécifiques et une détermination automatisée de la taille des allèles.
- **Une spécificité des amorces à *P. falciparum***
- **Un taux de mutation élevé générant un important polymorphisme** : Ces mécanismes particuliers confèrent aux microsatellites un taux de mutation très élevé. Ces forts taux de mutations rendent les microsatellites très polymorphes et donc potentiellement très résolutifs pour les études de génétiques des populations. Ils définissent en général de par leur taille (inférence au nombre de répétitions) la présence d'allèles différents.
- **La reproductibilité** : elle varie entre 92 à 98%.
- **Des modèles de mutation et d'interprétation de données spécifiques** : leur fort pouvoir résolusif permet de détecter le polymorphisme entre des individus génétiquement proches en utilisant plusieurs logiciels pour analyser la taille des allèles de chaque microsatellite. (ANDERSON *et al.* 1999)

De nombreuses études menées dans les pays endémiques du paludisme ont montré la multiplicité et la diversité génotypique des populations de *Plasmodium* de l'infection humaine (BOGREAU *et al.* 2006; BRANCH *et al.* 2001). Ces études de génétique de population se sont basées sur le stade haploïde sanguin du parasite. La recherche s'oriente actuellement sur le rôle de l'espèce vectrice, chez qui, se passe la multiplication sexuée, donc les recombinaisons génétiques, sur la diversité des génotypes transmis en utilisant des marqueurs les microsatellites (ANNAN *et al.* 2007; PRUGNOLLE *et al.* 2008; RAZAKANDRAINIBE *et al.* 2005).

Dans notre étude, nous avons utilisé le génotypage par microsatellite pour étudier la diversité de la population plasmodiale chez 3 espèces d'*Anopheles*.

I.7. LES INTERACTIONS *ANOPHELES-PLASMIDIUM*

I.7.1. La capacité vectorielle : importance de la longévité et de la fécondité dans la transmission

La transmission de l'agent infectieux n'est possible que si des conditions écologiques favorables s'ajoutent à cette compétence. Le vecteur doit être abondant, il doit avoir une longévité suffisante, et entretenir des contacts étroits avec les hôtes réservoirs et les vertébrés réceptifs. La capacité vectorielle exprime donc le degré de coadaptation du couple vecteur-agent infectieux dans un écosystème donné.

La capacité vectorielle peut être définie par une formule mathématique, dont tous les paramètres sont théoriquement mesurables. La capacité vectorielle d'une population de vecteurs est définie alors comme le nombre moyen de piqûres que les vecteurs, ayant piqué un individu infectant le jour t , infligent à la population d'hôtes pendant le reste de leur vie, une fois achevé le cycle d'incubation extrinsèque (GARRETT-JONES and SHIDRAWI 1969). Autrement dit, elle représente le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'un individu peut générer, par l'intermédiaire de la population vectrice, par unité de temps, et constitue donc un indicateur du risque de transmission de la maladie. Le calcul de la capacité vectorielle, notée C , peut être explicité en se basant sur la description du cycle de transmission hôte/vecteur :

- ✓ À partir d'un hôte infectant, il s'agit d'estimer le nombre de vecteurs qui vont piquer cet hôte par unité de temps (généralement l'unité de temps est le jour). Ce nombre est le produit de la densité relative des vecteurs (nombre de vecteurs par hôte, noté m) par la proportion des vecteurs piquant ces hôtes par unité de temps. En effet, les vecteurs ne se nourrissent pas tous les jours, et pas uniquement sur la population d'hôtes considérée. Il faut noter que la proportion des vecteurs piquant par unité de temps est égale au nombre de piqûres qu'un vecteur fait sur la population d'hôtes par unité de temps. Ce taux (noté a) dépend ainsi des préférences trophiques de l'espèce vectrice et de la durée entre deux repas sanguins (liée à la durée du cycle gonotrophique).
- ✓ Parmi ces vecteurs qui se sont potentiellement infectés par piqûre, il s'agit d'estimer maintenant la proportion d'entre eux qui passeront du stade infecté au stade infectant, c'est-à-dire ceux qui survivront à la durée d'incubation extrinsèque (n). En notant p le taux de survie journalier, cette proportion de survivants peut être estimée par p^n .

✓Enfin, le nombre de piqûres que ces vecteurs infectants peuvent infliger à la population d'hôtes durant le reste de leur vie peut être approché par le produit du nombre de piqûres qu'un vecteur fait sur la population d'hôtes par unité de temps et de son espérance de vie. Cette espérance de vie (en jours) peut être estimée par une fonction croissante du taux de survie journalier p : $1/-\ln(p)$ (MACDONALD 1956).

Ainsi, la capacité vectorielle peut s'exprimer finalement sous la forme classique (GARRETT-JONES and SHIDRAWI 1969):

$$C = \frac{m \cdot a^2 \cdot p^n}{-\ln p}$$

Avec :

- m : le nombre de vecteurs par hôte ;
- a : le taux de vecteurs piquant par unité de temps ;
- p : le taux de survie journalier et,
- n : la durée du développement sporogonique.

Les variables m , a , p et n peuvent être estimées à partir de paramètres mesurés par des relevés de terrain et des tests en laboratoire.

L'intérêt d'un tel indicateur est de pouvoir évaluer l'impact de différents facteurs jouant un rôle dans la transmission de la maladie : les paramètres cités ci-dessus mais également les facteurs environnementaux et les actions de lutte susceptibles de les modifier. Par exemple, la capacité vectorielle a été calculée pour quantifier l'impact de pulvérisation d'insecticide sur la transmission pour différentes espèces vectrices (GARRETT-JONES et SHIDRAWI 1969) ou pour identifier les périodes à risque en fonction de conditions météorologiques (PRAKASH *et al.* 2001). La capacité vectorielle représente aussi le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'un individu peut générer, par l'intermédiaire de la population vectrice, par unité de temps. Elle constitue donc un des indicateurs du potentiel de transmission de la maladie (même en absence de tout agent de la maladie).

✓ Importance de la longévité des vecteurs dans la transmission

Le cycle de transmission est classiquement représenté comme une boucle, avec une piqûre où l'anophèle s'infecte puis une piqûre où l'anophèle inocule le *Plasmodium*. Ce cycle biologique ou « parasitologique » a une dimension temporelle qui doit être considérée à 2 niveaux : le temps que met le parasite pour évoluer chez le vecteur -développement sporogonique) alors que l'anophèle poursuit son rythme de vie et accomplit normalement ses cycles gonotrophiques (piqûre-ponte) ; et la durée de vie de l'anophèle avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires pendant laquelle il piquera des sujets humains en leur inoculant le(s) *Plasmodium*.

Dans les conditions naturelles, pour qu'il y ait transmission du *Plasmodium*, c'est-à-dire inoculation des sporozoïtes, il faut que la longévité des femelles d'anophèles soit supérieure à la durée du développement sporogonique de l'espèce plasmodiale considérée. Au-delà de cet âge épidémiologiquement dangereux, les femelles d'anophèles qui piquent alors régulièrement les sujets humains sont infectants. Le développement sporogonique de *Plasmodium* est relativement long, 8 à 21 jours, par contre seulement 10% des femelles d'anophèles vivent au-delà de 2 semaines dans la nature (CHARLWOOD 1996). Les femelles ne survivant pas au-delà de cet âge critique épidémiologiquement dangereux ne pourront pas transmettre les *Plasmodium*, même si elles sont infectées, puisque, tant que le parasite n'a pas atteint les glandes salivaires, il ne peut pas être transmis à l'homme. Les femelles survivant au-delà de cet âge critique pourront, éventuellement, transmettre les *Plasmodium* et ce jusqu'à la fin de leur vie, bien que le nombre de sporozoïtes diminue avec l'âge. Le nombre d'inoculations sera fonction du temps de survie appelé « espérance de vie infectante » et de la fréquence des contacts hôte/vecteur, c'est-à-dire de la durée du cycle gonotrophique et de l'anthropophilie des anophèles considérés. On peut alors décrire la transmission de façon épidémiologique en intégrant cette notion de longévité des femelles. Il en résulte qu'une grande longévité des vecteurs potentiels est cruciale pour le système vectoriel. La longévité des femelles influence donc sur le cycle gonotrophique du vecteur et la transmission directe du pathogène. Elle est donc la cible idéale des stratégies de lutte antivectorielle car une baisse, même minime, de la longévité du vecteur a un grand impact sensible dans la dynamique de transmission du paludisme (SMITH et MCKENZIE 2004).

✓ Importance de la fécondité des vecteurs dans la transmission

L'abondance des vecteurs est importante pour la transmission du paludisme. La fécondité des vecteurs est en relation proportionnelle avec la densité vectorielle intégrée dans les modèles

mathématiques de la transmission vectorielle (GARRETT-JONES et SHIDRAWI 1969; MACDONALD 1956). Elle est généralement représentée par « *m* » et est la cible de la lutte contre les anophèles au stade larvaire.

Les deux paramètres de traits d'histoire de vie, à savoir la longévité et la fécondité, sont essentiels dans la mesure de la «fitness» ou « valeur sélective » définie comme étant la capacité d'un être vivant à transmettre les gènes à la génération suivante.

I.7.2. Compétence vectorielle : Gènes et déterminants environnementaux impliqués dans la susceptibilité/résistance du moustique à l'infection

La compétence vectorielle est la capacité pour un vecteur de puiser un pathogène chez un hôte vertébré, à assurer la maturation de ce pathogène jusqu'au stade infectieux et de pouvoir l'injecter à un autre vertébré. La compétence vectorielle mesure ainsi le niveau de coadaptation pathogène/vecteur invertébré.

Toutes les espèces d'anophèle ne sont pas en effet efficaces en tant que vecteur du paludisme. La susceptibilité/résistance relative n'est pas limitée au niveau de l'espèce, puisqu'il existe de considérables différences entre différentes souches d'une espèce donnée. Il existe plus de 458 espèces d'anophèles. Parmi ces espèces, seules 70 à 80 sont des vecteurs de paludisme humain. Ceci signifie donc qu'aux niveaux cellulaires et moléculaires, l'interaction entre le vecteur et son hôte nécessite un ajustement précis.

En 1986, par sélection sur une lignée d'*An. gambiae* sensible, COLLINS *et al.* (1986) ont généré une lignée, qui a la particularité d'être complètement réfractaire au parasite *P. cynomolgi* et à de nombreux autres plasmodiums dont *P. berghei*. Cette lignée a la capacité de supprimer les ookinètes avant qu'ils ne se transforment en oocystes. Cette lignée est aussi capable de limiter la progression des ookinètes de certains clones de *P. falciparum*, sans toutefois les éliminer complètement. Ceci est une première démonstration génétique de l'existence d'une immunité capable de supprimer *Plasmodium* lorsqu'il est au stade ookinète. Les anophèles ont donc la capacité de se défendre contre l'infection par le *Plasmodium* et ce mécanisme implique des protéines existant chez l'anophèle. Le système immunitaire d'*An. gambiae* a commencé à être étudié au niveau moléculaire au début des années 1990 et à largement utilisé les connaissances acquises chez la drosophile. La problématique était centrée sur l'identification des voies de

signalisation, l'identification et les mécanismes d'action des molécules effectrices et l'influence des bactéries de la flore intestinale dans la réponse immunitaire.

✓ Les voies de signalisation immune et l'infection à *Plasmodium*

Les voies de signalisation immune, réponse directe des insectes à divers pathogènes, ont été identifiées comme régulant l'immunité antiplasmodiale du moustique par production de molécules effectrices (figure 3). Les 3 voies de signalisation majeure, *Toll*, *IMD* et *Jak/Stat*, connues chez la drosophile et les mammifères ont été identifiées par orthologie chez *An. gambiae* (CIRIMOTICH *et al.* 2010).

La voie *Toll* : La voie *Toll*, qui est classiquement activée sous une infection à bactérie gram positive, et fongique. Elle est impliquée dans la défense des anophèles contre *P. berghei* (FROLET *et al.* 2006). La reconnaissance des molécules associées aux pathogènes (PAMPs) par les récepteurs de reconnaissance des peptides (PPRs) est bien documentée à travers cette voie mais le mécanisme reste inconnu. Dans cette voie, le facteur de transcription des peptides antimicrobiennes est le *Rel1*.

La voie *IMD* (ImmuneDeficiency): c'est la voie activée par les bactéries gram négatif grâce à l'activation du récepteur PGRPLC. Cette voie de signalisation serait impliquée dans la limitation à l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae*, *An. stephensi* and *An. albimanus* (GARVER *et al.* 2012).

La voie *Jak/Stat* : une inactivation de cette voie par inhibition du facteur de transcription Stat A augmente la charge oocystique de *P. berghei* chez *An. gambiae* (GUPTA *et al.* 2009).

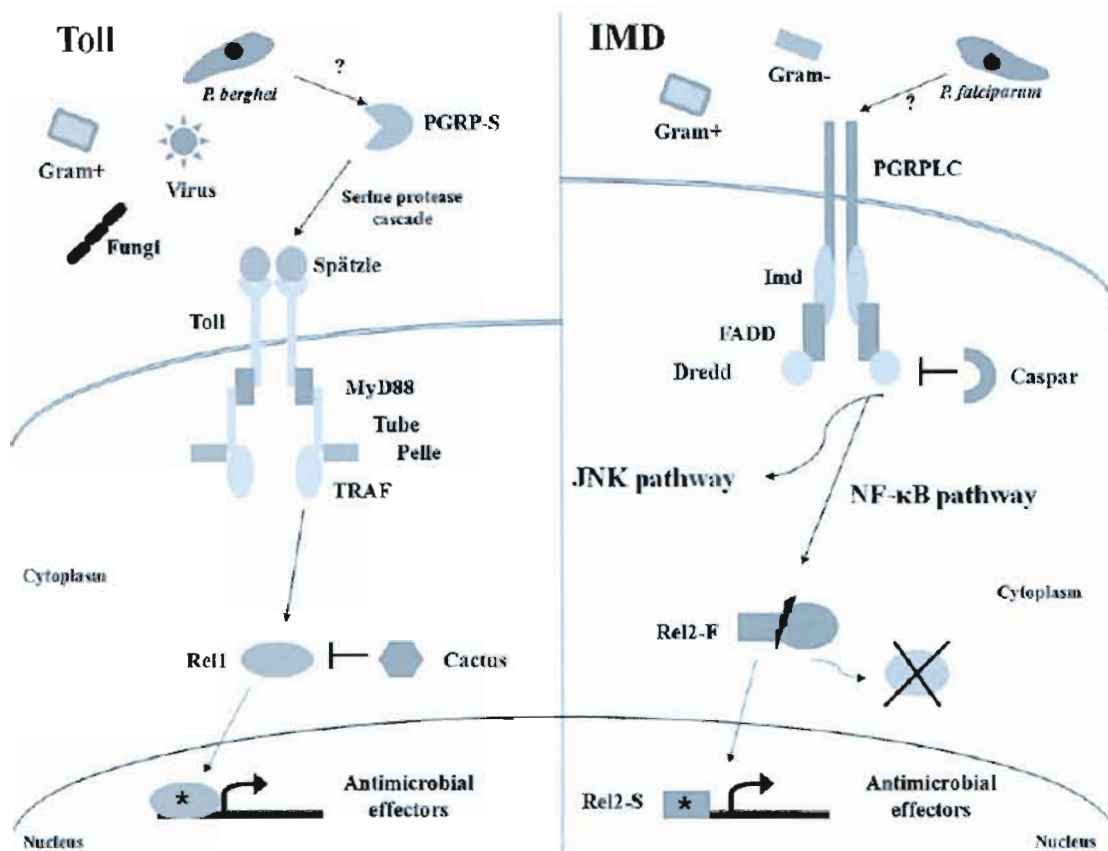


Figure 3 : Mécanismes d'activation des voies de signalisation immunitaire Toll et IMD chez *Anopheles* suite à l'infection à *Plasmodium* (CIRIMOTICH *et al.* 2010)

✓ Les molécules effectrices anti-*Plasmodium*

Le résultat ultime de l'activation des voies de signalisation immunitaire est la transcription des gènes en molécules effectrices anti-*Plasmodium*. Les mécanismes immunitaires impliqués incluent la phagocytose, la production de peptides antimicrobiens, tels que la cécropine, les défensines et l'attacine. Et la stimulation de cascades de protéolyse qui aboutissent à une coagulation de l'hémolymphe et une encapsulation mélanotique du parasite donnant des "spores noires" qui sont des ookinètes mélanisés incapables de se développer en oocystes.

Les techniques de Microarray et d'ARN interférence ont montré que les molécules effectrices dérivées de diverses familles de gènes jouent un rôle important dans la mort des ookinètes et/ou des oocystes de *Plasmodium*.

✓ **Leucine rich-repeat (LRR) domain-containing proteins** : Dans cette famille de gènes, *Leucinrichrepeat immune protein 1* (LRIM1) et APL1C sont impliqués dans la mélanisation

de *P. berghei* chez *An. gambiae* (DONG *et al.* 2006). Aucun gène orthologue de LRIM1 n'a été identifié chez les autres organismes, suggérant un rôle immunitaire spécifique au moustique. APL1C et LRIM1 semblent être régulés par la voie de signalisation Toll (RIEHLE *et al.* 2007).

✓ **Fibrinogen-related proteins (FREPs)** : c'est une famille de gènes, identifiés chez le moustique et la mouche, avec une expansion significative dans le génome d'*An. gambiae* (58 gènes). Les études de transcriptomique et d'analyses fonctionnelles ont montré que cette famille de gènes protège le moustique contre l'infection à *P. falciparum* par un mécanisme similaire à LRIM1/APL1C (CHRISTOPHIDES *et al.* 2004; DONG *et al.* 2006).

✓ **C-typelectins (CTLs)** : dans le génome d'*An. gambiae*, le domaine CTLs contient 33 gènes. Les gènes CTL4 et CTLMA2 ont été identifiés comme agonistes de *P. berghei* (OSTA *et al.* 2004b).

La majorité de ces études de susceptibilité et de réfraction ont été menées dans le système artificiel *An. gambiae*/*P. berghei*. La pertinence de leur applicabilité aux systèmes naturels a été remise en question. En effet, Cohuet *et al.*, (2006) ont testé l'effet de l'inactivation des gènes identifiés dans le couple de laboratoire *An. gambiae* / *P. berghei* (CTL4, CTMLA2 et LRMI1) sur le développement de *P. falciparum* chez *An. gambiae* en conditions naturelles, et analysé la réponse transcriptionnelle de ces gènes à l'infection par *P. falciparum*. Le rôle des gènes LRIM1, CTL4, CTLMA2 ne serait pas important dans la résistance naturelle d'*An. Gambiae* à *P. falciparum*. Les auteurs suggèrent alors un effet de coévolution adaptative qui intervient dans le système naturel *An. gambiae*/*P. falciparum* (COHUET *et al.* 2006).

L'expression des différents mécanismes moléculaires et génétiques contrôlant la capacité des moustiques à transmettre le parasite est modelée par des facteurs environnementaux qui composent les facteurs extrinsèques (LAMBRECHTS *et al.* 2006) intégrés dans la capacité vectorielle. En effet, Dans une revue faite par Lefevre *et al.*, (2013) (figure 4), dans leur habitat naturel, les moustiques sont constamment soumis à différents stress biotiques et abiotiques, incluant la limitation de ressources, les variations de température, l'utilisation des pesticides, qui vont affecter leur reproduction et leur survie. Récemment d'autres facteurs inhérents tels que la composition de la flore intestinale du moustique, son âge et sa taille pourraient moduler la compétence vectorielle. (LEFEVRE *et al.* 2013)

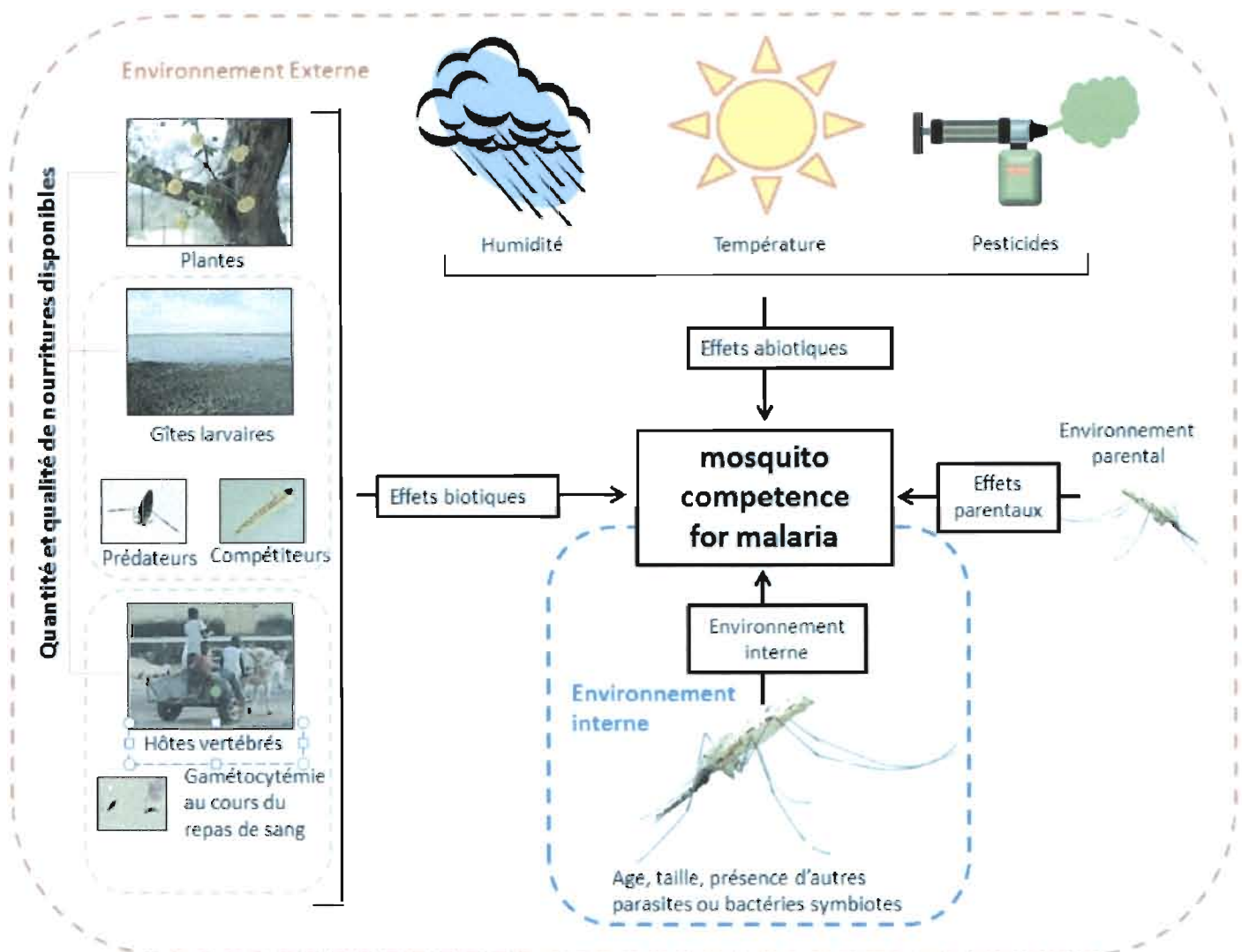


Figure 4 : Dynamique des facteurs environnementaux affectant la compétence vectorielle (LEFEVRE *et al.* 2013).

1.7.3. Notion générale sur le parasitisme et de son impact sur les traits d'histoire de vie de l'hôte

Le **parasitisme** (du grec *para*, « à côté » et *sitos*, « blé, pain ») est une relation biologique dont un des protagonistes (le parasite) tire profit (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) aux dépens d'un hôte. La plupart des parasites semblent jouer un rôle important dans la sélection naturelle et l'évolution par manipulation parasitaire ou par la virulence. On parle même de

coévolution à leur égard, car la sélection naturelle favorise l'apparition constante de moyens de défense chez les hôtes. (Source : Wikipédia).

Enfin, face à des parasites virulents, les hôtes doivent se défendre. Plusieurs lignes de défense sont possibles. La première consiste à éviter de rencontrer le parasite. Le comportement hématophage des anophèles, obligatoire pour la production des œufs, les obligent à se nourrir sur les mammifères, donc favorise le contact avec le *Plasmodium*. Elles doivent donc se préparer à lutter contre l'infection. Les cascades de défenses mises en place par les hôtes pour faire face aux parasites telles que l'évitement comportemental du parasite, les réactions immunologiques contre les parasites à l'intérieur de l'hôte, ont pour conséquence l'ajustement des traits d'histoire de vie de l'hôte, en général les traits liés à la survie, à la reproduction. (MICHALAKIS 2007).

La valeur sélective par modifications des traits d'histoire ou « fitness » découlant de la réponse immunitaire chez les hôtes infectés est plus onéreuse car nécessite une dépense importante en énergie (LONG et NANTHAKUMAR 2004; RIVERO et FERGUSON 2003). En effet, chez les anophèles, plusieurs études ont montré que l'activation du système immunitaire due aux infections bactériennes et plasmodiales s'accompagne d'un coût sur la fécondité (AHMED et HURD 2006; AHMED *et al.* 2001; HOGG et HURD 1995a; JAHAN et HURD 1997).

Dans la théorie d'évolution de la virulence due au parasitisme, un effet du parasitisme sur la survie de l'hôte a également été proposé. Par contre dans les modèles non naturels, *An. stephensi-Plasmodium berghei*, la mortalité induite par le *Plasmodium* est modulée par les facteurs génétiques et environnementaux (la température, le taux d'humidité, l'alimentation du vecteur, la flore bactérienne intestinale) (FERGUSON et READ 2002a; KOELLA et SORENSE 2002; LAMBRECHTS *et al.* 2006). Par contre, aucune étude n'a rapporté l'effet du stress environnemental sur la valeur sélective « fitness » d'*Anopheles gambiae* au laboratoire ou sur le terrain (TRIPET *et al.* 2008). Une faible intensité d'infection en oocystes a été observée dans les associations sympatriques *An. gambiae-P. falciparum* contrairement aux associations non sympatriques (HARRIS *et al.* 2012). Alors qu'une corrélation positive entre la mortalité et la charge en oocyste ou la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires a été observée dans les populations naturelles d'*An. gambiae* (ANDERSON *et al.* 2000a; LYIMO et KOELLA 1992). Tous ces exemples montrent que le parasitisme exerce une pression de sélection sur leurs hôtes. Mais

intuitivement les parasites n'ont pas intérêt à tuer leur vecteur, sous peine de diminuer leur transmission (KOELLA *et al.* 1998). Donc la sélection due au parasitisme favorisera les individus hôtes qui adoptent des stratégies d'allocation de ressources entre les différentes fonctions qui maximisent la valeur sélective ou «fitness». Les organismes hôtes doivent donc faire un compromis (« trade-off ») lorsqu'ils allouent des ressources aux différentes fonctions vitales : les ressources allouées à la survie ne seront plus disponibles pour la reproduction (GANDON *et al.* 2002a). En effet sur le terrain, dans le modèle ayant une histoire évolutive commune, *An. gambiae-Plasmodium falciparum*, de faible infestation du vecteur (LYIMO et KOELLA 1992; TAYLOR 1999) corrélées à une forte intensité de transmission observée suggèrent une coévolution entre le parasite et son vecteur naturel (COHUET *et al.* 2006) sélectionnant les vecteurs et les parasites résistants (KABIRU *et al.* 1997; KOELLA 1999). La coadaptation au bénéfice des deux parties favorise en effet l'établissement d'un compromis sur les forces évolutives sur la base d'une réponse immune limitée mais efficace du moustique afin de limiter la charge parasitaire et d'allouer le reste du budget énergétique à sa survie et sa longévité (SCHWARTZ et KOELLA 2001).

Ce sont ces questions d'écologie de la coévolution entre le parasite, *P. falciparum* et son vecteur naturel, *An. gambiae*, que nous avons explorées dans le **chapitre IV** de notre étude.

CHAPITRE II :METHODOLOGIE GENERALE

II.1. ORIGINE ET ELEVAGE DES MOUSTIQUES

Des colonies d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* ont été mises en place à l'insectarium de l'IRSS/DRO respectivement en 2008 et 2011 pour les 2 dernières espèces. Les adultes ont été capturées sur le terrain à la Vallée du Kou (30 km au nord de Bobo-Dioulasso, 11°23'14''N; 4°24'42''W). Les femelles gravides et semi-gravides ont été mises individuellement dans des cages à moustiques. Un pondoir constitué de boîte de pétri avec du coton imbibé d'eau sur lequel du papier buvard est déposé afin que les femelles gravides puissent pondre les oeufs. Après la ponte, la femelle morte est identifiée par PCR à l'aide du protocole de SCOTT *et al.* (1993) et les formes moléculaires par le protocole de FAVIA *et al.* (2001). Les œufs de la même espèce de moustiques ont été regroupés et mis en eau de source dans une bassine en plastique de 2,7 litres de couleur différente en fonction des souches (figure 5). Les larves obtenues ont été nourries *ad libitum*, à raison de 0,3mg/larve de Tetramin® Babyfish-food. Les nymphes ont été triées chaque jour et mises en cage collective métallique cubique recouverte de toiles moustiquaires, en fonction de la souche (30*30*30 cm) pour émergence (figure 5). Une vérification par PCR de la pureté de la colonie est effectuée régulièrement. Tout l'élevage a été fait dans les conditions standards de l'insectarium à savoir une température égale à 28 +/-2°C, une humidité relative maintenue à 80 +/- 5% en moyenne et une alternance jour/nuit de 12h. Les adultes ont été nourris *ad libitum* avec du glucose 5%.



Figure 5 : Aperçu de l'élevage des souches d'anophèles à l'insectarium

II.2. PROSPECTIONS PARASITOLOGIQUES : RECHERCHE DES PORTEURS DE GAMETOCYTES

Pour effectuer les infections expérimentales, des prospections parasitologiques ont été menées à Dandé et Soumousso, 2 villages environnants de Bobo-Dioulasso. Des gouttes épaisses ont été réalisées chez des volontaires âgés de 5 à 11 ans après consentement éclairé des parents.

Les critères d'inclusion ont été: (i) être volontaire avec le consentement éclairé écrit des parents, ou tuteur légal ; (ii): être âgé de 5-11 ans; (iii): le sujet devait être asymptomatique, surtout non fébrile (température corporelle < 37,5°C et non anémié (Taux d'hémoglobine > 10 g/dl) ; (iv): présentant une mono infection à *P. falciparum* supérieure à 100 gamétocytes/ μ l de sang à la microscopie au moment de l'inclusion, (v): déclarant aucune prise d'antipaludiques ou de décoction à base de plantes dans les 10 jours précédents la prospection parasitologique. Le protocole global a eu l'approbation du comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ (CE 003-2009/CE-CM).

Les participants ont été convoqués soit au dispensaire, ou à l'école primaire du village, la veille de la prospection par un agent de santé communautaire. Chaque enfant recruté était enregistré avec un numéro, son nom et prénom, le nom et prénom du père, le village, la date de collecte et la classe d'étude s'il est scolarisé. Une centaine de gouttes épaisses sont réalisées par sortie. Les gouttes épaisses ont été réalisées sur le terrain au bout du doigt avec du matériel aseptique et transportées au laboratoire de microscopie de l'IRSS/DRO, Bobo-Dioulasso. Les lames de gouttes épaisses, après séchage, ont été colorées au Giemsa 10% pendant 10 minutes. Les trophozoïtes et les gamétocytes ont été cherchés à la microscopie optique et la densité parasitaire déterminées sur la base de 1000 leucocytes comptés si l'on observe au moins un gamétocyte. La densité des formes asexuées est déterminée sur la base de 200 leucocytes comptés. Les enfants présentant des symptômes et/ou ayant une parasitémie supérieure à 1 000 parasites / μ l ont été référés au dispensaire et traités selon le protocole national, à la charge du projet.

Les patients correspondant aux critères d'inclusion dans l'étude avec les plus hautes charges de gamétocytes de *P. falciparum* ont été emmenés au laboratoire pour le prélèvement sanguin le lendemain de la réalisation des examens. Une goutte épaisse de confirmation est réalisée. Après identification et prise des paramètres anthropométriques (âge, sexe, température, poids

corporel) sur une fiche de collecte, un prélèvement veineux au pli du coude est réalisé avant l'administration du traitement. Le sang prélevé, soit 10 ml de sang veineux, a été réparti dans 2 tubes stériles héparinés. Ce sang était immédiatement utilisé pour l'expérimentation.

II.3. TECHNIQUE D'INFECTION EXPERIMENTALE

Les infections expérimentales ont été réalisées par le système de gorgement direct sur membrane (Parafilm®) (Direct Membrane Feeding Assay : DMFA) grâce à un dispositif d'infection expérimentale implémenté à l'Institut de recherche en Sciences de la Santé (IRSS) de Bobo-Dioulasso. Deux tubes héparinés de 5 ml de sang du porteur de gamétocytes sont centrifugés immédiatement après prélèvement à 1500 rpm pendant 3 min à 37°C. Le sérum du porteur a été remplacé par une quantité équivalente de sérum AB d'un sujet non immun du paludisme dans le but d'éviter une potentielle interférence de l'immunité antipalustre du porteur.

Le dispositif expérimental été mis au point par Rutledge *et al.* (1964), et adapté pour nos gorgements expérimentaux de moustique (figure 6). Ce dispositif a été constitué de cellules de gorgement en verre fixées à l'aide de pinces sur une tige horizontale. Cette tige dont les extrémités ont été maintenues grâce à des noix de fixation sur des tiges portoirs (verticaux) permet d'ajuster la hauteur des cellules par rapport aux pots de moustiques. Un dispositif constitué d'un thermoplongeur Polystat® dans un bain marie et de tubes en caoutchouc a assuré la circulation continue de l'eau entre les cellules. L'eau préalablement chauffée et thermostatée à 37°C à l'aide du thermoplongeur a permis de maintenir le sang à la température habituelle du corps humain. Le thermoplongeur a été mis en marche 15 à 20 mn avant le début de l'infection. Les membranes artificielles (Parafilm®) ont été placées sous les cellules de gorgement (Diamètre= 2,5 cm). Entre deux gorgements, les cellules ont été lavées soigneusement à l'eau de robinet.

Pour le gorgement, avant l'infection, les moustiques sont affamés 24 heures dans des cages communes avec les mâles. Le jour de l'infection, les femelles sont triées et mises dans des gobelets puis conservées à l'obscurité 2 heures avant le début du gorgement. Les cellules de gorgement ont été remplies à chaque fois avec 500 µl de sang. Les gobelets contenant 50 à 60 femelles adultes d'anophèles, d'âge variable en fonction du but de l'expérience ont été déposés en dessous des cellules et maintenues dans l'obscurité avec un taux d'hygrométrie

élevée pendant au moins 30 minutes pour le gorgement. Après, les femelles gorgées ont été triées et ont subi différents traitements suivant le protocole expérimental.

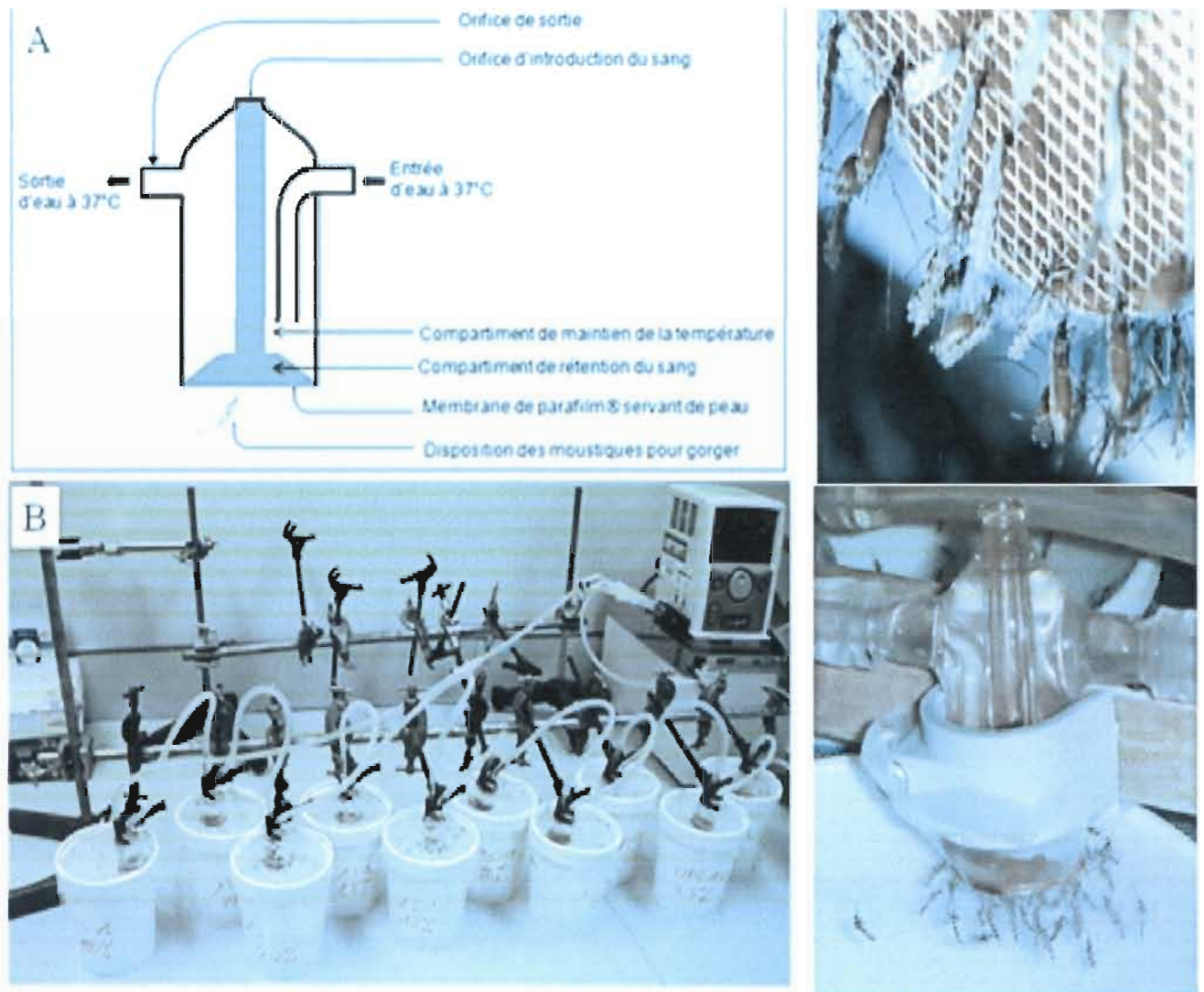


Figure 6 :Aperçu du dispositif d'infection expérimentale (A : cellule de gorgement, B : dispositif de fixation).

II.4. MESURE DU NIVEAU D'INFECTION DES MOUSTIQUES

Recherche des ookinètes : Pour les femelles ayant survécu moins de 3 jours après l'infection, les formes rondes des parasites et les ookinètes ont été recherchés dans l'estomac par technique d'immunofluorescence directe (GOUAGNA *et al.* 1999). L'estomac des moustiques est disséqué délicatement sans le déchiré dans une goutte de PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) sur une lame porte-objet. Ensuite, il est écrasé dans un tube Eppendorf contenant 50 µl de conjugué (solution d'Evans blue et d'anticorps anti-25 KD – FITC). Le mélange est homogénéisé et incubé à l'obscurité pendant 30 min. Après incubation, la solution est complétée avec 950 µl de PBS 1X et centrifugé pendant 2 min à 3000 tours/min pour lavage. Le surnageant est retiré et le culot est observé en microscopie à fluorescence entre lame et lamelles (figure 7).



Figure 7 : Ookinète de *P. falciparum* au microscope à fluorescence après broyage de l'estomac du moustique

Recherche des oocystes : Pour celles ayant survécu plus de 3 jours après l'infection, les estomacs ont été disséqués placés entre lame et lamelle dans une goutte de mercurochrome à 0.4% et observés au microscope optique (grossissement X20 à X60) pour la recherche et le comptage des oocystes (figure 8).



Figure 8 : Oocystes de *P. falciparum* coloré au mercurochrome sur un estomac d'*An. gambiae*.

Détection des sporozoïtes : Enfin, pour celles ayant survécu plus de 7 jours après l'infection, en plus de la recherche des oocystes, la tête-thorax a été conservée dans un tube 1,5 ml dans du silicagel au congélateur pour la recherche des sporozoïtes par PCR (figure 9).

Les sporozoïtes ont été détectés par PCR spécifique de *P. falciparum* sur les têtes-thorax des femelles mortes à partir de J8 après l'infection. L'ADN a été extrait selon le protocole CTAB (MORLAIS *et al.* 2004). Les amorces utilisées étaient F : GGAATGTTATTGCTAACAC et R : AATGAAGAGCTGTGTATC. L'amplification a été effectuée dans un mix 15µl contenant : 1.5µl de tampon de Taq 1X, 0,5mM de MgCl₂, 0,2mM de chaque dNTP, 5pmol de chaque amorce, 0,5 UI de Taq polymérase et 1µl (sur 50) de l'extrait d'ADN non dilué (environ 5ng d'ADN de moustique). Les contrôles positifs étaient constitués d'ADN de *P. falciparum* extrait à partir du sang des patients infectés. Chaque extrait a également été testé pour la qualité de l'extraction de l'ADN en réalisant une PCR témoin sur l'ADN du moustique (FAVIA *et al.* 2001).

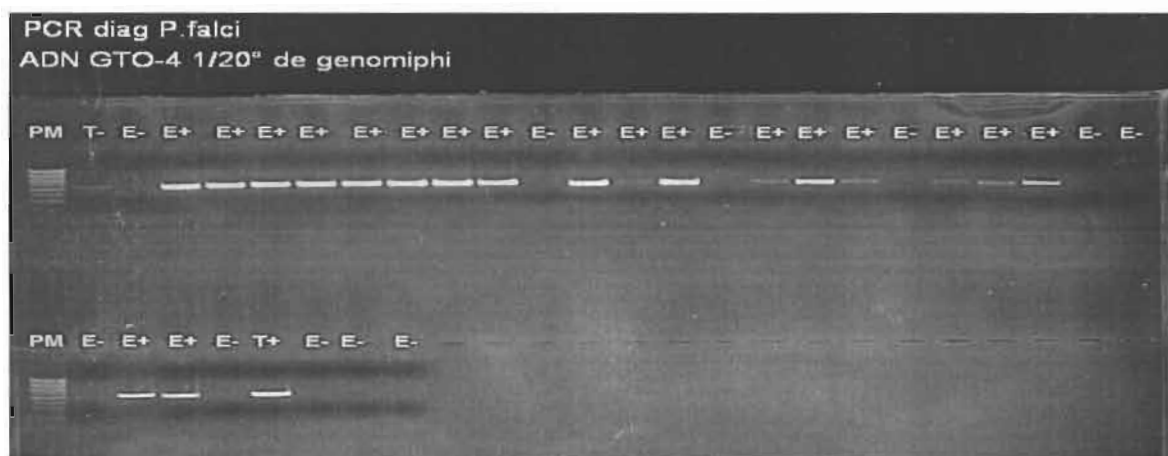


Figure 9 :Gel de migration après PCR diagnostique *P. falciparum*

(PM: marqueur de Poids Moléculaire ; T- : Témoin négatif ; T+ : Témoin positif à 501 pb ; E+ : Échantillon positif ; E- : Échantillon négatif).

II.5.MESURE DE LA QUANTITE DE REPAS SANGUIN INGEREE PAR LES MOUSTIQUES

La quantité de sang ingérée par la femelle de moustique influence à la fois sur la fécondité et la probabilité qu'à la femelle de s'infecter. L'hématine, produit de dégradation de l'hémoglobine, est corréléable à la quantité de sang ingérée par la femelle (Briegel H, 1980). Par conséquent, l'hématine excrétée par le moustique après son repas de sang a été dosée par spectrophotométrie pour microplaque (Multiskan, Thermo Scientific®). L'hématine contenue dans les tubes individuels ou tubes à drosophile après la mort du moustique est dissoute dans 1 ml d'une solution de carbonate de lithium (LiCO_3) 1% (figure 10). L'absorbance de cette solution a été mesurée à 387 nm. La quantité en masse d'hématine a été calculée par rapport à une courbe standard réalisée avec de l'hématine commerciale de porc (Sigma-Aldrich®) et a indiqué une taille relative du repas de sang (RIVERO et FERGUSON 2003). Pour la réalisation de la droite d'étalonnage, une solution mère d'hématine de concentration connue, 1 mg/ml, a été préparée dans du LiCO_3 1%. Des volumes de 100 μl de solutions filles, diluées respectivement, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 0 ont été préparées à partir de cette solution mère et leur densité optique (DO) déterminée. La droite d'étalonnage dont l'équation, $Y = aX + b$ ($Y = \text{DO}$ et $X = \text{quantité d'hématine en } \mu\text{g}$), est ainsi générée avec le logiciel Microsoft EXCEL®.

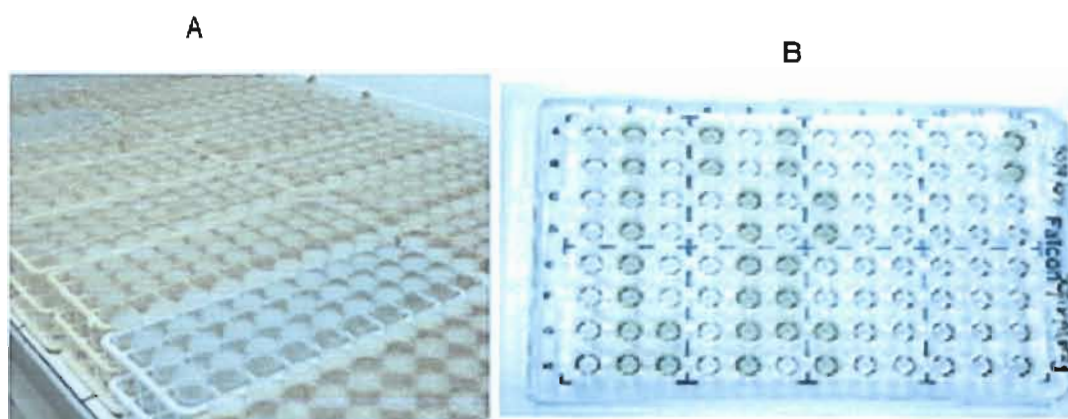


Figure 10 : Tubes à drosophile (A) et plaque ELISA (B) avec solution de hématine diluée dans du LiCO_3 .

II.6. MESURE DE LA TAILLE DE L'AILE DU MOUSTIQUE

La taille de l'aile du moustique est corrélable à la taille du moustique (KELLY et EDMAN 1992). Concernant les traits de fitness, la taille du moustique peut influencer la survie, le temps de développement et l'habilité à prendre du repas sanguin. Il est corrélé positivement à la fécondité (KELLY et EDMAN 1992). Dès que le moustique était mort, les ailes ont été disséquées. Ces ailes ont été montées entre lame et lamelle et la lamelle collée avec du sparadrap. Les ailes ont été photographiées à la loupe binoculaire avec système de caméra (Leica®) et mesurées grâce au Logiciel ImageJ® 1.41.0 Wayne Rasband, NIH (Schneider CA et al, 2012). La mesure a été faite de la base distale de l'aile jusqu'à la fin de l'allula (CHARLWOOD 1996) (figure 11). Une échelle de mesure a été définie grâce à la mesure d'une règle. Si les deux ailes de la femelle étaient intactes, une aile a été choisie aléatoirement pour être mesurée. Quand une aile a été endommagée, l'aile intacte était mesurée.

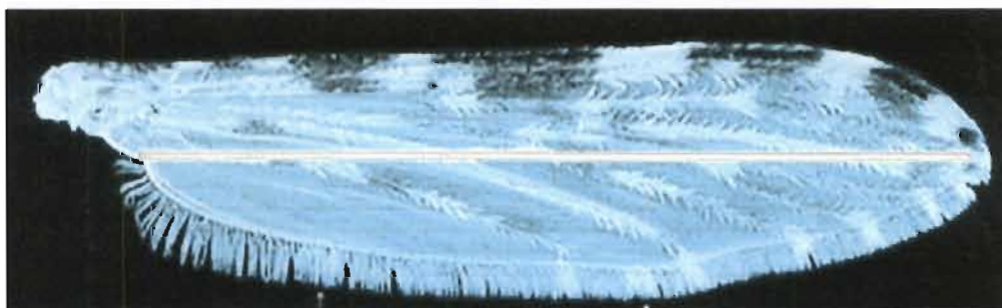


Figure 11 : Mesure de la taille de l'aile à la base distale de l'aile sans inclure les soies

**CHAPITRE III :COMPETENCE VECTORIELLE
DANS LE COMPLEXE AN.
GAMBIAE**

III.1.INTRODUCTION

Toutes les espèces du complexe d'*Anopheles gambiae* sont potentiellement vectrices (donc génétiquement compétentes) de plasmodies humaines. Cependant, leur rôle vectoriel dans la transmission des *Plasmodium* est variable en fonction de leur capacité vectorielle supportée par des paramètres génétiques du vecteur, du parasite modulé par des déterminants environnementaux (ALAVI *et al.* 2003; LAMBRECHTS *et al.* 2005; LEFEVRE *et al.* 2013; SINDEN et BILLINGSLEY 2001). Dans ce complexe, *An. gambiae s.s* et *An. arabiensis* se révèlent les meilleurs vecteurs de *Plasmodium* sur le continent africain en raison de leur large distribution géographique, de leur forte anthropophilie, de leur longévité importante et probablement des mécanismes génétiques de susceptibilité à l'infection (CARNEVALE *et al.* 2009).

Les différenciations génétiques entre les espèces majeures du complexe *An. gambiae* ont été très étudiées. En effet, les études génétiques ont été initiées par le fait qu'il existe une stérilité totale ou partielle chez les hybrides. Au début des années 1980, les études de cytogénétique (COLUZZI 1993) et les progrès de la biologie moléculaire ont alors permis le développement de sondes d'ADN spécifiques (COLLINS *et al.* 1987; CRAMPTON et HILL 1993) qui ont débouché sur la mise au point d'une PCR diagnostique d'*An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*. *Anopheles arabiensis* se différencie d'*An. gambiae s.s* sur le plan caryotype par la présence d'inversion chromosomique Xbcd et 2La (COLUZZI *et al.* 1979). *Anopheles gambiae s.s.*, quant à elle, est sous pression de spéciation, donnant 2 espèces naissantes, *Anopheles coluzzii* (ex- forme moléculaire M) et *An. gambiae* (ex- forme moléculaire S).

Sur le plan phénotypique, il n'existe pas de différences morphologiques identifiables entre ces 3 espèces majeures du complexe *An. gambiae* au stade adulte (COLUZZI *et al.* 2002; WHITE 1974). Des études récentes montrent quelques différences sur le plan d'adaptation écologique. *Anopheles gambiae s.s.* vit en sympatrie avec *An. arabiensis* dans la quasi-totalité des savanes afrotropicales. Cependant on note une prédominance d'*An. gambiae s.s.* dans les zones de forêt et de savane humide tandis que *An. arabiensis* se retrouve majoritairement dans les zones sahéliennes et désertiques où il montre des préférences zoophiles et exophiles (DIA *et al.* 2003).

Quoique vivant en sympatrie au Burkina Faso, *An. coluzzii* est retrouvée principalement dans la rizière et *An. arabiensis* dans la savane environnante. Les niches écologiques sont réparties

selon un gradient allant d'habitats de type « permanents-anthropiques » pour *An. coluzzii*, au niveau de la zone rizicole, vers des milieux « temporaires naturels » en zone de savane pour *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Ainsi, sur le plan de l'adaptation des formes larvaires, *An. Coluzzii* est associée aux milieux relativement complexes et permanents caractérisés par la présence de végétations flottantes et de prédateurs alors que *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont associés aux habitats simples et temporaires de savane telles que les carrières de briques ou les ornières des pistes (COSTANTINI *et al.* 2009; GIMONNEAU *et al.* 2012a). Les gîtes de prédilection sont des collections d'eaux douces stagnantes ensoleillées et peu chargées de matières organiques (ROBERT *et al.* 1998). Cependant à la faveur de certaines activités anthropiques suburbaines et urbaines, il se crée des gîtes pollués, atypiques, très souvent chargés de matières organiques qui sont de plus en plus colonisés par *An. gambiae s.l.* avec une prédominance d'*An. arabiensis*. Récemment des études menées au Burkina Faso dans les banlieues de la ville de Ouagadougou et dans un quartier central de Bobo-Dioulasso ont révélé que ces deux zones urbaines sont dorénavant colonisées en grande majorité par *An. arabiensis* suivi d'*An. coluzzii* et d'une faible proportion d'*An. gambiae* (DABIRE *et al.* 2012; FOURNET *et al.* 2010).

D'autre part, il a été montré au Mali, que les adultes d'*An. coluzzii* ont une longévité supérieure et semblent pondre plus d'œufs que les femelles d'*An. gambiae* (LEHMANN et DIABATE 2008; YARO *et al.* 2006). Également, sur le plan de la susceptibilité aux insecticides, la fréquence du gène de résistance *kdr* est plus élevée chez *An. gambiae* que chez *An. coluzzii* et *An. arabiensis* (CHANDRE *et al.* 1999; DABIRE *et al.* 2012; TRIPET *et al.* 2007; YAWSON *et al.* 2004). La mutation *ace-1R* a été rapportée au sein des deux espèces jumelles d'*An. gambiae s.s.* surtout à l'Ouest du Burkina mais à des fréquences plus importantes chez *An. gambiae* (DABIRE *et al.* 2009; DJOGBENOU *et al.* 2008). Les larves d'*An. coluzzii* semblent être moins susceptibles à la prédation que celles d'*An. gambiae* (GIMONNEAU *et al.* 2012a). Il a également été montré un temps de développement larvaire plus long chez *An. coluzzii* que chez *An. gambiae* ; et à taille de l'aile égale, une réserve énergétique plus importante a été trouvée chez *An. coluzzii* (MOULINE *et al.* 2012).

Pour ce qui concerne la susceptibilité à l'infection plasmodiale, elle est variable en fonction des espèces et des génotypes de *Plasmodium* (COLLINS et CONTACOS 1979; HARRIS *et al.* 2012; LAMBRECHTS *et al.* 2005) et des souches anophéliennes (ALAVI *et al.* 2003; BOISSIERE

et al. 2013; FRYXELL *et al.* 2012; LEMASSON *et al.* 1997; MACDONALD 1967; NDIATH *et al.* 2008; NDIATH *et al.* 2011) modulés par des facteurs environnementaux (LEFEVRE *et al.* 2013). En effet les études récentes sur le complexe majeur de la transmission du paludisme ont montré qu'*An. coluzzii* est plus susceptible à l'infection par *P. falciparum* au Cameroun que *An. gambiae* (BOISSIERE *et al.* 2013). Par contre, au Sénégal la forme moléculaire S est plus susceptible (NDIATH *et al.* 2011). Les 2 espèces naissantes, *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont une susceptibilité équivalente à l'infection plasmodiale selon une étude réalisée au Mali (FRYXELL *et al.* 2012) et au centre du Burkina, zone soudano-sahélienne (GNEME *et al.* 2013). Aucune des études précédentes n'a mis en corrélation la susceptibilité de l'infection et la taille du moustique et/ou la taille du repas sanguin. Alors que dans les années 1990 et plus récemment, il a été montré une relation positive entre la taille de l'aile du moustique et la charge en oocystique chez des souches anophéliennes susceptibles aux insecticides (LYIMO et KOELLA 1992) et des souches portant des gènes *Ace1* (ALOUT *et al.* 2013).

D'autre part, il est crucial de comprendre si les différences génétiques, écologiques et comportementales entre ces espèces majeures du complexe *An. gambiae* évoquées, peuvent affecter la structure des populations de *P. falciparum* transmises. Ceci est important pour comprendre les mécanismes de coévolution dans les interactions génotypes*génotypes (LAMBRECHTS *et al.* 2005), dans la transmission des souches de parasites virulents (SPENCE *et al.* 2013) ou résistants aux médicaments (HASTINGS 1997). Plusieurs études ont montré l'impact de l'immunité du sujet humain, des pressions médicamenteuses dans la sélection et la diversité de génotype de *P. falciparum* (MAIGA *et al.* 2007; WOOTTON *et al.* 2002). Le rôle de l'espèce ou de la population vectrice dans la diversité des parasites transmis est peu documenté. Annan *et al.* (2007) ont trouvé que la structure génétique des populations de *P. falciparum* était similaire entre *An. gambiae* et *An. funestus* capturés sur le terrain au Kenya ainsi que le taux d'infection de ces 2 vecteurs (ANNAN *et al.* 2007). Aucune étude de la diversité génétique de *P. falciparum* entre les 3 espèces majeures dans la transmission du paludisme du complexe *An. gambiae* n'a été faite. L'isolement individuel des oocystes au sein d'espèces vectrices sympatriques et l'analyse génétique par des marqueurs microsatellites pourrait permettre d'élucider le rôle des espèces du complexe *An. gambiae* dans la diversité des parasites transmis.

Dans cette présente étude, nous avons comparé la susceptibilité à l'infection de souches locales du Burkina Faso d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* pour des isolats de *P. falciparum* issus des patients de la même région en tenant compte des traits de vie du moustique (taille de l'aile, taille du repas sanguin), du porteur de gamétocytes (génotypes des gamétocytes, gamétocytémie) et de comparer la diversité génétique du parasite au sein de ces 3 espèces du complexe *An. gambiae*.

III.2.MATERIEL ET METHODES

•Échantillons de moustiques

Nous avons utilisé des larves de stade L1 d'*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* provenant de souches locales sympatriques établies à l'insectarium comme précédemment décrit dans le chapitre méthodologie générale. Les larves de chaque souche ont été élevées dans des conditions strictement identiques. En effet, nous avons mis le nombre de larves par bac (100 larves L1 par bac), la même quantité de nourriture (0,2 mg/larve) et d'eau de sources (2,7 litres d'eau par bac). Les nymphes obtenues, ont été collectées après 4 à 5 jours dans des gobelets plastiques avec de l'eau de sources et placés dans des cages à émergences (30*30*30 cm) et étiquetées par souche. Les adultes issus ont été nourris *ad libitum* avec du glucose 10% dans les conditions standards de l'insectarium.

•Infection expérimentale

À 3 jours après émergence (J3), 3 gobelets contenant 50-60 femelles ont été utilisés pour chaque souche (*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*). Ces femelles adultes élevées dans les conditions strictement identiques ont été affamées 24h avant, et infectées par gorgement sur membrane avec du sang du même porteur de gamétocytes. Les femelles gorgées ont été triées et mises en tubes individuels étiquetés. Elles ont été maintenues à l'insectarium dans les conditions standards et nourries au glucose 10% *ad libitum*.

•Détermination du niveau d'infection

Tous les moustiques survivants ont été anesthésiés au froid 7 jours après la prise du repas de sang infecté (J7 après infection) et disséqués immédiatement. Les phénotypes suivants ont été mesurés : le nombre d'oocystes par moustique, la taille de l'aile, la quantité d'hématine excrétée.

Les estomacs parasités ont été gardés dans l'éthanol absolu à -20°C pour l'isolement individuel des oocystes.

•Isolement individuel des oocystes génotypage microsatellite

Nous avons cherché à déterminer les génotypes de parasites transmis par les différentes espèces (*d'An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*) lors du développement sporogonique. Pour cela, les oocystes ont été isolés individuellement à partir des estomacs infectés conservés dans de l'éthanol absolu à -20°C selon le protocole décrit par ANNAN *et al.* (2007). Nous avons choisi aléatoirement les estomacs des moustiques issus des replicats A, B, C pour mener cette expérience.

L'estomac parasité est d'abord réhydraté successivement dans l'éthanol 70°C , 30°C et l'eau distillée stérile. L'estomac réhydraté est placé dans $10\ \mu\text{l}$ d'eau distillée stérile sur une lame polysine, le tout disposé sur la platine d'un microscope à phase inversée (Leica®, Deerfield, IL). Les oocystes ont été isolés, à l'aide de mandrins munis de munities très fines ($20\ \mu\text{m}$). Une fois détaché de l'estomac, l'oocyste a été recueilli par aspiration capillaire à l'aide d'une pipette pasteur dont l'extrémité avait été préalablement effilée à la flamme. Les munities ont été stérilisées à l'eau de javel entre deux oocystes disséqués et changés régulièrement. L'oocyste a été ensuite introduit dans un tube Eppendorf® stérile de 0.5ml contenant $10\ \mu\text{l}$ d'eau stérile et conservé immédiatement à -20°C pour l'extraction de l'ADN.

•Extraction d'ADN

L'ADN des oocystes a été extrait en utilisant le Kit QIAGEN®DNeasy Blood and Tissue kit® (Valencia, CA) suivant le protocole du fabricant. À la fin de l'extraction, un éluat de $50\ \mu\text{l}$ de l'ADN de l'oocyste est recueilli dans un tube Eppendorf® stérile de $1,5\ \text{ml}$ et gardé à -20°C au congélateur. La qualité de l'isolement et de l'extraction a été faite sur les ADN en effectuant une PCR diagnostique *P. falciparum* comme décrite précédemment. Les ADN des oocystes individuels sont ensuite génotypés pour 7 microsatellites.

•Génotypage microsatellite

Le génotypage microsatellite a pour but d'étudier le polymorphisme ou la diversité génétique au sein d'une population grâce à la taille des allèles des marqueurs génétiques neutres appelés microsatellites. Pour ce qui est de notre étude, il s'agissait de voir si les 3 populations de moustiques d'origine géographique identique (*An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*) transmettent les mêmes génotypes de *P. falciparum*.

Nous avons utilisé le protocole d'ANDERSON *et al.* (1999 et 2000b). L'ADN extrait de chaque échantillon a subi 7 PCR nichées (Nested PCR), en utilisant les marqueurs microsatellites suivants (Tableau I) : POLYa (P20), TA60 (P21), ARA2 (P22), Pfg377 (P23), PfPK2 (P24), TA87 (P25), et TA109 (P26). La 1^{ère} PCR a utilisé 2 µl d'ADN des oocystes pour un volume réactionnel de 15 µl et respectivement les amorces P20R et P20F pour amplifier la matrice microsatellite P20, P21F1 et P21R pour la matrice microsatellite P21, P22F1 et P22R pour la matrice microsatellite P22, P23F et P23R1 pour la matrice microsatellite P23, P24F et P24R1 pour la matrice microsatellite P24, P25F1 et P25R pour la matrice microsatellite P25, P26F1 et P26R pour la matrice microsatellite P26 (Conditions opératoires en annexe).

Pour la PCR nichée, 1,5 µl du produit de la 1^{ère} PCR a été utilisée avec respectivement les amorces suivantes, dont une fluorescente (*) et l'autre non : P20F et P20R2* pour amplifier la matrice microsatellite P20, P21F2 et P21R* pour la matrice microsatellite P21, P22F2* et P22R pour la matrice microsatellite P22, P23F et P23R2* pour la matrice microsatellite P23, P24F et P24R2* pour la matrice microsatellite P24, P25F* et P25R pour la matrice microsatellite P25, P26F2* et P26R pour la matrice microsatellite P26 (Conditions opératoires en annexe).

Les produits PCR2 ont été ensuite gardés dans les plaques PCR à -20°C.

Ces ADN amplifiés issus des PCR nichées ont été transportés en respectant la chaîne de froid pour le génotypage microsatellite à la plateforme génomique de l'Unité Mixte de Recherche MIVEGEC (UMR MIVEGEC 224), à Montpellier, France.

Pour le génotypage proprement dit, les produits PCR nichés ont été répartis en 2 pools selon la couleur différente du marqueur fluorescent (un mélange ne doit pas être constitué de marqueurs de couleurs identiques) et dilués au 1/100. Le Pool A était constitué du mélange des produits PCR2 : P20, P22, P25 de l'échantillon. Le Pool B était constitué de mélange des produits PCR2 de l'échantillon : P21, P23, P26. Le mélange ainsi effectué est dénaturé à la Formaldéhyde (13,9 µl/ échantillon). Le marqueur de taille utilisé était GeneScan500LIZ® (0,1 µl par échantillon). Le mélange préparé est ainsi génotypé avec le séquenceur ABI Prism310 Genetic Analyser 3130XL (Applied Biosystem®). Nous avons utilisé le logiciel Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystem®) pour déterminer la taille des allèles (figure 12).

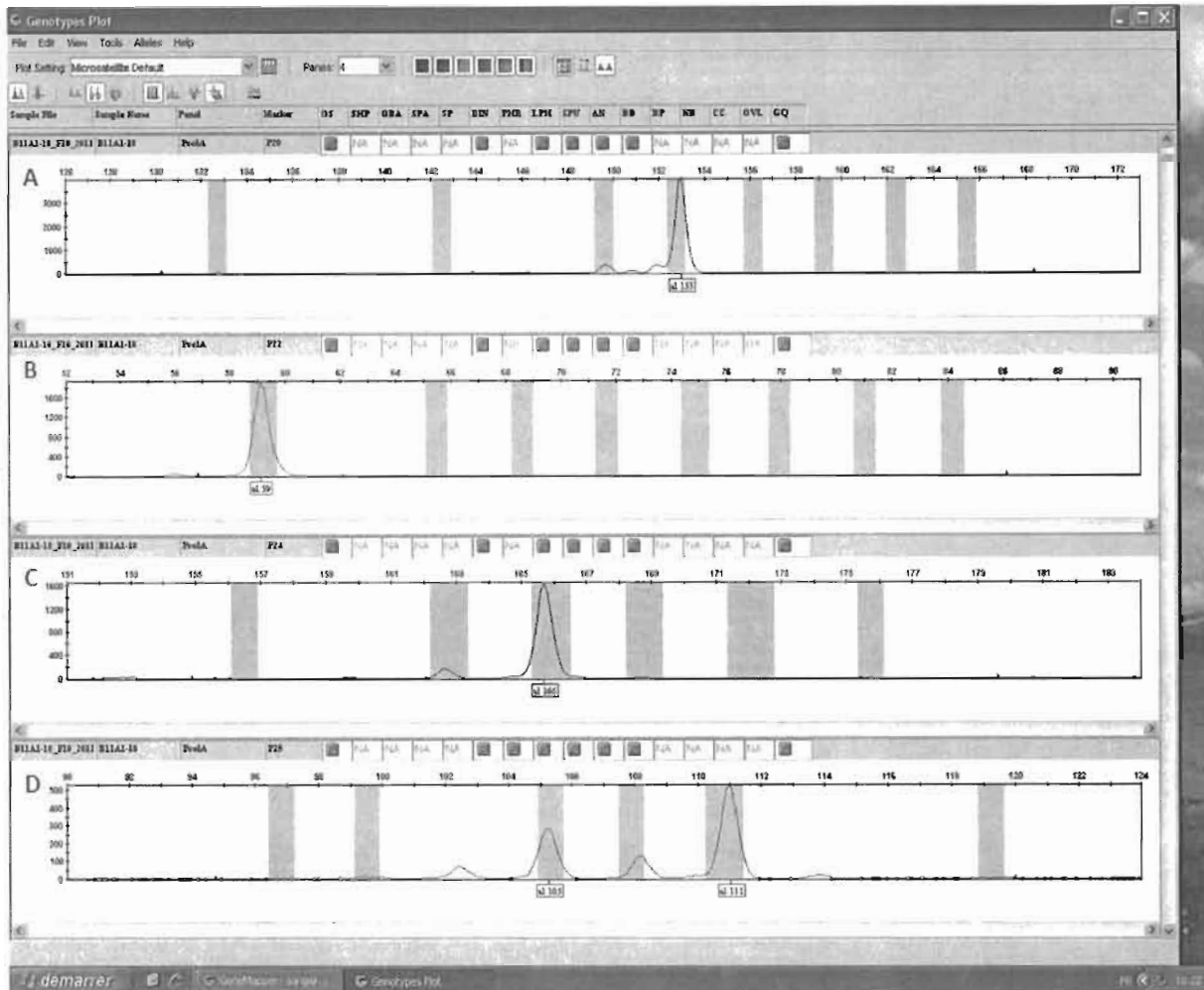


Figure 12 : Exemple de génotypage microsatellite d'oocyste de *P. falciparum* après analyse logiciel Gene Mapper 4.0

- A : Individu homozygote pour le locus P20 avec une taille d'allèles de 153 pb. ;
- B : Individu homozygote pour le locus P22 avec une taille d'allèles de 59 pb ;
- C : Individu homozygote pour le locus P24 avec une taille d'allèles de 166 pb ;
- D : Individu hétérozygote pour le locus P25 avec une taille d'allèles 105 de 111 pb.

Les caractéristiques des marqueurs sont résumées dans le tableau I

Tableau I: Récapitulatif des amorces utilisées pour le génotypage microsatellites des oocystes de *P. falciparum* (Zeinab, 2007)

| Marqueur | Code du marqueur | Source GenBank | Position sur le Chromosome | Locus | Amorces | Type de variation du trinuécléotides | Taille des allèles |
|----------------|------------------|--------------------------|----------------------------|--------|------------------------------|--|--------------------|
| Poly- α | P20 | L18785, AF166139 | 4 | P20F | 5'AAA ATA TAG ACG AAC AGA3' | (ATT) ₁₁₋₂₀ | 130-186 |
| | | | | P20 R1 | 5'ATC AGA TAA TTG TTG GTA | | |
| | | | | P20R2* | 5'GAA ATT ATA ACT CTA CCA | | |
| TAA60 | P21 | AF010556, AF166144-6 | 13 | P21 F1 | 5'CTC AAA GAA AAA TAA TTC | (AAT) ₈₋₁₃ | 70-88 |
| | | | | P21F2* | 5'TAG TAA CGA TGT TGA CAA | | |
| | | | | P21 R | 5'AAA AAG GAG GAT AAA TAC AT | | |
| ARA2 | P22 | X17484, AF166128-130 | 11 | P22 F1 | 5'GTA CAT ATG AAT CAC CAA | (AAT) ₉₋₁₂ | 57-84 |
| | | | | P22F2* | 5'GAA TAA ACA AAG TAT TGC T | | |
| | | | | P22 R | 5'GCT TTG AGT ATT ATT AAT A | | |
| Pf3g77 | P23 | L04161, AF166131-3 | 12 | P23 F | 5'GAT CTC AAC GGA AAT TAT | (AAT) ₇₋₉ | 92-104 |
| | | | | P23 R1 | 5'TTA TGT TGG TAC CGT GTA | | |
| | | | | P23R2* | 5'TTA TCC CTA CGA TTA ACA | | |
| PfPK2 | P24 | X63648, AF166147-51 | 12 | P24 F | 5'CTT TCA TCG ATA CTA CGA | (TAA) ₈₋₁₃ | 160-207 |
| | | | | P24 R1 | 5'CCT CAG ACT GAA ATG CAT | | |
| | | | | P24R2* | 5'AAA GAA GGA ACA AGC AGA | | |
| TAA87 | P25 | AF010571, AF166152-6 | 6 | P25 F1 | 5'ATG GGT TAA ATG ACG TAG A | (AAC) ₇₋₁₁ /(AAT) ₉₋₁₂ | 89-119 |
| | | | | P25F2* | 5'AAT GGC AAC ACC ATT CAA C | | |
| | | | | P25 R | 5'ACA TGT TCA TAT TAC TCA C | | |
| TAA109 | P26 | AF010508, AF166157-66 | 6 | P26 F1 | 5'TAG GGA ACA TCA TAA GGA T | (CTA) ₆₋₁₂ | 151-194 |
| | | | | P26F2* | 5'GGT TAA ATC AGG ACA ACA T | | |
| | | | | P26 R | 5'CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA | | |

F : Amorce Forward; R : Amorce Reverse; * : Amorce marquée.

Analyses statistiques

La régression logistique par modèles linéaires généralisés mixtes (GLMM), avec le package lme4 (VAZQUEZ *et al.* 2010) a été utilisé pour étudier l'effet des espèces de moustiques sur la prévalence en oocystes.

Le GLMM avec des erreurs binomiales négatives (package GLMMadmb dans R v 2.15.0) a été utilisé pour tester l'effet des espèces de moustiques sur l'intensité en oocystes.

La prévalence a été définie comme la proportion de moustiques ayant au moins un oocyste sur le nombre de moustiques disséqués par espèce.

L'intensité de l'infection a été définie comme le nombre moyen d'oocystes par estomac et par espèce de moustique ayant au moins un oocyste.

Également, nous avons déterminé s'il existe une corrélation entre la prévalence ou l'intensité et la quantité de sang ingérée par le moustique et la taille de l'aile.

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel de statistique gratuit R version 2.15.0 (R Development Core Team 2012) au seuil de signification de 5%.

Nous avons étudié la diversité génétique des oocystes développés inter et intra espèce vectorielle par le polymorphisme microsatellite. Pour estimer la différenciation génétique des oocystes entre les 3 populations de vecteurs, nous avons réalisé une analyse hiérarchisée en tenant compte des 3 niveaux de structures hiérarchiques de notre jeu de données :

- (i) : le niveau 1 (levPorteur) prend en compte la structuration génétique des oocystes en tenant compte du porteur de gamétocytes ;
- (ii) : le niveau 2 (levSouche) prend en compte la structuration génétique des oocystes en tenant compte des populations de vecteur ;
- (iii) : le niveau 3 (levEstomac) prend en compte la structuration des oocystes en tenant compte de l'estomac dans lequel ils ont été isolés.

Le package HIERFSTAT conçu pour être utilisé dans le logiciel R permet d'estimer et de tester les F-statistiques hiérarchiques pour un nombre quelconque de niveaux hiérarchiques.

Nous avons donc utilisé ce logiciel pour prendre en compte les 3 niveaux de structures hiérarchiques prédéfinies et en utilisant le tutorial élaboré par DE MEEUS et GOUDET (2007)

Au total nous avons effectué 4 séries d'expériences notées A, B, C, D avec respectivement 4 patients ayant des gamétocytémies respectives de 576, 768, 1024, 3008 gamétocytes / μ l.

III.3.RESULATS

Nombre de moustiques testés

Un total de 699 moustiques femelles ont été disséqués J7 après infection, répartis comme suit selon la série d'expérience (Tableau II).

Tableau II:Récapitulatif des effectifs de moustiques testés

| Moustiques Experience | <i>An. arabiensis</i> | <i>An. coluzzii</i> | <i>An. gambiae</i> | Total |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|-------|
| A | 57 | 94 | 69 | 220 |
| B | 41 | 74 | 67 | 182 |
| C | 34 | 69 | 35 | 138 |
| D | 47 | 47 | 65 | 159 |
| Total | 179 | 284 | 236 | 699 |

Prévalence de l'infection : dans l'ensemble, *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont présenté un taux d'infection similaire (respectivement 86%, 83% et 83%; $X^2 = 1$, $p = 0.6$, figure 13a). Ni la gamétoctémie, ni la taille de l'aile n'ont eu un impact sur la prévalence de l'infection ($X^2 = 0,1$, $p = 0,9$, figure 14a ; et $X^2 = 2,4$, $p = 0,12$, respectivement). Cependant, il y avait un fort effet de la taille du repas de sang avec une probabilité accrue d'infectés chez les femelles qui avaient ingéré une quantité importante de sang ($X^2 = 66$, $p < 0,001$, figure 13b). Cet effet a été observé chez les trois espèces de moustiques ($X^2 = 62$; $p = 0.6$, figure 13b). Enfin, nous n'avons trouvé aucune interaction entre les espèces de moustiques et la gamétoctémie ($X^2 = 5,2$, $p = 0,07$) et aucune interaction entre la taille de l'aile et l'espèce de moustique ($X^2 = 5$, $p = 0,08$) sur la prévalence de l'infection.

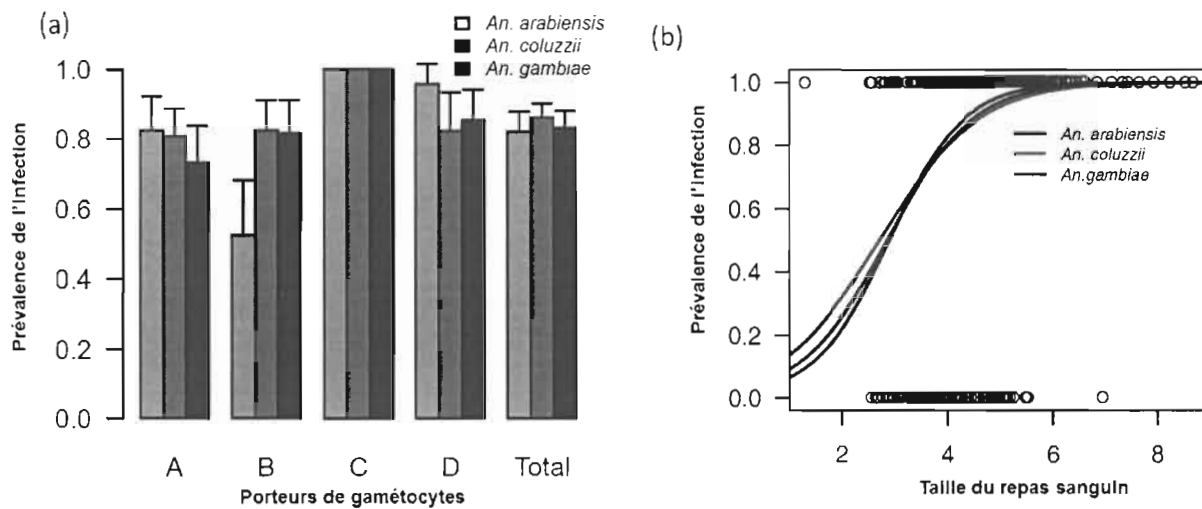


Figure 13 : Prévalence de l'infection comparée chez les 3 espèces vectrices

Intensité de l'infection : Le nombre d'oocystes développés chez les moustiques infectés a varié significativement entre les 3 espèces de moustiques (avec une moyenne de $21 \pm 1,3$; $19,2 \pm 1,7$ et $16,4 \pm 1,4$ respectivement chez *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* ($X^2 = 37.5$, $p < 0.001$, figure 14a). Nous avons trouvé un effet significatif de la gamétocytemie avec une corrélation positive entre la gamétocytemie et la charge oocystique ($X^2 = 7,4$, $p = 0,007$) chez les 3 espèces de moustiques ($X^2 = 2$, $p = 0,35$; figure 14a).

Il y avait également un effet de la taille de moustique sur l'intensité de l'infection par les plus grosses femelles hébergeant nettement moins oocystes que les petites femelles ($X^2 = 7,6$; $p = 0,006$; figure 14b) et cet effet était identique chez les 3 espèces de moustiques ($X^2 = 2,6$; $p = 0,3$; figure 14b).

Enfin, il y'avait une corrélation positive entre la taille du repas sanguin et la charge oocystique quelle que soit la quantité de sang ingérée ($X^2 = 19$; $p < 0,001$) ; figure 14c) indépendamment de l'espèce de moustique ($X^2 = 0,6$, $p = 0,7$; figure 14c).

La moyenne de la taille du repas sanguin était plus élevée chez *An. coluzzii*, que chez *An. gambiae* et *An. arabiensis*, respectivement, $4,7 \pm 0,05$, $4,4 \pm 0,06$, et $4,2 \pm 0,05$ μg ($p < 0,001$). La moyenne de la taille de l'aile était également différente chez *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. arabiensis* (respectivement $2,98 \pm 0,013$; $3,07 \pm 0,014$, $3,22 \pm 0,018$ mm). Nous avons obtenu une interaction marginalement significative entre la taille de l'aile et la quantité de sang ingérée sur l'intensité en oocystes ($p = 0.054$).

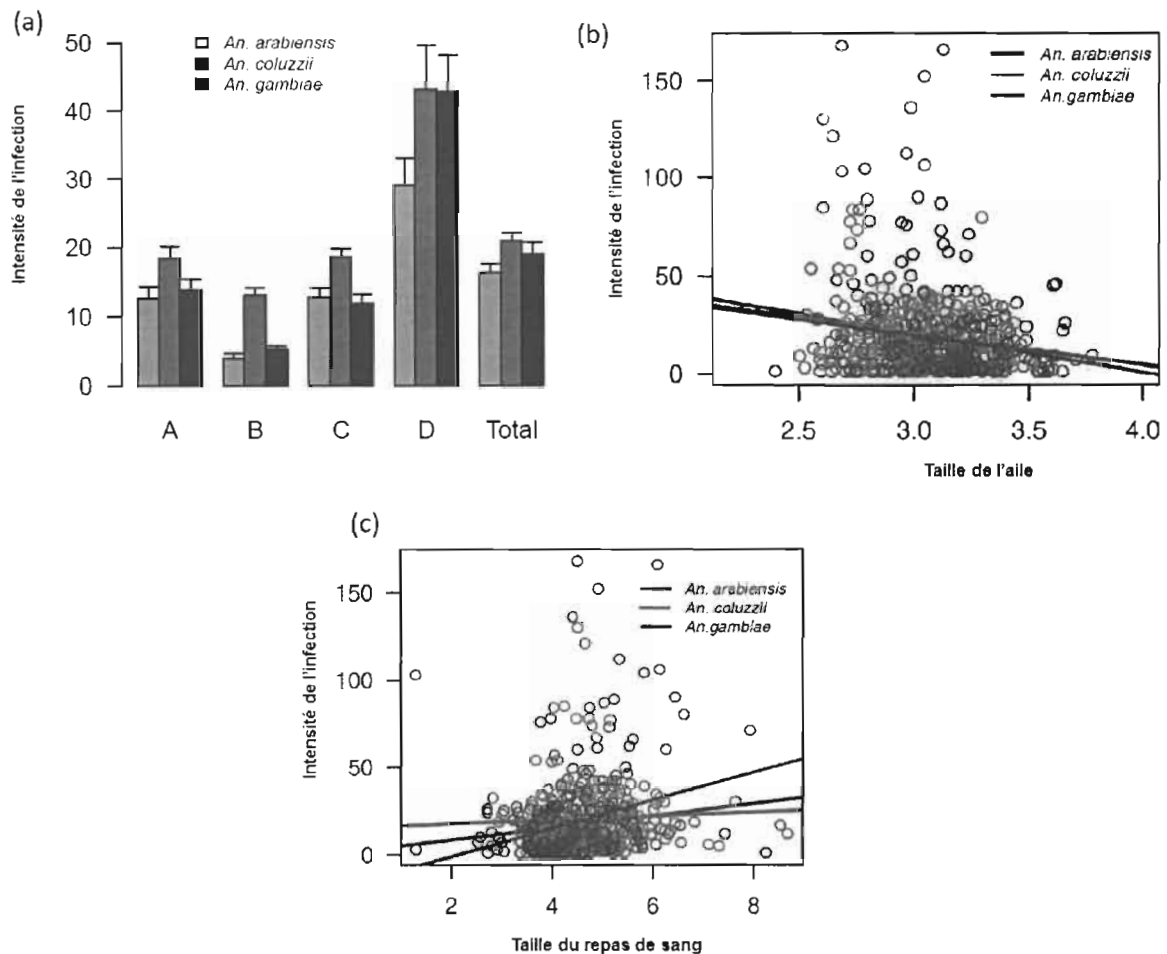


Figure 14 : Intensité de l'infection comparée chez les 3 espèces vectrices

Structure génétique des oocystes isolés par souche de moustiques :

Un total de 270 oocystes répartis comme suit, 107 pour *An. coluzzii*, 64 pour *An. gambiae* et 99 oocystes pour *An. arabiensis*, issus des estomacs sélectionnés aléatoirement des 3 expériences A, B et C ont pu être génotypés pour les 7 marqueurs microsatellites (tableau III). Le locus microsatellite P25 pour les 270 oocystes génotypé n'était pas assez polymorphe. Il a été exclu de la suite des analyses.

Tableau III: Nombre d'oocystes isolées par estomac, par souches et par replicat

| Replicat | Moustique | Estomac1 | Estomac 2 | Estomac3 | Estomac4 | Estoma5 | Estomac 6 | Estomac7 | Estomac 8 | Estomac 9 | Total |
|----------|-----------------------|----------|-----------|----------|----------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|-------|
| A | <i>An. arabiensis</i> | 1* | 14 | 3 | 2 | 12 | 4 | 10 | 4 | | 50 |
| | <i>An. coluzzii</i> | 5 | 6 | 5 | 4 | 7 | 4 | 1 | 14 | 1 | 47 |
| | <i>An. gambiae</i> | 3 | 8 | 2 | 4 | 2 | 1 | 1 | | | 21 |
| Total A | | | | | | | | | | | 118 |
| B | <i>An. arabiensis</i> | 3 | 5 | 11 | 2 | 2 | 3 | | | | 26 |
| | <i>An. coluzzii</i> | 3 | 13 | 12 | 4 | 1 | | | | | 33 |
| | <i>An. gambiae</i> | 4 | 5 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | | 18 |
| Total B | | | | | | | | | | | 77 |
| C | <i>An. arabiensis</i> | 3 | 5 | 1 | 6 | 8 | | | | | 23 |
| | <i>An. coluzzii</i> | 4 | 3 | 6 | 1 | 7 | 4 | 2 | | | 27 |
| | <i>An. gambiae</i> | 4 | 8 | 1 | 1 | 5 | 5 | 1 | | | 25 |
| Total C | | | | | | | | | | | 75 |
| Total | | | | | | | | | | | 270 |

*Nombre d'oocyste isolé sur l'estomac donné

Le nombre d'allèles était par locus compris entre 2 à 5 et l'hétérozygotie attendue entre 0,3055 et 0,2491 (Tableau IV).

Tableau IV: Résumé des paramètres génétiques des loci microstaellites entre les 3 espèces de moustique en fonction des replicats de l'expérience

| Locus | A | | | B | | | C | | | All |
|-----------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| | An. col | An. ga | An. ara | An. col | An. ga | An. ara | An. col | An. ga | An. ara | |
| 1 | 29 | 27 | 24 | 41 | 18 | 39 | 24 | 9 | 22 | 233 |
| 20 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 1 | 2 | 1 | 4 | 3 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| He | 0 | 0,0417 | 0 | 0,5196 | 0,4669 | 0,4548 | 0,2381 | 0 | 0,1421 | 0,2491 |
| Is | - | - | - | -0,0364* | -0,2598 | -0,0638 | 0,2697 | - | -0,0556 | -0,0421 |
| 21 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 3 | 5 |
| He | 0,0769 | 0,0783 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3048 | 0,25 | 0,1381 | 0,0690 |
| Is | 0,5 | -0,0213 | - | - | - | - | -0,0938 | 1 | -0,0345 | 0,1368 |
| 22 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 4 | 5 |
| He | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3119 | 0,1667 | 0,2607 | 0,05317 |
| Is | - | - | - | - | - | - | 0,3588 | - | -0,0959 | 0,091 |
| 23 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| He | 0,0741 | 0,0435 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,085 | 0 | 0,1762 | 0,0393 |
| Is | 1 | - | - | - | - | - | -0,0233 | - | -0,0811 | 0,1905 |
| 24 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 6 | 3 | 3 | 6 |
| He | 0,0734 | 0,0435 | 0,05 | 0,4908 | 0,5588 | 0,4571 | 0,3658 | 0,4667 | 0,2427 | 0,3055 |
| Is | -0,0097 | -0,011 | - | -0,2226 | -0,193* | -0,397* | 0,2544 | 0,6429 | -0,0843 | -0,1438 |
| 26 | | | | | | | | | | |
| Allèles | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 5 | 2 | 5 | 5 |
| He | 0,0417 | 0,0824 | 0,087 | 0 | 0 | 0,0278 | 0,2776 | 0,1429 | 0,3405 | 0,0966 |
| Is | - | - | 1 | - | - | - | -0,0806 | - | -0,1189 | 0,0315 |
| Ill us | | | | | | | | | | -0,035 |

An. col : *An. coluzzii* ; An. ga : *An. gambiae* ; An. ara : *An. arabiensis* ; allèles : nombre ; He : hétérozygotie attendue; * : significatif).

L'analyse de la structuration génétique entre les oocystes au sein des 3 espèces, *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* n'a pas montré de différenciation génétique significative par replicat et pour l'ensemble des 3 replicats pour l'ensemble des 7 marqueurs (tableau V).

La structure génétique des populations des oocystes variait en tenant compte des niveaux d'hierarchisation fixé.

Entre porteurs de gamétocytes, une forte différenciation génétique significative a été observée ($F_{st} = 0,8163$; $p = 0,001$). Par contre, l'analyse hiérarchisée n'a pas montré de différenciation génétique entre souche par porteur et entre souche par individu (tableau V)

Tableau V: Différenciation génétique entre les oocystes issus des 3 espèces de moustiques
En tenant compte de l'effet patient donneur de gamétocytes, souche et individu de moustiques

| | lev1porteur | | lev2souche | | lev3estomac | | Ind | |
|-----------|-------------|-------|------------|------|-------------|------|--------|------|
| | Fst | p | Fst | P | Fst | p | Fst | p |
| total | 0,8163 | 0,001 | - | | | | | |
| v1porteur | - | | -0,0080 | 0,54 | | | | |
| v2souche | - | | - | | 0,0214 | 0,48 | | |
| v3estomac | - | | - | | | | -0,055 | 0,81 |

III.4.DISCUSSION

Au Burkina Faso, *Anopheles coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont 3 vecteurs majeurs du paludisme, sympatriques dans la région de Bobo-Dioulasso, région soudanienne où la transmission du paludisme est permanente (DABIRE *et al.* 2012). Dans cette étude, nous avons comparé la susceptibilité à l'infection à *P. falciparum* des 3 vecteurs à l'infection issus des patients vivants dans la même localité. Les facteurs tels que la température, l'âge du moustique, l'alimentation du vecteur (stade larvaire, la quantité de sang prise, les facteurs liés à l'hôte vertébré au cours du repas sanguin) peuvent influencer la dynamique de transmission du paludisme. Ces conditions ont été standardisées au laboratoire. En effet, l'infection a été réalisée expérimentalement par le système de gorgement sur membrane ; ce qui a permis de gorger pour chaque replicat les 3 souches anophéliennes sur le même porteur de gamétocytes. Les résultats suggèrent que la susceptibilité à l'infection chez les 3 souches anophéliennes du Burkina Faso, *Anopheles coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*, est variable en termes de nombres d'oocystes développés (intensité à l'infection). En effet, les analyses montrent une charge en oocyste décroissante respectivement de chez *An. coluzzii*, *An. gambiae* et *An. arabiensis*. L'intensité de l'infection était corrélée positivement à la gamétocytémie, à la quantité de sang ingérée par le moustique et négativement à la taille de l'aile du moustique chez les 3 espèces anophéliennes. Plusieurs explications peuvent être données à cette plus grande susceptibilité à l'infection d'*An. coluzzii*.

Anopheles coluzzii prenait une quantité importante de sang, donc une probabilité d'ingérer plus de gamétocytes. Par ailleurs, une relation positive a également été obtenue entre la gamétocytémie et le nombre d'oocystes dans l'estomac des moustiques en accord avec d'autres études (ALOUT *et al.* 2013; DRAKELEY *et al.* 2003).

La taille du moustique pourrait également expliquer les fortes charges parasitaires retrouvées chez *An. coluzzii*. Nous avons trouvé qu'*An. coluzzii* était plus petite qu'*An. gambiae* ainsi qu'*An. arabiensis* et une relation négative entre la taille du moustique et la charge en oocystes. Donc, *An. coluzzii* a moins de ressources allouées à l'activation du système immunitaire qui est connue très coûteuse (OLIVEIRA *et al.* 2011; RIVERO *et al.* 2007; RIVERO et FERGUSON 2003).

Étant donné que les déterminants liés à l'environnement, aux parasites et aux porteurs de gamétocytes, les facteurs génétiques, intrinsèques des vecteurs pourraient expliquer en partie

la différence d'intensité en oocystes entre les 3 espèces anophéliennes. En effet, l'environnement du moustique est assez hostile au développement du parasite. L'issue de l'infection est un équilibre entre la traversée des barrières physiques par le parasite et la réponse du système immunitaire du moustique qui vise à limiter l'infection (CIRIMOTICH *et al.* 2010; DONG *et al.* 2006; DONG *et al.* 2011) ainsi que l'habilité du parasite à l'évasion immunitaire (JARAMILLO-GUTIERREZ *et al.* 2009; MOLINA-CRUZ *et al.* 2012). Les $\frac{3}{4}$ des parasites sont détruits avant la formation des oocystes matures (GOUAGNA *et al.* 1998). La réponse immunitaire induisant la production de molécules effectrices antiparasitaires du moustique a un déterminant génétique sous l'influence des facteurs environnementaux (LEFEVRE *et al.* 2013; MITRI et VERNICK 2012). Les mécanismes immunitaires impliqués incluent la phagocytose, la production de peptides antimicrobiens, tels que la cécropine, les défensines et l'attacine, et la stimulation de cascades de protéolyse qui aboutissent à une coagulation de l'hémolymphe et une encapsulation mélanotique du parasite (BLANDIN *et al.* 2009; MITRI *et al.* 2009; MITRI et VERNICK 2012).

La question sous-jacente est : est-ce que toutes les espèces d'anophèles ou encore toutes les souches d'une espèce donnée utilisent de manière identique et efficace ces mécanismes. Il existe une variabilité naturelle des fréquences alléliques des gènes de résistance dans les populations naturelles d'*An. gambiae* (LUCKHART *et al.* 2003). Les populations résistantes à l'infection ségrégent des allèles particuliers de ce gène, dont les protéines sont impliquées dans la réponse du moustique à l'infection. Le polymorphisme des gènes de l'immunité (COHUET *et al.* 2008; HARRIS *et al.* 2010; OBBARD *et al.* 2008; ROTTSCHAEFER *et al.* 2011; SIMARD *et al.* 2007) et les interactions génotypes parasitaires et génotypes du vecteur sur la compétence vectorielle (LAMBRECHTS *et al.* 2005) suggèrent alors une susceptibilité différentielle intraspécifique et interspécifique des espèces du complexe *An. gambiae* vis-vis de l'infection plasmodiale. En effet, les différenciations génétiques entre ces espèces majeures du complexe *An. gambiae* ont été bien documentées (ESNAULT *et al.* 2008; LAWNICZAK *et al.* 2010; LEE *et al.* 2013; REIDENBACH *et al.* 2012; TURNER et HAHN 2010; WHITE *et al.* 2010). En effet, il a été noté un polymorphisme génétique entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* sur le chromosome 3L chevauchant avec des gènes connus impliqués dans la réponse immune. Ils ont trouvé également qu'un variant allélique de TEP1 impliqué dans la résistance à l'infection

plasmodiale est fixe dans les spécimens d'*An. coluzzii* du Burkina et du Mali, du Ghana mais absent des spécimens du Cameroun et les spécimens d'*An. gambiae* (WHITE *et al.* 2010).

Par contre, sous l'angle de la probabilité à s'infecter, c'est-à-dire en termes de prévalence de l'infection, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les 3 souches. Le seul facteur affectant significativement la prévalence de l'infection est la quantité de sang ingérée par le moustique.

Les différents mécanismes de défense contre l'infection chez le moustique permettent de contrôler l'intensité de l'infection sans pour autant impacter la probabilité au vecteur de s'infecter. (MICHEL et KAFATOS 2005)

La susceptibilité différentielle des vecteurs en termes d'intensité de l'infection n'a pas d'impact direct sur le plan de l'épidémiologie dans la transmission du paludisme. En effet, un seul oocyste présent dans l'estomac du moustique peut poursuivre son développement pour donner plusieurs sporozoïtes, formes infectant l'homme. Mais de manière indirecte, on pourrait penser qu'une forte charge oocystique, a un effet sur la longévité, donc l'espérance de vie infectante par conséquent une réduction de la transmission du paludisme (MACDONALD 1956). Sur le terrain, dans la région de Bobo-Dioulasso, la dynamique de la transmission du paludisme est assurée par toutes les espèces vectrices. Il est connu que *Anopheles coluzzii* est présente en forte densité de juillet à fin septembre. *Anopheles gambiae* connaît son pic de densité de septembre à octobre (DABIRE *et al.* 2008).

Nous avons aussi trouvé de manière intéressante que la susceptibilité (prévalence et intensité de l'infection) est corrélée à la quantité de sang ingérée par le moustique. Cette tendance a été trouvée au niveau des 3 espèces de moustiques testées. À notre connaissance, il s'agit du premier résultat montrant clairement cette tendance. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait qu'un volume important de sang augmente le nombre de gamétocytes de sexes différents ingérés, également les génotypes de parasites (LAMBRECHTS *et al.* 2005).

Finalement, nous avons investigué le rôle des espèces de vecteurs sur la structure des populations de *P. falciparum*. Les analyses HIERFSTAT ont montré qu'il n'y avait pas de diversité génétique dans la transmission des isolats en fonction des 3 espèces anophéliennes. Nos résultats corroborent ceux trouvés par Annan *et al.* (2007), qui avaient montré qu'il n'y avait pas de ségrégation des structures parasitaires de *P. falciparum* entre *An. gambiae* et *An.*

funestus. Cela suggère une adaptation locale entre les espèces vectrices et les génotypes de parasites transmis (COHUET *et al.* 2006; JOY *et al.* 2008).

III.5.CONCLUSION PARTIELLE

Dans un contexte de spéciation écologique, *An. coluzzii* semble être plus susceptible en termes d'intensité de l'infection que les autres espèces jumelles d'importance majeure dans la transmission du paludisme, *An. gambiae* et *An. arabiensis* suggérant un rôle de l'immunité naturelle dans cette différence de susceptibilité.

Les traits de vie du moustique tels que la taille de l'aile et la quantité de sang ingérée ont un impact sur le nombre d'oocystes développés.

Par contre, il n'y avait pas de différence significative en termes de prévalence de l'infection entre ces différentes espèces. Ces résultats montrent donc, un rôle différentiel probablement mineur des espèces vectrices dans la transmission du paludisme surtout que la dynamique de densité de ces espèces est saisonnière dans la région de Bobo-Dioulasso. Il n'y avait pas non plus de différences de structuration de génotypes de parasites chez les 3 espèces lorsqu'ils se nourrissent du sang du même porteur de gamétocytes

La bonne connaissance du rôle des espèces vectorielles et des mécanismes d'évolution des structures de populations de parasites permet de mieux comprendre la transmission du paludisme et les mécanismes de propagation de résistances aux médicaments, aux vaccins, et surtout les mécanismes de diffusion des gènes antiparasitaires dans un contexte de lutte génétique. Et enfin, les études de compétence vectorielle comparative contribuent à comprendre les mécanismes de l'immunité naturelle chez le vecteur dans une perspective de lutte génétique.

**CHAPITRE IV : COUT DE L'INFECTION A
PLASMODIUM FALCIPARUM CHEZ
*ANOPHELES COLUZZII***

IV.1.INTRODUCTION

Apporter des éclaircissements sur les forces sélectives qui gouvernent les interactions entre le vecteur et son parasite a un intérêt crucial dans la lutte contre le paludisme. En effet, ces connaissances peuvent aider à la compréhension du succès de l'infection parasitaire chez les moustiques vecteurs (TRIPET *et al.* 2008), ce qui permettra d'améliorer l'efficacité des stratégies de blocage de la transmission (CHURCHER *et al.* 2012). D'un point de vue évolutif, une bonne connaissance des processus qui maintiennent la diversité génétique dans le système immunitaire du moustique est nécessaire pour interpréter les signatures de sélection génétique chez le moustique vecteur par le pathogène, et éventuellement l'identification des gènes impliqués dans la défense contre ces parasites (COHUET *et al.* 2008; OBBARD *et al.* 2008).

De plus, la manipulation génétique des moustiques pour les rendre réfractaires à l'infection plasmodiale progresse (DONG *et al.* 2011; ISAACS *et al.* 2011) et les systèmes d'introduction des transgènes dans le génome du moustique deviennent sophistiqués (SINKINS et GOULD 2006). Les études sur le coût évolutif des interactions entre les anophèles et le *Plasmodium* demeurent donc indispensables dans l'évaluation des stratégies visant à propager les transgènes réfractaires au développement du *Plasmodium* dans les populations naturelles de vecteurs (CIRIMOTICH *et al.* 2011; KOELLA et ZAGHLOUL 2008).

Malgré l'importance épidémiologique du paludisme, les forces évolutives qui régissent les interactions *Anopheles-Plasmodium* sont encore peu documentées. En effet, il n'est pas certain que l'infection à *Plasmodium* induit un coût sur le moustique. Étant donné, que la transmission du *Plasmodium* s'appuie obligatoirement sur les cycles gonotrophiques des femelles de moustiques, il est classique de considérer que le parasite a un intérêt à ne pas être virulent chez son vecteur, en particulier sur la survie du vecteur, cruciale pour la transmission, qui est la survie (SMITH et MCKENZIE 2004). Cependant, la forte réponse immunitaire développée au cours de l'invasion plasmodiale (DONG *et al.* 2006; MENDES *et al.* 2008) est révélatrice d'un intérêt pour le moustique de limiter ou d'éliminer l'infection. Cela suggère que l'infection à *Plasmodium* cause des dommages au vecteur et justifie un investissement dans la réponse immunitaire par le vecteur, investissement qui aurait un coût (MORET et SCHMID-HEMPEL 2000).

Par ailleurs, les polymorphismes dans la susceptibilité à l'infection dans les populations naturelles de vecteurs (MITRI et VERNICK 2012; RIEHLE *et al.* 2006) ainsi que les interactions génotype de parasites et génotype de moustiques sur le succès de l'infection à *Plasmodium* chez le vecteur (HARRIS *et al.* 2010; LAMBRECHTS *et al.* 2005) sont des indices supplémentaires montrant que l'infection impose un coût sur la valeur sélective du moustique (SCHMID-HEMPEL 2003). En effet, il est attendu que les allèles de résistance et de susceptibilité aux différents génotypes de parasites soient maintenus dans les populations de vecteurs à des fréquences qui dépendent du coût et de la présence de l'infection (TRIPET *et al.* 2008).

Plusieurs études ont investigué si l'infection à *Plasmodium* induit un coût à son moustique hôte. La plupart d'entre elles ont été réalisées dans des combinaisons vecteur-parasite non naturelles et une majorité a montré que l'infection affecte le moustique (FERGUSON et READ 2002b). La pertinence des combinaisons d'espèces artificielles dans des études de coévolution est toutefois discutable (COHUET *et al.* 2006; DONG *et al.* 2006; TAHAR *et al.* 2002) et plusieurs auteurs ont souligné la nécessité d'étudier les interactions moustiques-*Plasmodium* dans des combinaisons d'espèces naturelles (BOETE 2005; TRIPET 2009). Les études faites avec des combinaisons d'espèces vectrices naturelles infectées par leur espèce de parasite naturel ont révélé des résultats contradictoires (FERGUSON et READ 2002b). Certaines études n'ont pas révélé un coût de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae* (CHEGE et BEIER 1990; ROBERT *et al.* 1990), tandis que d'autres ont détecté une diminution de la fécondité (HOGG *et al.* 1997) ou de survie (ABOAGYE-ANTWI *et al.* 2010) chez les infectés par rapport aux non infectés. En outre, un coût d'infection indirecte a été observé chez les femelles ayant des sporozoïtes : elles ont tendance à prendre très souvent un repas de sang (WEKESA *et al.* 1992), donc un risque de mortalité élevé dû au comportement défensif de l'hôte vertébré (ANDERSON *et al.* 2000a). Ce comportement trophique dû à l'infection s'expliquerait probablement par une activité enzymatique de la salive réduite qui peut perturber l'ingestion de sang (ROSSIGNOL *et al.* 1984).

Les résultats contrastés rapportés sur le coût de l'infection à *P. falciparum* chez ses vecteurs naturels pourraient s'expliquer par des difficultés pour collecter un grand effectif de moustiques infectés dans la nature et de les comparer aux non infectés mais aussi, par le

manque de méthodes de détermination précise de l'âge des moustiques échantillonnés sur le terrain (ABOAGYE-ANTWI *et al.* 2010; CHEGE et BEIER 1990).

Une expérience utilisant un système d'infection expérimentale sur membrane pour obtenir un grand nombre de moustiques infectés, d'âges connus n'a pas révélé de coût de l'infection (ROBERT *et al.* 1990). Cependant, les moustiques infectés et non infectés appelés « contrôles », ont été nourris avec du sang de donneurs différents, ce qui est susceptible d'induire des différences non liées à l'infection sur les traits de vie mesurés (SANGARE *et al.* 2013), et des confusions sur un potentiel coût de l'infection. Ceci souligne la nécessité d'un contrôle approprié pour évaluer le coût de l'infection. Le contrôle devrait être un lot de moustiques non infectés ayant subi un traitement le plus proche possible des infectés. Le chauffage du sang contenant des gamétocytes à 43°C pendant 15 minutes a montré une efficacité totale dans l'inhibition ou l'inactivation des gamétocytes (MENDES *et al.* 2008). Cette méthode permet d'avoir à partir du même patient, du sang infecté par les gamétocytes et du sang non infecté, qui sera utilisé pour avoir un grand nombre de moustiques infectés versus non infectés en utilisant un système d'infection expérimentale, dans des conditions environnementales standardisées. Nous avons donc cherché dans un premier temps (**Expérience 1**) à démontrer la variabilité induite en utilisant du sang de patients différents (infecté et non infecté) pour étudier la fitness et de montrer que la technique de chauffage du sang infecté pour inactiver les gamétocytes n'affecte pas la survie, ni la fécondité des moustiques.

Les interactions *Anopheles-Plasmodium*, comme toute autre interaction Parasite-Hôte, sont modulées par les conditions environnementales (LEFEVRE *et al.* 2013). Il a été établi que dans le système *An. gambiae-P. falciparum*, le succès de l'infection du vecteur définissant la compétence vectorielle est conditionnée par les variations environnementales comme la température (OKECH *et al.* 2004), l'alimentation (OKECH *et al.* 2004), et par la flore microbienne intestinale (BOISSIERE *et al.* 2012). Des coûts d'infection ont également été montrés dans des conditions stressantes pour les moustiques, en utilisant des combinaisons artificielles d'espèces de parasites et de vecteurs (FERGUSON et READ 2002a; LAMBRECHTS *et al.* 2006). Une étude utilisant un faible nombre de femelles sauvages d'*An. gambiae* capturées a montré que l'infection à *P. falciparum* impose un coût sur la survie de son vecteur dans des conditions de stress hydrique (ABOAGYE-ANTWI *et al.* 2010). En agissant sur la compétence

vectorielle et la fitness du vecteur, les facteurs environnementaux peuvent contribuer à moduler la diversité de la résistance à l'infection (TRIPET *et al.* 2008). Par contre, la plupart des études sur les interactions *Plasmodium* et son vecteur ont été réalisées dans des conditions standardisées optimales de laboratoire afin de maximiser la fitness des moustiques. Il est donc probable que le coût induit par le parasite a été jusqu'ici sous-estimé (FERGUSON et READ 2002b).

Sur le terrain, il y a des preuves croissantes que les anophèles femelles utilisent le sucre de la plante en tant que ressource nutritionnelle (MANDA *et al.* 2007; MULLER *et al.* 2010). Cependant, il existe de grandes variations dans la disponibilité de la végétation au fil des saisons, en particulier dans les régions sahéliennes où les saisons sèches imposent des conditions très dures pour les moustiques (ABOAGYE-ANTWI *et al.* 2010). En effet, de nombreuses études ont montré que le réchauffement de la planète, aurait un impact important dans l'épidémiologie du paludisme. Les études de modélisation prédisent un nombre croissant de cas de paludisme dans les zones endémiques et non endémiques (DIOUF *et al.* 2013). Également, une résurgence de cas de paludisme est à craindre dans les pays ayant éradiqué le paludisme (GOUVEIA DE ALMEIDA 2011). On peut se demander dans un contexte de changements globaux et de mondialisation comment les parasites se sont adaptés à leurs vecteurs locaux et vice versa et comment évolueraient des nouvelles interactions entre les vecteurs et les parasites. La dynamique saisonnière de l'épidémiologie du paludisme dans les zones sahéliennes (OUEDRAOGO *et al.* 2013), évoque un rôle important du climat dans la transmission du paludisme (GARSKE *et al.* 2013), notamment dans la densité vectorielle (MANDAL *et al.* 2013), la durée et le succès du cycle sporogonique (FANG et MCCUTCHAN 2002) et probablement dans la survie du vecteur (YAMANA et ELTAHIR 2013).

La présente étude avait pour but donc de déterminer l'effet de l'infection de souches de terrain de *P. falciparum* sur les traits d'histoire de vie de son vecteur majeur de terrain, *An. coluzzii*. Ces traits d'histoire de vie indicateurs de la fitness que sont la longévité et la fécondité ont été mesurés chez le moustique en fonction de l'exposition au parasite et mis en relation avec d'autres paramètres qui pourraient interférer avec la capacité vectorielle ou la fitness tels que la quantité de sang ingéré et la taille estimée du moustique.

Après avoir défini, un contrôle approprié (**Expérience 1**), nous avons comparé les traits de vie de lots de moustiques infectés versus non infectés dans 3 conditions expérimentales :

conditions optimales de vie du moustique (**Expériences 2 et 3**), conditions de limitation de glucose (**Expérience 4**) et sous différentes conditions climatiques (**expériences 5 et 6**).

IV.2. MATERIEL ET METHODES

IV.2.1 Vue d'ensemble du protocole

Pour aborder la question du coût de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae*, nous avons utilisé la plate-forme d'infections expérimentales développée à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), à l'IRSS/DRO. Les porteurs de gamétocytes ont été identifiés comme décrit précédemment. Pour la réalisation de l'expérience de la validation du contrôle négatif, le sang utilisé provenait de personnes volontaires non infectés. Nous avons utilisé la souche d'*Anopheles coluzzii* pour l'ensemble de l'étude de l'effet de l'infection sur la fitness d'anophèle. L'étude a consisté à comparer les traits d'histoire de vie des moustiques infectés versus non infectés. Pour chaque moustique, nous avons noté les différents traits d'histoire de vie que sont la longévité, le nombre d'œufs, la taille du moustique, la taille du repas de sang et le statut d'infecté/non infecté.

✓ **La longévité** a été estimée du jour de repas de sang sur porteur de gamétocytes à la date de mort du moustique.

✓ **La fécondité** : Les pondoirs n'étaient pas mis dans les tubes. De ce fait, les femelles n'ont pas pondu. Quatre jours après l'infection, les femelles ont été tuées, les ovaires ont été placés dans une goutte de PBS sur lame et les œufs retenus ont été comptés sous la loupe.

✓ **Expérience 1** : Tout d'abord, nous avons cherché le contrôle négatif, c'est-à-dire les moustiques non infectés, ayant subi un traitement le plus proche possible des lots de moustiques infectés. Nous avons pensé qu'un sang non infecté d'une autre personne que le porteur de gamétocyte pouvait représenter des variations trop grandes. Nous avons donc utilisé le sang du porteur de gamétocytes dont les gamétocytes ont été inactivés par la chaleur (15 min à 43°C sous agitation 900 rpm). Cette manipulation nous a montré dans le passé que l'inactivation des parasites est efficace à 100% sur des dizaines d'infections réalisées (données non montrées ici). Nous avons donc vérifié si le fait de chauffer un sang pouvait affecter la fitness des moustiques. Le test a été réalisé en suivant le même protocole que pour les infections mais en utilisant un sang non infecté et en mesurant la fitness des moustiques

gorgés sur sang chauffé (lots C) versus non chauffé (lots N). Après, nous avons effectué 4 types d'expériences indépendantes.

✓ **Expérience 2** : elle a consisté à mesurer le coût de l'infection sur la fécondité des moustiques. Elle a été appelée « fitness fécondité ». Pour cela, les femelles d'*An. coluzzii* ont été nourries sur le lapin 3 à 4 jours après émergence et le repas sur le sang du porteur de gamétocytes est intervenu 2 à 3 jours après ce premier repas sanguin. Une partie du sang du porteur a été utilisée telle quelle pour avoir le lot de moustiques infectés. L'autre partie du sang du porteur a été chauffée pour avoir le lot de moustiques non infectés.

Le 1^{er} repas sanguin sur lapin est utilisé pour compenser le déficit nutritionnel probable de la vie larvaire et le second repas sanguin est nécessaire pour le développement complet des œufs (LYIMO *et al.* 2012; MOULINE *et al.* 2012). Les femelles gorgées ont été triées et mises en tubes dits « à drosophile » individuels en plastique étiquetés. Elles ont été maintenues à l'insectarium et ont été nourries au glucose 10 % avec du coton imbibé changé 2 fois par jour. Les tubes ne contenaient pas d'eau. De fait, les femelles n'ont pas pondu et la fécondité a été mesurée en comptant les œufs retenus par les femelles. Toutes les femelles ont été tuées 4 jours après le repas de sang effectué sur le porteur de gamétocytes. Le nombre d'œuf retenu par la femelle, la taille de l'aile et la quantité de sang ingéré ont été mesurés.

✓ **Expériences 3** : Elle avait pour but de déterminer l'effet de l'infection sur la longévité des moustiques dans les conditions d'alimentation optimale des moustiques testés. Les femelles âgées de 3 à 4 jours ont pris un seul repas de sang chauffé ou non du porteur de gamétocytes. Les femelles gorgées sur sang infecté et non infecté mis en tubes individuels ont été nourries 2 fois par jour sur coton imbibé d'une solution de glucose 5% et élevées dans les conditions environnementales standards de l'insectarium. La mortalité a été observée 3 fois par jour. Dès la mort, les phénotypes suivants sont déterminés : le statut d'infection, la taille du repas sanguin et la taille de l'aile.

✓ **Expériences 4, 5 et 6** : elles ont consisté à déterminer l'effet de l'infection en condition de stress nutritionnel (**Expérience 4**), sur la longévité (**Expérience 5**) et la fécondité (**Expérience 6**) de moustiques infectés en condition de stress climatique. Les femelles âgées de 3 jours ont pris du sang infecté versus non infecté. Les femelles gorgées ont été mises en tubes individuels et suivies dans différentes conditions nutritionnelles et environnementales selon le type d'expérience.

Dans l'**expérience 4**, les femelles gorgées ont subi 3 types de régime nutritionnel : un lot d'infectés et de non infectés ont été nourris avec uniquement de l'eau ; un 2^e lot avec une concentration de glucose 2,5% et le dernier lot avec du glucose 5%. Nous avons donc comparé la survie des moustiques infectés versus non infectés.

Dans les **expériences 5 et 6**, les femelles gorgées ont été surveillées dans 3 conditions environnementales différentes, dans des chambres climatiques : un lot d'infectés et non infectés dans les conditions climatiques de février, un autre lot dans celles d'août et enfin le dernier lot dans les conditions climatiques de décembre. Les données climatiques ont été obtenues grâce à la station météorologique de la malaria sphère de la Vallée du Kou (Mouline K, données non publiées). Les conditions climatiques ont été reproduites dans les chambres climatiques (Chambre de croissance pour les plantes, 0 ... 50 °C, 294 l/MLR-352, MLR-352H-SANYO) (figure 15). Chaque replicat a été réalisé dans différentes chambres climatiques afin de minimiser un effet potentiel de chambre climatique.

Le mois de mars a été considéré comme stressant pour les moustiques à cause de la faible hygrométrie et de la forte température. Le mois de décembre est également considéré comme stressant à cause du froid. Et enfin, le mois d'août a été considéré période optimale de vie du moustique à cause de la forte hygrométrie, une température moyenne acceptable (figure 16). En effet, il est noté un pic de la densité des moustiques en Août dans la région (BALDET *et al.* 2003; FOURNET *et al.* 2010).



Figure 15 :Chambre climatique, 0 ... 50 °C, 294 l/MLR-352, MLR-352H-SANYO

Pour l'expérience 5, les traits d'histoire de vie mesurés ont été la mortalité journalière et le niveau d'infection. Par contre l'expérience 6, a consisté à mesurer la fécondité des femelles infectées versus non infectées. Nous avons réalisés 4 replicats distincts pour l'expérience de la survie nommées respectivement 5A, 5B, 5C, 5D et 3 replicats pour celle de la nommés 6A, 6B, 6C.

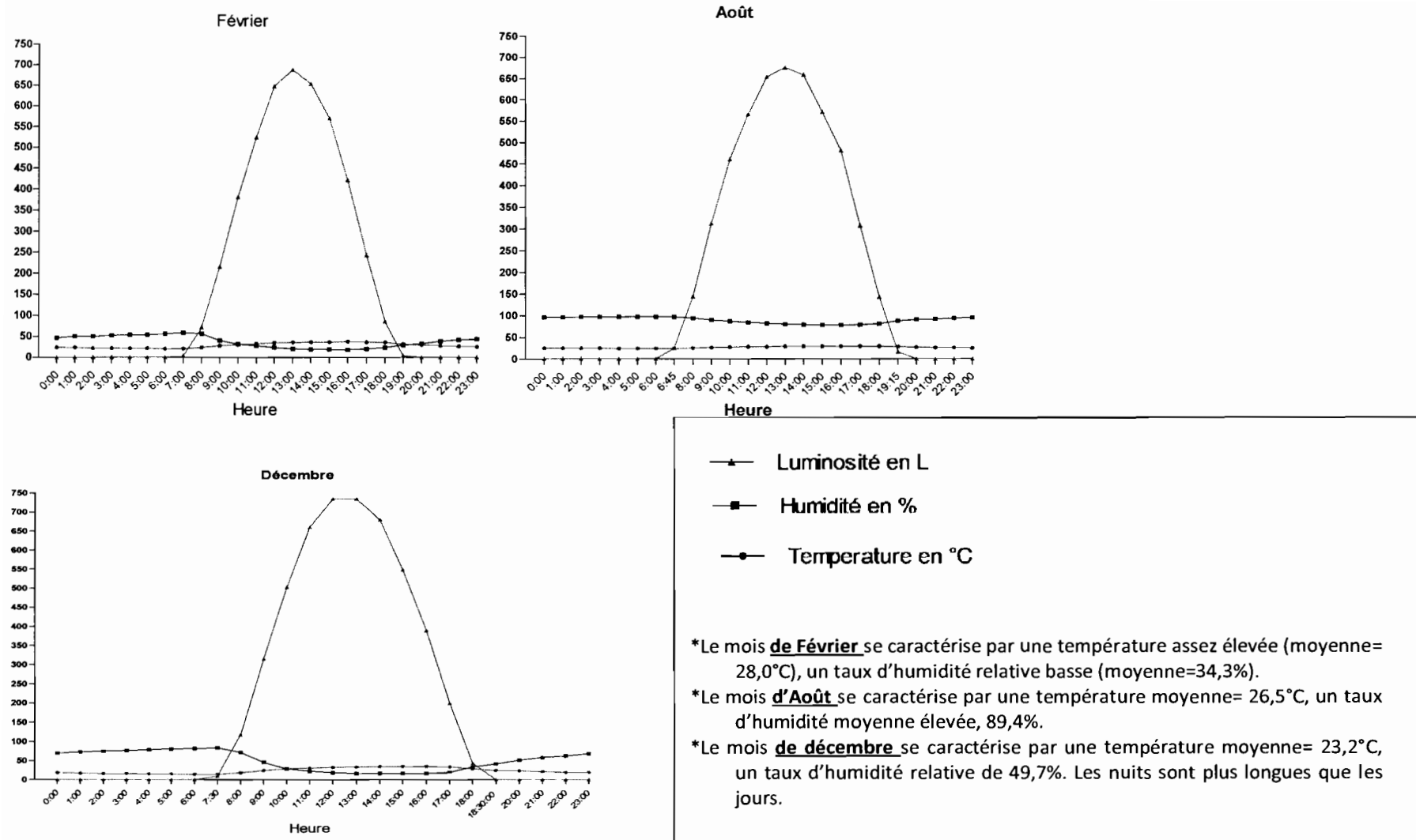


Figure 16 : Données météorologiques de 2012 des mois de Février, Août, Décembre, de la Station expérimentale de Bama (Collectée par Karine Mouline/IRD-MIVEGEC) :

IV.2.2. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel JMP7.02 (SAS Institute, 2010).

Les individus ont été divisés en différents groupes selon leur statut d'infection après le repas de sang. Les individus « contrôles » sont ceux qui ont pris du sang non infecté (chauffé).

Les individus infectés sont ceux ayant pris du sang infecté (non chauffé) et chez lesquels nous avons retrouvé une forme parasitaire dans l'estomac (ookinète ou oocyste) ou dans les glandes salivaires (sporozoïtes). Les individus qui ont pris du sang infecté (non chauffé) et dont on n'a pas trouvé du parasite chez eux ont été exclus des analyses, à l'exception de l'expérience 4, où on les a inclus dans les analyses pour mesurer le coût de la résistance à l'infection.

L'analyse des effets sur la fécondité a été faite en 2 volets. Dans un premier temps, nous avons fait une régression logistique nominale pour analyser l'effet de l'infection, du donneur de sang (patient), leurs interactions, de la taille de l'aile et de la quantité d'hématine sur la probabilité de développer au moins un œuf. Et enfin, nous avons effectué une analyse de variance pour estimer l'effet de l'infection, du patient, de la taille de l'aile, de la quantité d'hématine excrétée, et de leur interaction sur le nombre d'œufs développés.

Les analyses de l'effet de l'infection sur la survie des moustiques ont été faites selon le Cox Proportionnel Hazards Models en utilisant comme facteurs principal l'infection. Les cofacteurs ont été le patient, la taille de l'aile, la quantité d'hématine excrétée et leurs interactions. Des estimations de Kaplan Meier ont été calculées et les courbes tracées.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

IV.3. RESULTATS

IV.3.1. Validation du contrôle négatif (Expérience 1)

Nous avons réalisé 5 replicats avec le sang provenant de 5 personnes différentes. Un total de 485 moustiques a été inclus dans l'analyse.

IV.3.1.1. Effet du chauffage du sang sur la longévité des moustiques testés

Sur les 485 moustiques testés, 264 ont été gorgés sur sang non manipulé et 221 sur les échantillons de sang correspondants mais chauffés pour une simulation de l'inactivation des gamétocytes. Les courbes de survie des moustiques en fonction du type de repas sanguin étaient identiques (figure 17A).

Les tests statistiques ne montrent pas d'effet du chauffage sur la survie des moustiques ($p=0,3677$).

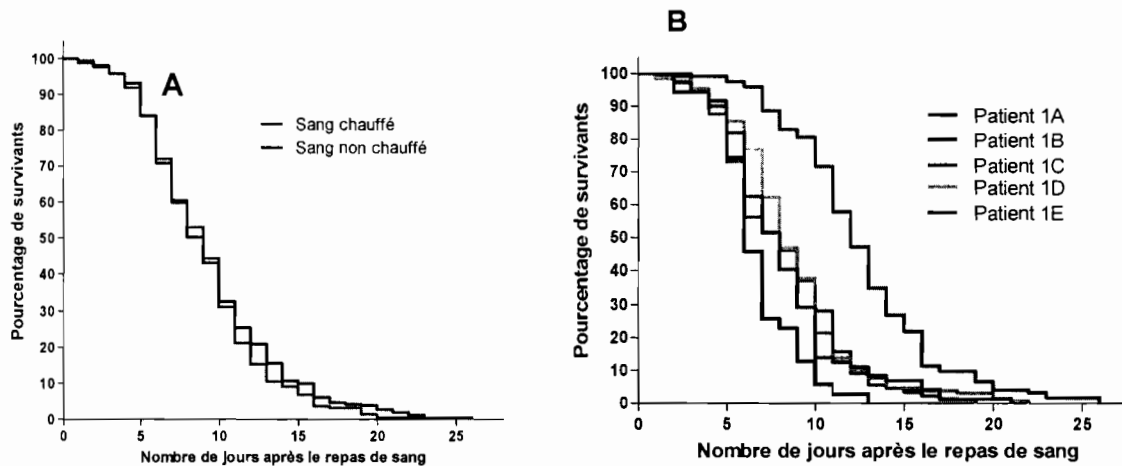


Figure 17 : Courbe de survie de Kaplan Meier en fonction du type de sang ingéré (chauffé vs non chauffé) (A) et en fonction du donneur du sang (B).

Par contre, nous avons noté de manière intéressante, un effet donneur de sang sur replicats avec 5 donneurs de sang différents, (effet patient) sur la longévité des moustiques (figure 17B). Les autres paramètres pouvant affecter la longévité étaient la taille de l'aile et la taille du repas sanguin (tableau VI).

Tableau VI: Analyse statistique de l'effet du chauffage du sang, du patient, de leurs interactions, de la taille de l'aile, du taux d'hématine excrétée sur la survie des moustiques testés (Cox Proportional Hazards model)

| Paramètres | DF | X ² | p value |
|-----------------------|----|----------------|---------|
| Chauffage/Non chauffé | 1 | 1,441 | 0,2300 |
| Patient | 4 | 95,705 | <0,0001 |
| chauffé/non chauffé | 4 | 3,114 | 0,5390 |
| Taille de l'aile | 1 | 8,087 | 0,0045 |
| Hématine | 1 | 10,204 | 0,0014 |

IV.3.1.2. Effet du chauffage du sang sur la fécondité des moustiques testés

Le chauffage du sang n'avait aucun impact ni sur la probabilité de ponte d'œufs, ni sur le nombre d'œufs développés par femelle (tableau VII).

Tableau VII: Analyse de régression nominale des effets sur la probabilité de pondre au moins un œuf

| Paramètres | DF | X ² | p value |
|-----------------------|----|----------------|---------|
| Chauffage/Non chauffé | 1 | 0,304 | 0,5816 |
| Patient | 4 | 5,611 | 0,2302 |
| chauffé/non | 4 | 1,829 | 0,7672 |
| Taille de l'aile | 1 | 1,811 | 0,1784 |
| Hématine | 1 | 20,151 | <0,001 |

La proportion des femelles qui n'ont pondé aucun œuf variait en fonction des patients (figure 18) est significativement corrélée négativement à la quantité de sang ingérée (Tableau VII). Par contre les paramètres corrélés positivement et significativement au nombre d'œufs développés ont été la taille de l'aile et la taille du repas sanguin (Tableau VII).

Tableau VIII: Analyse de variance des effets sur le nombre d'œufs développés

| Paramètres | DF | X ² | p value |
|-----------------------------|----|----------------|---------|
| Chauffage/Non chauffé | 1 | 1,3775 | 0,2414 |
| Patient | 4 | 4,3557 | 0,0019 |
| chauffé/non chauffé*patient | 4 | 1,4972 | 0,2027 |
| Taille de l'aile | 1 | 48,8617 | <0,001 |
| Hématine | 1 | 2,7881 | <0,0959 |

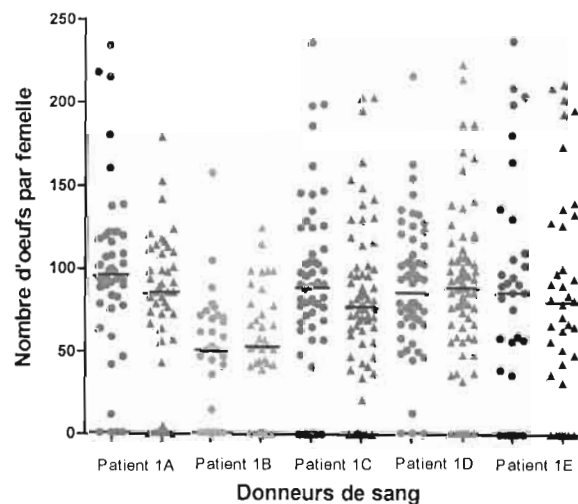


Figure 18 : Nombre d'œufs développés par les femelles nourris sur du sang chauffé vs sang non chauffé en fonction du patient (cercle : sang chauffé ; triangle : sang non chauffé).

IV.3.1.3. Effet du chauffage du sang sur la taille du repas sanguin ingérée par le moustique

Les analyses n'ont pas montré un effet chauffage sur la quantité de sang pris par les moustiques. Cependant, nous avons observé un effet patient suggérant que la taille du repas de sang ingérée diffère en fonction des patients (tableau IX).

Tableau IX: Analyse de variance des effets sur la taille du repas sanguin

| Paramètres | DF | χ^2 | p value |
|-----------------------------|----|-----------|---------|
| Chauffage/Non chauffé | 1 | 3,4092 | 0,7835 |
| Patient | 4 | 1165,2930 | <0,001 |
| chauffé/non chauffé*patient | 4 | 346,0512 | 0,1062 |

IV.3.2. Étude du coût de l'infection en condition optimale de vie (Expériences 2 et 3)

IV.3.2.1 Données parasitologiques

Nous avons utilisé 5 porteurs de gamétocytes (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) pour l'étude du coût de l'infection sur la survie des anophèles et 4 autres porteurs différents pour celle du coût de l'infection sur la fécondité (3A, 3B, 3C, 3D) (tableau X).

Tableau X: Récapitulatif des données des expériences 2 et 3

| Identité patient | Manip | Trophozoïtes/ μ L | Gametocytes/ μ L | Nombre de moustiques | Prévalence (IC95%) | Intensité oocystique (IC95%) |
|------------------|-----------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|
| 2A | Longévité | 0 | 88 | 98 | 86,2 (75,9-93,4) | 15,5 (10,5-20,6) |
| 2B | Longévité | 736 | 296 | 104 | 76,2 (64,5-85,7) | 34,4 (22,5-45,5) |
| 2C | Longévité | 0 | 72 | 100 | 58,1 (45,1-70,4) | 7,0 (4,4-9,7) |
| 2D | Longévité | 0 | 152 | 133 | 60,0 (48,8-70,5) | 37,8 (15,1-64,7) |
| 2E | Longévité | 0 | 216 | 67 | 36,3 (24,6-49,3) | 7,0 (4,2-10,0) |
| 3A | Fécondité | 0 | 952 | 131 | 84,8 (74,2-91,5) | 201,0 (166,8-237,7) |
| 3B | Fécondité | 400 | 256 | 227 | 75,0 (66,6-81,9) | 21,0 (17,5-24,8) |
| 3C | Fécondité | 0 | 96 | 163 | 32,7 (21,8-45,9) | 3,0 (1,66-4,88) |
| 3D | Fécondité | 0 | 416 | 144 | 61,0 (50,0-71,3) | 18,4 (13,5-23,9) |

IV.3.2.2 Effet de l'infection sur la longévité (Expérience 2)

Cette expérience avait pour but de mesurer l'effet l'infection à *P. falciparum* sur la survie des femelles d'*An. gambiae* dans les conditions optimales de nutrition en glucose et une condition climatique non stressante. Pour cela, 5 patients par réplicat (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) dont les gamétocytémies variaient de 72 à 296 gamétocytes / μ l ont été sélectionnés lors des prospections parasitologiques. Celles ayant ingéré du sang infecté, 192 femelles étaient infectées (tableau X). Les femelles ayant pris le sang correspondant mais chauffé, donc non infecté, étaient au nombre de 310. Un effectif total de 503 individus a été utilisé pour comparer la longévité des femelles infectées versus non infectées.

Les analyses de survie par le modèle de Cox ont montré un effet significatif du donneur de sang, de l'infection et leurs interactions (tableau XI). Le risque de mortalité chez les femelles infectées est 27,7% plus élevées que chez les non infectées. L'effet significatif de l'interaction infection*patient s'explique par le fait qu'en fonction des porteurs de gamétocytes l'infection a un effet ou pas sur la survie des femelles. Les analyses par porteur de gamétocytes montrent un effet signification de l'infection (Replicat 2C, 2E) sur les 5 replicats (figure 19). Les femelles ayant une taille élevée avaient une faible longévité. Par contre, nous n'avons pas noté un effet de la quantité de sang ingéré sur la survie des femelles.

Tableau XI: Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, leurs interactions, de la taille de l'aile et de la quantité d'hématine excrétée sur la survie des moustiques en utilisant le Cox Proportional Hazard model (condition optimale)

| Source | DF | X ² | P value |
|-------------------|----|----------------|---------|
| patient | 4 | 17,489898 | 0,0016* |
| Infection | 1 | 4,77697388 | 0,0288* |
| Patient*Infection | 4 | 11,5312762 | 0,0212* |
| Taille de l'aile | 1 | 6,2696789 | 0,0123* |
| Hématine | 1 | 1,52788945 | 0,2164 |

* indique les effets significatifs (P<0,05).

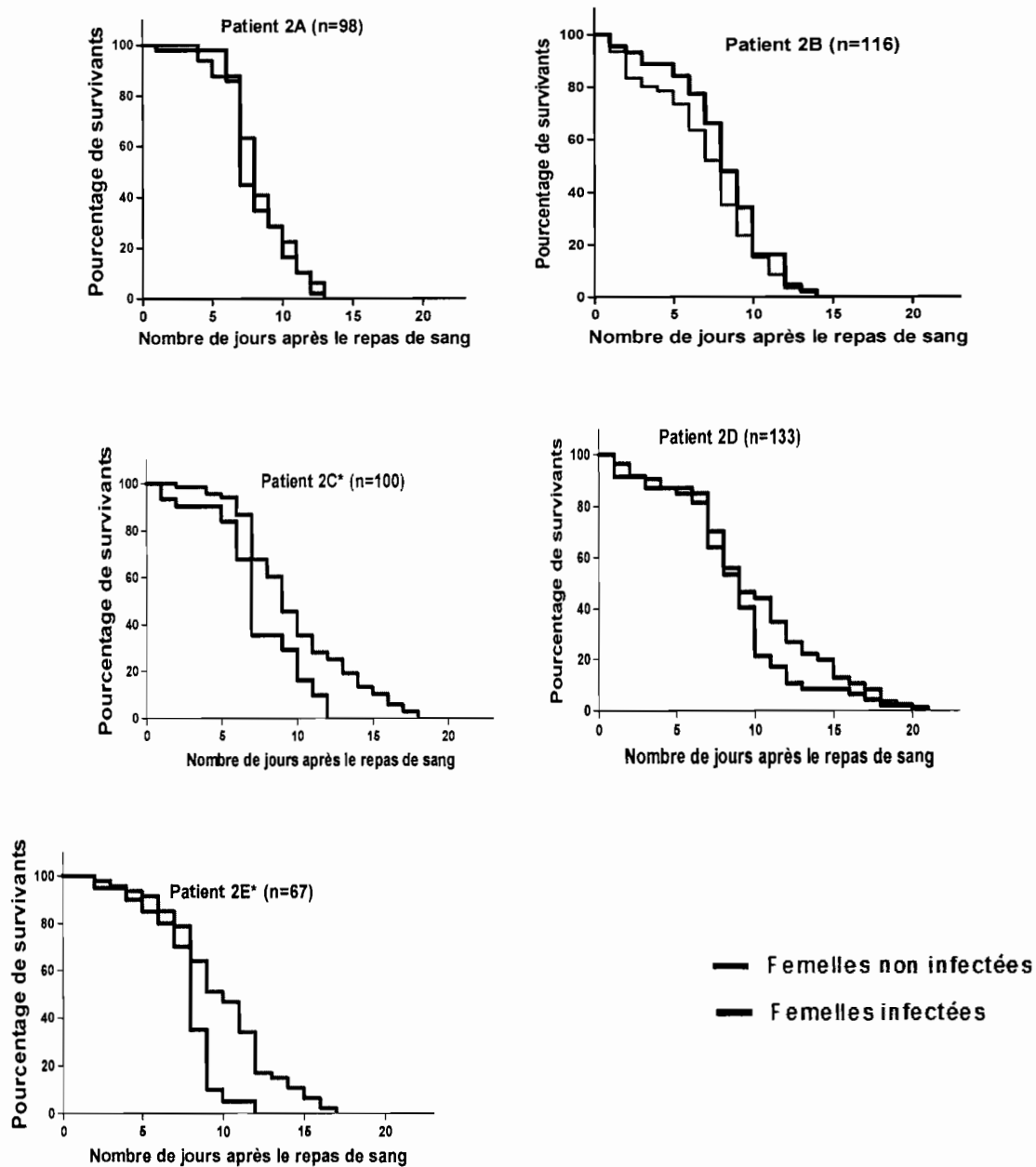


Figure 19 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des femelles infectées versus non infectées (* indique un effet significatif de l'infection sur la survie du moustique)

IV.3.2.3 Effet de l'infection sur la fécondité (Expérience 3)

Pour étudier l'effet de l'infection à *P. falciparum* sur la fécondité d'*An. coluzzii*, nous avons obtenu, 208 femelles infectées, 119 exposées (femelles ayant ingéré du sang infectant mais non infectées) et 338 non infectées à partir de 4 replicats avec 4 donneurs différents de

gamétocytes (nommés 3A, 3B, 3D et 3C). La gamétocytémie était comprise entre 96 à 952 gamétocytes / μl (tableau XI)

✓ Effet de l'infection sur la probabilité pour la femelle de développer au moins un œuf

Le nombre de femelles qui ont ingéré du sang et qui n'ont pas développé des œufs était faible (moins de 10) pour 3 des 4 replicats ; à l'exception du replicat 3A. Nous avons limité l'analyse sur les femelles qui ont pris le sang du patient 3A, dont 73 femelles n'avaient pas pondu sur 131 femelles testées. Ni le statut d'infection ($X^2 = 2,19$; DF = 2, $p = 0,33$), ni la taille de l'aile ($X^2 = 0,88$; DF = 1 , $p = 0,35$) n'ont un impact sur le développement ou non des œufs. Par contre la quantité de sang ingérée par le moustique affecte cette probabilité de pondre au moins un œuf ($X^2=22,58$; DF = 1, $p < 0,001$) : de manière inattendue les femelles qui ont ingéré une grande quantité de sang ont moins de chance de pondre au moins un œuf (odd ratio = 0,8).

✓ Effet de l'infection sur le nombre d'œufs développés

Nous avons ensuite étudié les effets de donneurs de sang, l'infection et leurs interactions avec la taille de l'aile et de la quantité d'hématine excrétée comme covariables sur le développement des œufs. Nous n'avons inclus dans l'analyse que les femelles qui ont développé au moins un œuf.

Pour le replicat 3A, seulement 2 femelles non infectées ont développé au moins un œuf. Nous avons donc exclu ce donneur de cette analyse. Le modèle a révélé un effet très significatif de l'interaction infection * patient (tableau XII) : les individus non infectées avaient le même nombre d'œufs approximativement indépendamment du donneur de sang. Par contre la fécondité des femelles infectées et exposées variait énormément en fonction du donneur de sang : les femelles infectées ou exposées avaient plus d'œufs que les non infectées pour 2 patients (Patients 3B et 3D), tandis que les femelles infectées avaient plus d'œufs que les infectées ou les exposées pour le donneur 3C (figure 20).

La taille des ailes, la quantité d'hématine excrétée affecte le nombre d'œufs développés avec des grandes femelles qui ont ingérées de grande quantité de sang et qui ont pondues plus d'œufs (tableau XII).

Tableau XII: Analyse de l'effet de l'infection, du patient, et leurs interactions, de la quantité d'hématine, et de la taille de l'aile sur la fécondité (condition optimale)

| Source | DF | X ² | P value |
|-------------------|----|----------------|---------|
| Patient | 4 | 32,81 | <,0001* |
| Infection | 2 | 8,61 | 0,2343 |
| Patient*infection | 8 | 20,59 | <,0001* |
| Hématine | 1 | 2,55 | 0,0004* |
| Taille de l'aile | 1 | 7,57 | <,0001* |

(* indique un effet significatif du paramètre sur le nombre développé)

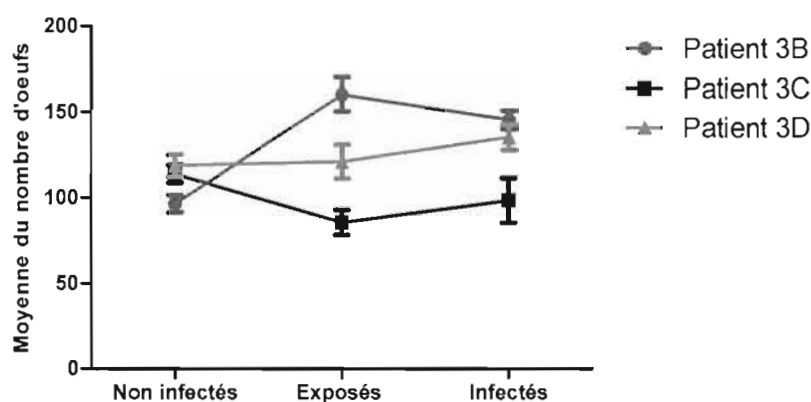


Figure 20 : Nombre d'œufs développés par les femelles nourries en fonction du statut d'infection.

IV.3.3. Étude du coût de l'infection sur la survie du moustique en condition de limitation de glucose (Expérience 4)

Dans cette expérience 4, nous avons étudié l'effet de l'infection sur la survie des moustiques nourris sous les 3 différents régimes de glucose. Nous avons effectué 3 replicats (4A, 4B, 4C) en utilisant le sang de 3 porteurs de gamétocytes différents. Les gamétocytemies variaient de 80 à 600 gamétocytes / μ l (tableau XIII).

Tableau XIII:Récapitulatif des données de l'expérience 4

| Identité patient | Manip | Trophozoites/ μ L) | Gametocytes/ μ L | Nombre de moustiques | Prévalence (IC95%) | Intensité oocystique (IC95%) |
|------------------|-------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|
| 4A | Longévitité | 800 | 600 | 400 | 68,1(61,9-73,9) | 24,1(19,3-29,4) |
| 4B | Longévitité | 1600 | 128 | 337 | 54,1(47,1-61,0) | 8,7(6,0-11,7) |
| 4C | Longévitité | 0 | 80 | 251 | 40(32,5-47,7) | 2,5(1,8-3,4) |

La longévité de 326 femelles infectées a été déterminée versus 500 femelles non infectées et 162 femelles exposées. L'analyse de survie par le modèle de Cox a montré que les paramètres suivants ont un effet significatif sur la survie : le régime de glucose, l'infection et leurs interactions et enfin l'interaction du régime de glucose et patient porteur de gamétocytes. En effet, les femelles infectées et les exposées ont un risque de mortalité respective de 31 et 24% supérieur aux femelles non infectées.

Les individus nourris uniquement avec de l'eau ont une mortalité 5,5 fois supérieure à ceux ayant pris du glucose 2,5% et 9,1 fois supérieure à ceux nourris avec la solution de glucose 5%. Ceux ayant reçu du glucose 2,5% ont une mortalité 1.66 fois supérieure à ceux ayant été nourris au glucose 5% (figure 21).

Les analyses par replicat et par régime de glucose ne montre pas un effet significatif de l'infection pour les individus nourris avec du glucose 5%, 2,5% ; par contre un effet significatif de l'infection est noté pour les individus nourris uniquement avec de l'eau avec pour chaque replicat, une diminution de la survie des infectés par rapport aux non infectés et aux exposés. Par contre, il n'a y avait pas de différences de survie entre les infectés et les exposés % (figure 21 ; tableau XIV).

Tableau XIV: Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, régime de glucose et leurs interactions sur la survie des moustiques en utilisant le Cox Proportional Hazard model (différents régimes de glucose)

| Source | DF | X ² | P value |
|---------------------------|----|----------------|----------|
| Glucose | 2 | 343,34 | <0,0001* |
| Patient | 2 | 2,90 | 0,2345 |
| Infection | 2 | 12,16 | 0,0023* |
| Glucose*Patient | 4 | 12,76 | 0,0125* |
| Glucose *Infection | 4 | 11,64 | 0,0202* |
| Patient*Infection | 4 | 4,24 | 0,3745 |
| Glucose*Patient*Infection | 8 | 10,33 | 0,2424 |

* indique les effets significatifs (P<0,05).

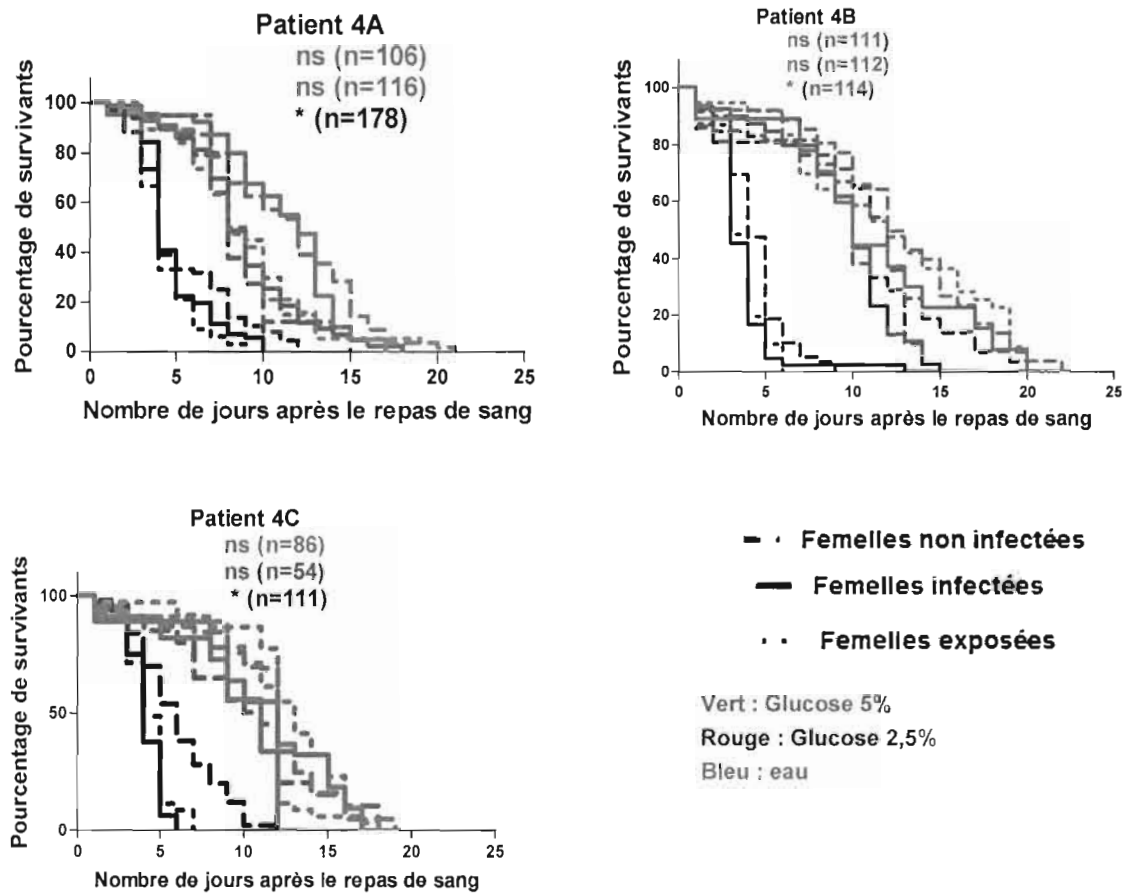


Figure 21 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des femelles infectées versus non infectées sous différents régimes de glucose (* indique un effet significatif de l'infection sur la survie du moustique et ns un effet non significatif).

IV.3.4. Étude du coût de l'infection en condition de stress climatique (Expériences 5 et 6)

Pour tester l'effet de l'infection sur la survie et la fécondité des moustiques dans différentes conditions climatiques, nous avons fait 3 replicats pour la survie et 3 replicats pour la fécondité (tableau XV).

Tableau XV:
Tableau XVI: Récapitulatif des données de l'expérience 5 et 6

| Identité patient | Manip | Parasitémie (trophozoites/ μ L) | Gamétocytémie (gametocytes/ μ L) | Nombre moustiques | Prévalence (IC95%) | Intensité oocystique (IC95%) |
|------------------|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|
| 5A | Longévité | 0 | 152 | 297 | 70,6 (64,1-76,3) | 11,8 (7,4-16,2) |
| 5B | Longévité | 0 | 136 | 297 | 74,2 (66,6-80,5) | 14,6 (2,0-31,1) |
| 5C | Longévité | 4560 | 72 | 224 | 71 (62,4-78,2) | 4,6 (1,9-7,3) |
| 6A | Fécondité | 1360 | 592 | 176 | 92,2 (85,9-95,8) | 60,5 (50,8-70,2) |
| 6B | Fécondité | 0 | 224 | 233 | 81 (72,9-87,1) | 18,7 (14,5-22,8) |
| 6C | Fécondité | 4560 | 72 | 283 | 60,5 (53,3-67,3) | 5,3 (3,8-6,8) |

IV.3.4.1. Effet de l'infection sur la longévité dans différentes conditions climatiques (expérience 5)

Dans cette expérience, nous avons testé l'effet de l'infection sur la survie des moustiques sous 3 conditions climatiques programmées dans 3 chambres climatiques en rotation : février, août et décembre. Un total de 818 moustiques a été inclus dans l'analyse repartis en 3 replicats avec 3 porteurs de gamétocytes différents. La gamétocytémie variait entre 72 et 152 gamétocytes / μ l de sang (tableau XV).

L'analyse de survie par le modèle de Cox n'a pas révélé un effet de l'infection sur la survie, quel que soit le donneur de sang ou la condition climatique (tableau XVI). Par contre les moustiques mis dans les conditions de décembre avaient une longévité supérieure à ceux mis dans les conditions d'août et de février (tableau XVI ; figure 23). La longévité comparative entre les mois de février et août fluctuait : les moustiques mis dans les conditions de février ont une espérance de vie élevée par rapport à ceux d'août pour les replicats 3A et 3C ; le résultat inverse a été obtenu avec le replicat 3B (figure 22). L'analyse ne montre pas l'effet des chambres climatiques sur la survie des moustiques testés (tableau XVI).

Tableau XVII: Résultats de l'analyse statistique de l'effet patient, infection, mois, de la chambre climatique et leurs interactions avec l'infection sur la survie des moustiques en utilisant le Cox Proportional Hazard model

| Source | DF | X ² | P value |
|---------------------|----|----------------|----------|
| Infection | 1 | 0,01 | 0,9217 |
| Mois | 2 | 165,49 | 0,00001* |
| Patient | 2 | 75,67 | 0,00001* |
| Chambre | 2 | 0 | 1,0000 |
| Infection *Mois | 2 | 0,22 | 0,8967 |
| Infection * Patient | 2 | 1,62 | 0,4450 |
| Infection *Chambre | 2 | 5,05 | 0,0802 |
| Mois* Patient | 4 | 0,57 | 0,9661 |

* indique les effets significatifs (P<0,05).

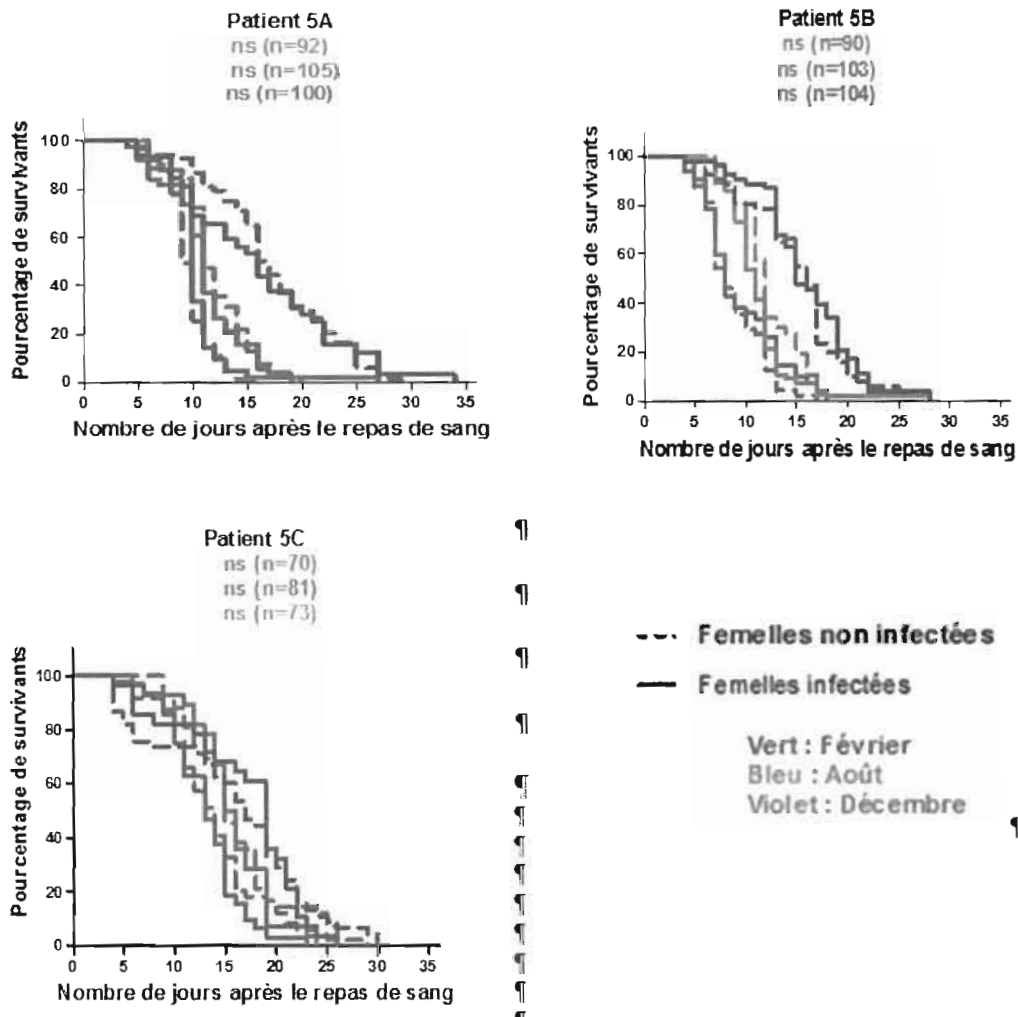


Figure 22 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des femelles infectées versus non infectées sous différentes conditions climatiques (nous indique un effet non significatif de l'infection sur la survie du moustique).

IV.3.4.2 Effet de l'infection et des facteurs climatiques sur la fécondité (Expérience 6)

Le nombre de femelles n'ayant pondu aucun œuf était de 4 chez les infectés et 15 chez les non infectés. À cause cet effectif faible, l'analyse de l'effet de l'infection sur la probabilité de pondre sous les différentes conditions climatiques n'a pas été faite.

Nos analyses se sont focalisées sur l'effet de l'infection, du mois, du donneur de gamétocytes et de leurs interactions sur le nombre d'œufs pondus.

Pour tester cela, un total de 673 moustiques repartis en 3 replicats (6A, 6B et 6C) ont été inclus dans l'analyse (tableau XVI).

Globalement, l'infection n'avait pas d'effet sur le nombre d'œuf développé quel que soit le patient ou le mois. L'interaction infection*Patient s'explique par le fait que pour le replicat 6A, les infectés avaient significativement moins d'œufs que les non infectés (tableau XVII, figure 23).

Tableau XVIII: Analyse de l'effet de l'infection, du patient, du mois et de leurs interactions, sur la fécondité

| Source | DF | X ² | P value |
|-------------------|----|----------------|---------|
| Infection | 1 | 9,855 | 0,9212 |
| Mois | 2 | 12124,472 | 0,0025* |
| Patient | 2 | 2479,116 | 0,2923 |
| Infection*Patient | 2 | 8540,603 | 0,0141* |
| Infection*Mois | 2 | 774,364 | 0,6807 |

* indique les effets significatifs ($P < 0,05$).

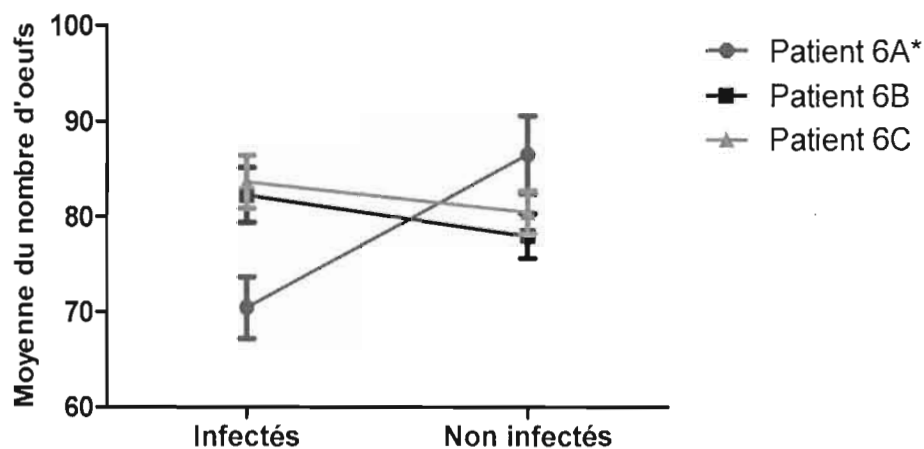


Figure 23 : Nombre moyen d'œufs développés par les femelles en fonction des 3 replicats.

La fécondité variait en fonction du mois : les moustiques semblent développer plus d'œufs durant le mois d'août (replicat 6A, 6C) à l'exception du replicat 6B où ce sont les femelles du mois de février qui avait plus d'œufs (figure 24).

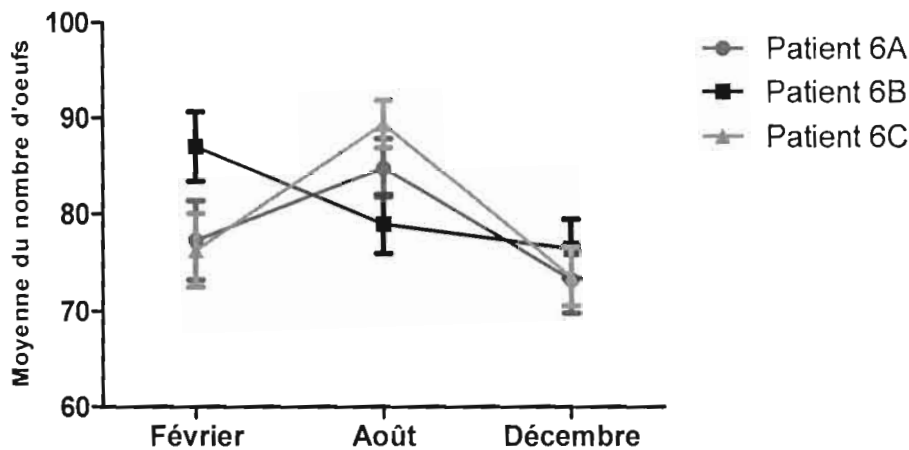


Figure 24 : Nombre moyen d'œufs développés par les femelles en fonction des 3 conditions climatiques.

IV.4.DISCUSSION

Notre étude sur l'effet de l'infection d'*An. gambiae* par *P. falciparum* a cherché à déterminer si la fitness du moustique était affectée par le parasite. Nous avons utilisé un système biologique naturel *An. coluzzii*-*P. falciparum* et un dispositif expérimental qui a permis d'obtenir un grand effectif de moustiques dans des conditions environnementales maîtrisées.

Dans un premier temps, nous avons développé un contrôle négatif adapté à l'étude. En chauffant le sang de porteurs de gamétocytes, nous avons pensé limiter les variations que pourraient engendrer l'utilisation de sang de personnes différentes. Cette technique est utilisée de manière empirique dans le laboratoire depuis des années et a montré une efficacité totale pour l'inactivation de l'infection. En prouvant ici que le chauffage du sang ne modifiait pas les traits d'histoire de vie des moustiques, nous validons cette technique d'obtention de moustiques non infectés à partir du sang infecté. De manière intéressante, nous avons observé une variation importante des traits d'histoires de vie selon les donneurs de sang, en particulier dans cette expérience de validation du contrôle. Ceci souligne d'une part l'intérêt d'utiliser le sang de la même personne entre lots de moustiques « contrôle » et « infecté » et d'autre part suggère que la nature du sang pourrait avoir une influence importante dans la survie et fécondité des femelles *Anopheles*.

Les résultats de notre étude montrent qu'*An. coluzzii* exposés mais non infectés ou infectés avec des souches *P. falciparum* de terrain impose un coût avec une diminution de la survie dépendant de la disponibilité des ressources alimentaires et non du stress environnemental.

Lorsque les moustiques sont nourris avec une concentration suffisante ou intermédiaire de glucose, on notait un effet ou une absence d'effet de l'infection. Les femelles exposées ou infectées avaient une longévité inférieure aux femelles non infectées. Par contre, si aucun repas sucré n'est fourni après le repas de sang, tous les replicats montrent clairement une diminution de la survie chez les femelles infectées ou exposées au parasite. Le stress environnemental semble ne pas être couteux pour le moustique lorsque les ressources alimentaires sont disponibles.

L'effet de l'infection ou l'exposition au sang infecté sur la fécondité étaient plus complexes avec augmentation ou diminution du nombre d'œufs par rapport au contrôle. Ces résultats variables de l'effet du parasite sur la fécondité peut être due à des compromis entre la survie et la fécondité (DAO *et al.* 2010), qui n'a pas pu être mesuré ici en raison du caractère réfractaire d'*An. coluzzii* à pondre dans les tubes individuels.

La présente étude donne des résultats similaires à l'étude de ABOAGYE-ANTWI *et al.* (2010), qui suggérait que *P. falciparum* entraîne une diminution de la survie de son vecteur sous stress hydrique.

Dans leur étude, en utilisant les moustiques capturés dans la nature, les auteurs ne pouvaient pas déterminer des paramètres tels que, l'âge des moustiques, si les moustiques non infectés avaient déjà été exposés à *P. falciparum* ou non, ou d'autres paramètres du cycle de vie des moustiques. En outre, le nombre de moustiques testés dans cette précédente étude était faible en raison des difficultés d'échantillonner un grand nombre d'anophèles infectés dans la nature (ABOAGYE-ANTWI *et al.* 2010).

Dans notre expérience, en utilisant les moustiques provenant de la population locale de vecteurs, mais élevés à l'insectarium, nous avons pu comparer un grand nombre d'individus de même âge, élevés dans des conditions similaires, nourris avec le sang du même donneur.

En investiguant le coût de l'infection sous plusieurs conditions de ressources nutritionnelles et climatiques, nous montrons clairement ici l'effet des paramètres environnementaux sur l'interaction *An. coluzzii*-*P. falciparum*. En effet, l'absence de ressources alimentaires après le repas de sang infectieux améliore la détection du coût de l'infection. Bien que le manque de

ressources alimentaires, tels que le sucre ou le repas sanguin, n'est peut-être pas fréquent dans le milieu naturel, nos résultats mettent en évidence l'augmentation de la sensibilité des moustiques infectés ou exposé au stress par rapport aux non infectés et suggérant une compétition pour les ressources alimentaires entre l'hôte invertébré et les parasites. Nos expériences réalisées dans des conditions d'insectarium sont susceptibles de minimiser les coûts d'infection. En effet, dans la nature, les moustiques sont susceptibles de subir plusieurs types de stress tels que le comportement défensif des hôtes, la prédation, la dessiccation, l'infection microbienne multiple ou l'exposition aux pesticides, ce qui peut accroître les coûts d'infection dans le domaine.

Nos résultats ont montré que les femelles infectées, mais aussi les femelles qui ont été exposées aux parasites mais n'ayant pas développés de parasites subissent un coût sur la survie. Cela suggère que les femelles exposées à des gamétocytes infectieuses ont activé une réponse immunitaire efficace pour éliminer l'infection, mais aussi que cette résistance était coûteuse. Ceci est cohérent avec les études antérieures, qui ont montré que la réponse immunitaire chez les insectes, notamment les moustiques, est très coûteuse (AHMED et HURD 2006; SCHWARTZ et KOELLA 2004).

En utilisant la technique de chauffage de sang pour inactiver ou tuer les gamétocytes, nous obtenons notre lot de moustiques non infectés. Cependant, on ne peut pas exclure que la présence de parasites dans le sang même si inactivé, ou des antigènes parasitaires peut déclencher une réponse immunitaire. Dans ce cas, les moustiques contrôles, aurait subi un coût, minimiserait les effets de l'exposition et de l'infection mesurés, lorsque l'on compare les moustiques exposés et infectés aux contrôles. Ceci suggère que notre protocole pourrait avoir sous-estimé le coût de l'infection ou de l'exposition à *P. falciparum* chez *An. coluzzii*.

Dans nos expériences, les différents isolats parasites ont produit différentes intensités d'infection. Le nombre de parasites n'a cependant pas été inclus dans les analyses parce que l'infection a été mesurée à différents temps après le repas sanguin, ce qui ne permet pas une comparaison en raison de grandes variations dans le nombre de parasites au cours de la sporogonie (DAWES *et al.* 2009). Toutefois, le nombre moyen d'oocystes entre J4 et J7 post repas de sang donne une intensité de l'infection moyenne (tableau XIII). Nous n'avons pas observé un effet évident de l'intensité de l'infection sur la survie : par exemple pour les expériences 3C, 3E ou 4A pour lesquelles une infection ou une exposition a eu des effets

significatifs sur la survie, des intensités d'infection étaient intermédiaire (nombre moyen d'oocystes par l'intestin moyen de 7,0 à 29,4) alors que dans cette étude le nombre moyen d'oocystes dans notre étude variait entre 2,0 à 201,0. Par contre, dans l'expérience 3A, une intensité d'infection beaucoup plus élevée, avec un nombre moyen d'oocystes de 201 (166,8 à 237,7) et une grande proportion de moustiques de cette expérience n'ont pas développé d'œufs. Des expériences supplémentaires avec de fortes gamétocytemies seraient nécessaires pour vérifier si les intensités d'infection élevée ont un effet sur le nombre d'œufs développés. L'analyse du nombre d'œufs développés chez les femelles qui avait au moins un œuf a montré, une diminution de la fécondité chez des femelles qui avaient une faible intensité oocystique (replicat 3C), alors que les intensités d'infection plus élevées étaient associées à une augmentation du nombre d'œufs développés (replicats 3B et 3D). Cependant, nous ne pouvons pas conclure si l'intensité de l'infection a été un facteur déterminant de l'effet de l'infection sur la fitness. En effet, d'autres paramètres que l'intensité de l'infection peuvent varier entre isolats de parasites et ne peuvent pas être distingués. Par exemple, les différents résultats obtenus à partir des replicats en utilisant différents échantillons de sang peuvent être expliquées par des différences génétiques entre les isolats de parasites, y compris la multiplicité d'infection.

En affectant la survie de son vecteur, *P. falciparum* peut exercer une pression sélective importante. Le taux d'infection de la population vectrice sur le terrain est donc un déterminant important de la pression sélective. Les indices sporozoïtiques dans les populations de vecteurs naturels sont à peine au-dessus de 5% (DRAKELEY *et al.* 2003). Cela donne à penser intuitivement que seule une petite proportion de moustiques sont en contact avec les parasites. Toutefois, en tenant compte du taux de survie quotidienne (COSTANTINI *et al.* 1996), la durée de développement sporogonique (VAUGHAN *et al.* 1992), et l'existence d'une résistance à l'infection (NIARE *et al.* 2002; RIEHLE *et al.* 2006), la proportion de moustiques qui ingèrent les parasites infectieux peut être important dans les zones endémiques. Par contre, en raison de la longue durée du développement sporogonique de *P. falciparum* comparativement à la durée de vie des moustiques, la diminution de la longévité des moustiques peut influencer considérablement sur la capacité vectorielle (SMITH et MCKENZIE 2004). Ce qui suggère que le parasite est soumis à une forte pression sélective pour ne pas réduire la survie de son hôte au bénéfice de sa transmission. Ceci contraste avec la diminution de la survie que nous avons

observée avec les moustiques infectés par rapport à ceux non infectés. Toutes ses observations suggèrent que le coût de l'infection à *P. falciparum* sur son vecteur naturel peut avoir une grande importance dans les interactions moustiques-parasites.

Dans nos expériences, nous avons observé un fort effet donneur de gamétocytes dans la survie et surtout dans les expériences de validation du contrôle, les moustiques gorgés sur le sang du patient IC ont montré une survie très inférieure aux autres. Ces différences peuvent être dues aux conditions expérimentales du jour (lot de moustiques, conditions particulières non contrôlées à l'insectarium) ou à la qualité du sang. De manière générale, en épidémiologie d'agents infectieux et maladie à transmission vectorielle, une minorité d'individus est responsable d'une grande proportion de la transmission (WOOLHOUSE et ANDERSON 1997). Connaître les paramètres chez l'homme, dont des caractéristiques du sang par exemple, qui favorisent la survie des moustiques vecteurs (et donc leur capacité vectorielle) pourraient permettre d'identifier les personnes les plus impliquées dans la transmission du paludisme et de les cibler plus spécifiquement lors de campagnes de contrôle.

IV.5.CONCLUSION PARTIELLE

En conclusion, nous avons mis en évidence un coût d'exposition et d'infection par des isolats de terrain de *P. falciparum* sur *An. coluzzii*, implémenté au laboratoire à partir de souches locales de terrain. Quand le repas sucré était disponible et dans de conditions climatiques optimales le repas de sang infectieux, l'effet de l'infection ou de l'exposition sur la survie (durée de vie) et la fécondité dépendait du donneur de gamétocytes. Dans des conditions de stress nutritionnel surtout, sans aucune ressource énergétique après le sang infectieux, la survie a été réduite pour les moustiques exposés et infectés. Nous fournissons donc ici une preuve solide du rôle de l'environnement dans la réduction de la survie des moustiques exposés à l'infection, dans le couple *An. gambiae*-*P. falciparum*, système le plus important de la transmission du paludisme humain. L'identification des mécanismes impliqués dans le coût de l'infection pourrait avoir des implications cruciales dans la lutte contre le paludisme en mettant en évidence les faiblesses spécifiques des vecteurs du paludisme infectés qui aideraient à la conception des mesures de lutte antivectorielle ciblant spécifiquement les moustiques infectés.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

L'effort de contrôle du paludisme peut être orienté contre le parasite chez l'Homme et chez le vecteur. Les mesures de lutte contre le paludisme (chimiothérapie, l'utilisation des insecticides) ont montré leurs limites et doivent s'accompagner de stratégies alternatives. Récemment, il est admis que l'on peut cibler le parasite chez le moustique. Les études fondamentales d'interactions et de processus de coévolution entre les populations naturelles de vecteurs et de parasites est un préalable à l'élaboration d'outils de lutte contre le parasite chez le vecteur (GANDON *et al.* 2002b).

Dans un premier temps, nous avons comparé la susceptibilité à l'infection des 3 espèces majeures du complexe *An. gambiae* dans la transmission d'isolats de terrain de parasites, *P. falciparum*. Cette étude a révélé, qu'*An. coluzzii* a de fortes intensités en oocystes comparativement à *An. gambiae* et *An. arabiensis*. Par contre, il n'y avait pas de différences entre les 3 souches en termes de prévalence de l'infection. Notre étude d'épidémiologie moléculaire de l'infection à *P. falciparum* chez le vecteur visait à identifier les facteurs pouvant conditionner la diversité génotypique des populations parasitaires chez le vecteur donc la transmission chez l'Homme. La structuration des génotypes parasitaires était identique chez les 3 espèces, suggérant que les 3 espèces transmettent les mêmes génotypes de parasites.

Le 2^e volet de notre étude a consisté à étudier le coût de l'infection et de la résistance à *P. falciparum* chez *An. coluzzii*. La réponse à cette question est fondamentale dans la compréhension des forces évolutives dans les interactions *Anopheles-Plasmodium*. Tout d'abord, nous avons développé un contrôle négatif adapté à l'étude par chauffage du sang du porteur de gamétocytes. Cette technique s'est révélée efficace dans l'inactivation des parasites et n'avait aucun impact sur les traits de vie du moustique. En utilisant, donc cette technique, nous avons pu comparer la longévité, la fécondité des moustiques infectés versus non infectés, nourris à partir du sang du même porteur de gamétocytes sous différentes conditions environnementales. Les résultats ont montré que *P. falciparum* diminue l'espérance de vie et souvent la fécondité de son vecteur surtout dans les conditions stressantes, en présence d'une

alimentation limitée en sucre. Ces résultats suggèrent donc, que le coût de l'infection est lié aux conditions environnementales et probablement aux génotypes de parasites.

PERSPECTIVES

« Chaque publication scientifique ne sert qu'à poser 10, 20 questions. Chaque découverte scientifique est passionnante parce qu'elle ouvre un univers de questions. Si les questions vous angoissent, ne soyez pas scientifique. » Boris Cyrulnik, Médecin, éthologue, neurologue et psychiatre français (1937-)

À la suite de notre étude, de nombreuses questions restent cruciales dans la compréhension des mécanismes des interactions *Anopheles-Plasmodium* et la mise en place d'un contrôle antipalustre efficace.

L'expertise acquise au cours de cette thèse, nous permettra d'évaluer les stratégies innovantes de moustiques génétiquement modifiés en cours afin de sélectionner les plus efficaces dans le temps. En effet, plusieurs effecteurs sont ciblés pour l'élaboration des moustiques transgéniques, ainsi que plusieurs types d'anticorps ou de médicaments bloquant la transmission sont développés et en cours d'expérimentation. La question fondamentale est : lesquelles des stratégies auront un avantage sélectif dans la transmission ? Pour les moustiques transgéniques, il faudra que le transgène soit le moins coûteux en termes de fitness. Pour les vaccins et médicaments « altruistes », les molécules, en plus d'être efficaces dans la « transmission blocking », pourront avoir un effet sur la longévité des vecteurs, le comportement trophique (agressivité, quantité de sang ingérée,...), et/ou la fécondité (nombre d'œufs pondus, la viabilité de la descendance, l'accouplement), en général sur la valeur sélective des vecteurs. Ces paramètres devront être évalués. En effet, les réponses à ces questions fondamentales permettront de faire le choix des « stratégies durables, intégrées et écologiques ». D'autre part, les anophèles sont vecteurs d'autres pathogènes connus, ayant une grande importance dans la santé publique dans les régions tropicales. On peut citer en exemple, les filaires lymphatiques. La mise en place d'une stratégie efficace dans le contrôle du paludisme, mais augmentant la densité vectorielle ou la longévité des vecteurs pourrait compromettre les efforts de lutte contre ces pathologies ou poser des problèmes de nuisance due à la piqûre des anophèles. Enfin, les études de fitness nous ouvrent des perspectives

intéressantes permettant de comprendre l'épidémiologie de la transmission du paludisme dans un foyer « pluripathologique » tel le cas du Burkina Faso. Les études sur les interactions entre le paludisme et certaines pathologies chroniques (diabète, hypertension, hyperlipidémies, ...) pourront être élucidées. D'ailleurs, GOUAGNA *et al.* (2010) ont montré l'importance des individus ayant des traits hémoglobiniques falciformes CC dans la transmission. Dans notre étude, nous avons vu un effet significatif du donneur de sang sur la fécondité et la longévité. On pourrait donc investiguer sur les traits particuliers (diabète, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, maladies bactériennes, virales et autres parasitoses,...) pouvant impacter sur la capacité vectorielle donc la transmission. La connaissance des groupes particuliers « personnes épidémiologiquement dangereuses » permettra le développement des stratégies simples de contrôle de la transmission dans un contexte de luttes intégrées contre les pathologies. Les études dans les chambres climatiques permettront aussi de développer des protocoles d'études d'adaptation des vecteurs dans un contexte de changements climatiques, donc des études « d'écologie climatique » de la transmission.

La compétence vectorielle des souches sensibles et résistantes aux insecticides (Acel, kdr, enzymatiques) du Burkina Faso, des moustiques transgéniques en fonction de la cible modifiée devraient être étudiée. Nos prochains axes de recherches intégreront les études sur la longévité, la préférence trophique, la durée de la sporogonie, la fécondité des populations d'*An. coluzzii*, d'*An. gambiae* et d'*An. arabiensis* et des autres populations vectrices locales du Burkina Faso. En effet, la longévité différentielle « impacte » sur l'espérance de vie des populations vectrices majeures donc d'assurer la totalité du développement du parasite qui varie de deux à cinq semaines en fonction de la température et de l'espèce parasitaire. Des différences de longévité des populations de vecteurs peuvent être à l'origine de différences de portage d'espèces parasitaires entre les espèces vectrices. Ainsi les espèces de parasites à sporogonie longue, comme *P. malariae* (DE BARROS *et al.* 2011), seraient transmises préférentiellement par des espèces de vecteur à longévité importante. Également, une longévité importante du vecteur lui assurera donc une efficacité maximale dans la transmission.

Nos études concerneront également la diversité interspécifique et intraspécifique des populations de parasites transmis et de l'effet de l'espèce vectorielle dans l'évolution de cette diversité surtout en termes de marqueurs moléculaires de chimiorésistances. En effet, si bien

même que nous n'avons pas trouvé de diversité de transmission génotypique entre les différentes espèces anophéliennes en utilisant les marqueurs microsatellites, il sera nécessaire de poursuivre l'étude de transmission sélective des populations plasmodiale en utilisant d'autres marqueurs. Les techniques de génotypage microsatellite est facile à mettre en œuvre sur les populations naturelles de parasites, mais elles sont cependant soumises à une étape aléatoire d'amplification à la PCR des allèles minoritaires. En effet, des études ont montré que la détection du nombre de génotypes de *P. falciparum* coinfectants était densité-dépendante utilisant des marqueurs microsatellites (FARNERT *et al.* 2001; MAYOR *et al.* 2007).

À la suite de nos travaux, également une des questions logiques que l'on pourrait se poser est l'effet sur la fitness de l'anophèle, des infections d'espèces parasitaires multiples. Notre étude et la plupart des recherches de terrain sont orientées jusqu'à présent sur le seul complexe *Anopheles gambiae*. Or, l'importance épidémiologique considérable des autres espèces vectrices dans certains faciès environnementaux, n'est pas à négliger. Les vecteurs tels que, *An. funestus* assurent la transmission au cours des saisons sèches dans les zones à transmission saisonnière (FONTENILLE *et al.* 1997). Les études de fitness et de compétence vectorielle devront intégrer ces espèces vectrices.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOAGYE-ANTWI F., GUINDO A., TRAORE A. S., HURD H., COULIBALY M. *et al.*, 2010. Hydric stress-dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild-caught *Anopheles gambiae* female mosquitoes. *Malar J* **9**: 243.
- ABOAGYE-ANTWI F. et TRIPET F., 2010. Effects of larval growth condition and water availability on desiccation resistance and its physiological basis in adult *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Malar J* **9**: 225.
- AHMED A. M. et HURD H., 2006. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes Infect* **8**: 308-315.
- AHMED A. M., MAINGON R., ROMANS P. et HURD, 2001. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. *Insect Mol Biol* **10**: 347-356.
- AGNANDJI, S. T., B. LELL, S. S. SOULANOUDJINGAR, J. F. FERNANDES, B. P. ABOSSOLO et al., 2011 First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* **365**: 1863-1875.
- ALAVI Y., ARAI M., MENDOZA J., TUFET-BAYONA M., SINHA R. *et al.*, 2003. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol* **33**: 933-943.
- ALONSO P. L., BROWN G., AREVALO-HERRERA M., BINKA F., CHITNIS C. *et al.*, 2011. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* **8**: e1000406.
- ALOUT H., NDAM N. T., SANDEU M. M., DJEGBE I., CHANDRE F. *et al.*, 2013. Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of for Field Isolates. *PLoS One* **8**: e63849.
- ALPHEY L., 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1243-1247.
- ALPHEY L., BEARD C. B., BILLINGSLEY P., COETZEE M., CRISANTI A. *et al.*, 2002. Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* **298**: 119-121.
- ALPHEY, N., BONSALE M. B. et ALPHEY L., 2011. Modeling resistance to genetic control of insects. *J Theor Biol* **270**: 42-55.
- ALY, A. S. et MATUSCHEWSKI K., 2005. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**: 225-230.
- AMBROISE-THOMAS, P., 1997. Vaccination against malaria. Disappointments and hopes. *Bull Acad Natl Med* **181**: 1637-1648; discussion 1648-1650.
- ANDERSON R. A., KNOLS B. G. et KOELLA J. C., 2000a. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitology* **120** (Pt 4): 329-333.
- ANDERSON T. J., HAUBOLD B., WILLIAMS J. T., ESTRADA-FRANCO J. G., RICHARDSON L. *et al.*, 2000b. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* **17**: 1467-1482.
- ANDERSON T. J., SU X. Z., BOCKARIE M., LAGOG M. et DAY K. P., 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* **119** (Pt 2): 113-125.
- ANNAN Z., DURAND P., AYALA F. J., ARNATHAU C., AWONO-AMBENE P. *et al.*, 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**: 7987-7992.
- BALDET T., DIABATE A. et GUIGUEMDE T. R., 2003. Malaria transmission in 1999 in the rice field area of the Kou Valley (Bama), (Burkina Faso). *Sante* **13**: 55-60.
- BARILLAS-MURY, C., et KUMAR S., 2005. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol* **7**: 1539-1545.

- BATON L. A. et RANFORD-CARTWRIGHT L. C., 2004. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology* **129**: 663-676.
- BAYOH M. N., THOMAS C. J. et LINDSAY S. W., 2001. Mapping distributions of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* in West Africa using climate data. *Med Vet Entomol* **15**: 267-274.
- BEARD C. B., CORDON-ROSALES C. et DURVASULA R. V., 2002. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol* **47**: 123-141.
- BEIER J. C., COPELAND R., OYARO C., MASINYA A., ODAGO W. O. et al., 1990. *Anopheles gambiae* complex egg-stage survival in dry soil from larval development sites in western Kenya. *J Am Mosq Control Assoc* **6**: 105-109.
- BIAN G., JOSHI D., DONG Y., LU P., ZHOU G. et al., 2013. Wolbachia invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science* **340**: 748-751.
- BILLKER O., DECHAMPS S., TEWARI R., WENIG G., FRANKE-FAYARD B. et al., 2004. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**: 503-514.
- BILLKER O., LINDO V., PANICO M., ETIENNE A. E., PAXTON T. et al., 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**: 289-292.
- BILLKER O., SHAW M. K., MARGOS G. et 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. et SINDEN R. E., 2009. *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. *Vaccine* **27**: 5187-5194.
- BLANDIN S. et LEVASHINA E. A., 2004. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* **16**: 16-20.
- BLANDIN S., MOITA L. F., KOCHER T., WILM M., KAFATOS F. C. et al., 2002. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* **3**: 852-856.
- BLANDIN S. A., WANG-SATTLER R., LAMACCHIA M., GAGNEUR J., LYCETT G. et al., 2009. Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science* **326**: 147-150.
- BOETE C., 2005. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol* **21**: 445-447.
- BOGREAU H., RENAUD F., BOUCHIBA H., DURAND P., ASSI S. B. et al., 2006. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg* **74**: 953-959.
- BOISSIERE A., ARNATHAU C., DUPERRAY C., BERRY L., LACHAUD L. et al., 2012. Isolation of *Plasmodium falciparum* by flow-cytometry: implications for single-trophozoite genotyping and parasite DNA purification for whole-genome high-throughput sequencing of archival samples. *Malar J* **11**: 163.
- BOISSIERE A., GIMONNEAU G., TCHIOFFO M. T., ABATE L., BAYIBEKI A. et al., 2013. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. *PLoS One* **8**: e54820.
- BOUSEMA T., SUTHERLAND C. J., CHURCHER T. S., MULDER B., GOUAGNA L. C. et al., 2011. Human immune responses that reduce the transmission of *Plasmodium falciparum* in African populations. *Int J Parasitol* **41**: 293-300.
- BRANCH O. H., TAKALA S., KARIUKI S., NAHLEN B. L., KOLCZAK M. et al., 2001. *Plasmodium falciparum* genotypes, low complexity of infection, and resistance to subsequent malaria in participants in the Asembo Bay Cohort Project. *Infect Immun* **69**: 7783-7792.

- BREMAN J. G. et BRANDLING-BENNETT A. D., 2011. The challenge of malaria eradication in the twenty-first century: research linked to operations is the key. *Vaccine* **29 Suppl 4**: D97-103.
- BRIEGEL H. et HORLER E., 1993. Multiple blood meals as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **30**: 975-985.
- CAPONE A., RICCI I., DAMIANI C., MOSCA M., ROSSI P. *et al.*, 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors* **6**: 182.
- CARNEVALE P., et M. MOLINIER, 1980. The gonotrophic cycle and the daily rhythm of bites of *Anopheles gambiae* (Giles) 1902 and *Anopheles nili* (Theobald), 1904. *Parassitologia* **22**: 173-185.
- CARNEVALE P., ROBERT V., BOUDIN C., HALNA J. M., PAZART L. *et al.*, 1988. Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **81**: 832-846.
- CARNEVALE P., P. GUILLET, V. ROBERT, D. FONTENILLE, J. DOANNIO *et al.*, 1999. Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. *Parassitologia* **41**: 273-276.
- CARNEVALE P., ROBERT V., CORBEL V., FONTENILLE D., GARROS C. *et al.*, 2009. Les anophèles. Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD Editions Collection DIDACTIQUES: 391.
- CARTER, R., 2001. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**: 2309-2314.
- CASTILLO J. C., ROBERTSON A. E. et STRAND M. R., 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 891-903.
- CATTERUCCIA F., CRISANTI A. et WIMMER E. A., 2009. Transgenic technologies to induce sterility. *Malar J* **8 Suppl 2**: S7.
- CATTERUCCIA F., NOLAN T., LOUKERIS T. G., BLASS C., SAVAKIS C. *et al.*, 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**: 959-962.
- CHANDRE F., MANGUIN S., BRENGUES C., DOSSOU YOVO J., DARRIET F. *et al.*, 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* **41**: 319-322.
- CHARLWOOD J. D., 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**: 391-398.
- CHARLWOOD J. D., PINTO J., SOUSA C. A., MADSEN H., FERREIRA C. *et al.*, 2002. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Sao Tome Island. *J Vector Ecol* **27**: 178-183.
- CHAVSHIN A. R., OSHAGHI M. A., VATANDOOST H., POURMAND M. R., RAEISI A. *et al.*, 2012. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop* **121**: 129-134.
- CHEGE G. M. et BEIER J. C., 1990. Effect of *Plasmodium falciparum* on the survival of naturally infected afrotropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **27**: 454-458.
- CHIMA R. I., GOODMAN C. A. et MILLS A., 2003. The economic impact of malaria in Africa: a critical review of the evidence. *Health Policy* **63**: 17-36.
- CHRISTIE M., 1958. Improved collection of anopheline eggs and analysis of oviposition behaviour in *A. gambiae*. *J Trop Med Hyg* **61**: 282-286.
- CHRISTOPHIDES G. K., VLACHOU D. et F. C. KAFATOS, 2004. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev* **198**: 127-148.
- CHURCHER T. S., BLAGBOROUGH A. M., DELVES M., RAMAKRISHNAN C., KAPULU M. C. *et al.*, 2012. Measuring the blockade of malaria transmission--an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int J Parasitol* **42**: 1037-1044.

- CIRIMOTICH C. M., DONG Y., GARVER L. S., SIM S. et DIMOPOULOS G., 2010. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol* **34**: 387-395.
- CIRIMOTICH C. M., RAMIREZ J. L. et DIMOPOULOS G., 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* **10**: 307-310.
- COETZEE M., HUNT R. H., WILKERSON R., DELLA TORRE A., COULIBALY M. B. *et al.*, 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* **3619**: 246-274.
- COHUET A., KRISHNAKUMAR S., SIMARD F., MORLAIS I., KOUTSOS A. *et al.*, 2008. SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. *BMC Genomics* **9**: 227.
- COHUET A., OSTA M. A., MORLAIS I., AWONO-AMBENE P. H., MICHEL K. *et al.*, 2006. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep* **7**: 1285-1289.
- COLLINS F. H., MENDEZ M. A., RASMUSSEN M. O., MEHAFFEY P. C., BESANSKY N. J. *et al.*, 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* **37**: 37-41.
- COLLINS F. H., SAKAI R. K., VERNICK K. D., PASKEWITZ S., SEELEY D. C. *et al.*, 1986. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* **234**: 607-610.
- COLLINS W. E. et CONTACOS P. G., 1979. Infection and transmission studies with *Plasmodium simiovale* in the *Macaca mulatta* monkey. *J Parasitol* **65**: 609-612.
- COLUZZI M., 1984. Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull World Health Organ* **62 Suppl**: 107-113.
- COLUZZI M., 1993. Advances in the study of Afrotropical malaria vectors. *Parassitologia* **35 Suppl**: 23-29.
- COLUZZI M., SABATINI A., DELLA TORRE A., DI DECO M. A. et PETRARCA V., 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* **298**: 1415-1418.
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. et DI DECO M. A., 1977. Behavioural divergences between mosquitoes with different inversion karyotypes in polymorphic populations of the *Anopheles gambiae* complex. *Nature* **266**: 832-833.
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. et DI DECO M. A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**: 483-497.
- COSTANTINI C., AYALA D., GUELBEOGO W. M., POMBI M., SOME C. Y. *et al.*, 2009. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol* **9**: 16.
- COSTANTINI C., LI S. G., DELLA TORRE A., SAGNON N., COLUZZI M. *et al.*, 1996. Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a west African Sudan savanna village. *Med Vet Entomol* **10**: 203-219.
- COX-SINGH J., DAVIS T. M., LEE K. S., SHAMSUL S. S., MATUSOP A. *et al.*, 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* **46**: 165-171.
- DA D. F., DIXIT S., SATTABONKOT J., MU J., ABATE L. *et al.*, 2013. Anti-Pfs25 human plasma reduces transmission of *Plasmodium falciparum* isolates that have diverse genetic backgrounds. *Infect Immun* **81**: 1984-1989.
- DABIRE K. R., DIABATE A., AGOSTINHO F., ALVES F., MANGA L. *et al.*, 2008. Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (kdr) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot* **101**: 119-123.

- DABIRE K. R., DIABATE A., NAMONTOUGOU M., DJOGBENOU L., KENGNE P. *et al.*, 2009. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Int Health* **14**: 396-403.
- DABIRE R. K., NAMONTOUGOU M., SAWADOGO S. P., YARO L. B., TOE H. K. *et al.*, 2012. Population dynamics of *Anopheles gambiae s.l.* in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides. *Parasit Vectors* **5**: 127.
- DAO A., KASSOGUE Y., ADAMOU A., DIALLO M., YARO A. S. *et al.*, 2010. Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **47**: 769-777.
- DARRIET F., 1991. Field trial of the efficacy of 3 pyrethroids in the control of malaria vectors. *Parassitologia* **33**: 111-119.
- DAWES E. J., ZHUANG S., SINDEN R. E. et BASANEZ M. G., 2009. The temporal dynamics of *Plasmodium* density through the sporogonic cycle within *Anopheles* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**: 1197-1198.
- DAY K. P., KOELLA J. C., NEE S., GUPTA S. et READ A. F., 1992. Population genetics and dynamics of *Plasmodium falciparum*: an ecological view. *Parasitology* **104 Suppl**: S35-52.
- DE BARROS F. S., HONORIO N. A. et ARRUDA M. E., 2011. Survivorship of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in relation with malaria incidence in the Brazilian Amazon. *PLoS One* **6**: e22388.
- DE MEEUS T. et GOUDET J., 2007. A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *Infect Genet Evol* **7**: 731-735.
- DELLA TORRE A., COSTANTINI C., BESANSKY N. J., CACCONE A., PETRARCA V. *et al.*, 2002. Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. *Science* **298**: 115-117.
- DELLA TORRE A., FANELLO C., AKOGBETO M., DOSSOU-YOVO J., FAVIA G. *et al.*, 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae s.s.* in West Africa. *Insect Mol Biol* **10**: 9-18.
- DETINOVA T. S., 1955. Fertility of *Anopheles maculipennis*. *Med Parazitol (Mosk)* **24**: 6-11.
- DIA, I., DIOP T., RAKOTOARIVONY I., KENGNE P. et 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.
- DIABATE A., BALDET T., BRENGUES C., KENGNE P., DABIRE K. R. *et al.*, 2003a. Natural swarming behaviour of the molecular M form of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**: 713-716.
- DIABATE A., BALDET T., CHANDRE C., DABIRE K. R., KENGNE P. *et al.*, 2003b. KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *J Med Entomol* **40**: 195-198.
- DIABATE A., BALDET T., CHANDRE F., DABIRE K. R., SIMARD F. *et al.*, 2004. First report of a kdr mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa. *J Am Mosq Control Assoc* **20**: 195-196.
- DIABATE A., DAO A., YARO A. S., ADAMOU A., GONZALEZ R. *et al.*, 2009. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci* **276**: 4215-4222.
- DIATTA M., SPIEGEL A., LOCHOUARN L. et D. FONTENILLE, 1998. Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 270-272.
- DINGLASAN R. R., KALUME D. E., KANZOK S. M., GHOSH A. K., MURATOVA O. *et al.*, 2007. Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13461-13466.
- DINPARAST DJADID N., JAZAYERI H., RAZ A., FAVIA G., RICCI I. *et al.*, 2011. Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *PLoS One* **6**: e28484.

- DIOUF I., DEME A., NDIONE J. A., GAYE A. T., RODRIGUEZ-FONSECA B. *et al.*, 2013. Climate and health: observation and modeling of malaria in the Ferlo (Senegal). *C R Biol* **336**: 253-260.
- DJOGBENOU L., CHANDRE F., BERTHOMIEU A., DABIRE R., KOFFI A. *et al.*, 2008. Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS One* **3**: e2172.
- DONG Y., AGUILAR R., XI Z., WARR E., MONGIN E. *et al.*, 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* **2**: e52.
- DONG Y., DAS S., CIRIMOTICH C., SOUZA-NETO J. A., MCLEAN K. J. *et al.*, 2011. Engineered *Anopheles* immunity to *Plasmodium* infection. *PLoS Pathog* **7**: e1002458.
- DRAKELEY C., SCHELLENBERG D., KIHONDA J., SOUSA C. A., AREZ A. P. *et al.*, 2003. An estimation of the entomological inoculation rate for Ifakara: a semi-urban area in a region of intense malaria transmission in Tanzania. *Trop Med Int Health* **8**: 767-774.
- DUCHEMIN J. B., TSY J. M., RABARISON P., ROUX J., COLUZZI M. *et al.*, 2001. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Med Vet Entomol* **15**: 50-57.
- DUFFY P. E. et KASLOW D. C., 1997. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun* **65**: 1109-1113.
- DUGASSA S., LINDH J. M., OYIEKE F., MUKABANA W. R., LINDSAY S. W. *et al.*, 2013. Development of a gravid trap for collecting live malaria vectors *Anopheles gambiae* s.l. *PLoS One* **8**: e68948.
- EPPLER C., MELMER G., SIEDLACZCK I., SCHWAIGER F. W., MAUELER W. *et al.*, 1993. On the essence of "meaningless" simple repetitive DNA in eukaryote genomes. *EXS* **67**: 29-45.
- ESNAULT C., BOULESTEIX M., DUCHEMIN J. B., KOFFI A. A., CHANDRE F. *et al.*, 2008. High genetic differentiation between the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Africa. *PLoS One* **3**: e1968.
- FANE M., CISSE O., TRAORE C. S. et SABATIER P., 2012. *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroid-treated nets in cotton versus rice areas in Mali. *Acta Trop* **122**: 1-6.
- FANG J. et MCCUTCHAN T. F., 2002. Thermoregulation in a parasite's life cycle. *Nature* **418**: 742.
- FARNERT A., AREZ A. P., BABIKER H. A., BECK H. P., BENITO A. *et al.*, 2001. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 225-232.
- FAVIA G., DELLA TORRE A., BAGAYOKO M., LANFRANCOTTI A., SAGNON N. *et al.*, 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* **6**: 377-383.
- FAVIA G., LANFRANCOTTI A., SPANOS L., SIDEN-KIAMOS I. et LOUIS C., 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* **10**: 19-23.
- FAVIA G. et LOUIS C., 1999. Molecular identification of chromosomal forms of *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Parassitologia* **41**: 115-118.
- FERGUSON H. M., MACKINNON M. J., CHAN B. H. et READ A. F., 2003 Mosquito mortality and the evolution of malaria virulence. *Evolution* **57**: 2792-2804.
- FERGUSON H. M. et READ A. F., 2002a. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc Biol Sci* **269**: 1217-1224.
- FERGUSON H. M. et READ A. F., 2002b. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol* **18**: 256-261.
- FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIATTA M., SOKHNA V., DIA I. *et al.*, 1997. Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**: 647-652.

- FOURNET F., CUSSAC M., OUARI A., MEYER P. E., TOE H. K. *et al.*, 2010. Diversity in anopheline larval habitats and adult composition during the dry and wet seasons in Ouagadougou (Burkina Faso). *Malar J* **9**: 78.
- FROLET C., THOMA M., BLANDIN S., HOFFMANN J. A. et LEVASHINA E. A., 2006. Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. *Immunity* **25**: 677-685.
- FRYXELL R. T., NIEMAN C. C., FOFANA A., LEE Y., TRAORE S. F. *et al.*, 2012. Differential *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles gambiae* s.s. molecular and chromosomal forms in Mali. *Malar J* **11**: 133.
- GANDON S., AGNEW P. et MICHALAKIS Y., 2002a. Coevolution between parasite virulence and host life-history traits. *Am Nat* **160**: 374-388.
- GANDON S., VAN BAALEN M. et JANSEN V. A., 2002b. The evolution of parasite virulence, superinfection, and host resistance. *Am Nat* **159**: 658-669.
- GARRETT-JONES C. et SHIDRAWI G. R., 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bull World Health Organ* **40**: 531-545.
- GARSKÉ T., FERGUSON N. M. et GHANI A. C., 2013. Estimating air temperature and its influence on malaria transmission across Africa. *PLoS One* **8**: e56487.
- GARVER L. S., BAHIA A. C., DAS S., SOUZA-NETO J. A., SHIAO J. *et al.*, 2012. *Anopheles* Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-*Plasmodium* action. *PLoS Pathog* **8**: e1002737.
- GENTILE G., SLOTMAN M., KETMAIER V., POWELL J. R. et CACCONE A., 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* **10**: 25-32.
- GIMONNEAU G., POMBI M., CHOISY M., MORAND S., DABIRE R. K. *et al.*, 2012a. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol* **26**: 9-17.
- GIMONNEAU G., POMBI M., DABIRE R. K., DIABATE A., MORAND S. *et al.*, 2012b. Behavioural responses of *Anopheles gambiae sensu stricto* M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors* **5**: 65.
- GNEME A., GUELBEOGO W. M., RIEHLE M. M., SANOU A., TRAORE A. *et al.*, 2013. Equivalent susceptibility of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *Anopheles arabiensis* to *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *Malar J* **12**: 204.
- GOUAGNA L. C., BANCONE G., YAO F., YAMEOGO B., DABIRE K. R. *et al.*, 2010. Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet* **42**: 328-331.
- GOUAGNA L. C., BONNET S., GOUNOUE R., TCHUINKAM T., SAFEUKUI I. *et al.*, 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**: 209-214.
- GOUAGNA L. C., MULDER B., NOUBISSI E., TCHUINKAM T., VERHAVE J. P. *et al.*, 1998. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health* **3**: 21-28.
- GOUVEIA DE ALMEIDA A. P., 2011. Mosquitoes (*Diptera, Culicidae*) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta Med Port* **24**: 961-974.
- GOZAR M. M., PRICE V. L. et KASLOW D. C., 1998. *Saccharomyces cerevisiae*-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. *Infect Immun* **66**: 59-64.
- GREEN C. A., 1972. Cytological maps for the practical identification of females of the three freshwater species of the *Anopheles gambiae* complex. *Ann Trop Med Parasitol* **66**: 143-147.
- GUPTA L., MOLINA-CRUZ A., KUMAR S., RODRIGUES J., DIXIT R. *et al.*, 2009. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host Microbe* **5**: 498-507.

- HARRIS C., LAMBRECHTS L., ROUSSET F., ABATE L., NSANGO S. E. *et al.*, 2010. Polymorphisms in *Anopheles gambiae* immune genes associated with natural resistance to *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* **6**: e1001112.
- HARRIS C., MORLAIS I., CHURCHER T. S., AWONO-AMBENE P., GOUAGNA L. C. *et al.*, 2012. *Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations. *PLoS One* **7**: e30849.
- HASTINGS I. M., 1997. A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology* **115** (Pt 2): 133-141.
- HOFFMAN S. A., ARAVIND L. et VELMURUGAN S., 2012. Female *Anopheles gambiae* antennae: increased transcript accumulation of the mosquito-specific odorant-binding-protein OBP2. *Parasit Vectors* **5**: 27.
- HOGG J. C., CARWARDINE S. et HURD H., 1997. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on ovarian protein accumulation by *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* **83**: 374-379.
- HOGG J. C., et HURD H., 1995a. Malaria-induced reduction of fecundity during the first gonotrophic cycle of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Med Vet Entomol* **9**: 176-180.
- HOGG J. C. et HURD H., 1995b. *Plasmodium yoelii nigeriensis*: the effect of high and low intensity of infection upon the egg production and bloodmeal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. *Parasitology* **111** (Pt 5): 555-562.
- HOLT R. A., SUBRAMANIAN G. M., HALPERN A., SUTTON G. G., CHARLAB R. *et al.*, 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129-149.
- HUGHES G. L., KOGA R., XUE P., FUKATSU T. et RASGON J. L., 2011. Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog* **7**: e1002043.
- ISAACS A. T., LI F., JASINSKIENE N., CHEN X., NIRMALA X. *et al.*, 2011. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS Pathog* **7**: e1002017.
- ITO J., GHOSH A., MOREIRA L. A., WIMMER E. A. et JACOBS-LORENA M., 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* **417**: 452-455.
- ITURBE-ORMAETXE, I., WALKER T., 2011. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* **12**: 508-518.
- JAHAN N. et HURD H., 1997. The effects of infection with *Plasmodium yoelii nigeriensis* on the reproductive fitness of *Anopheles stephensi*. *Ann Trop Med Parasitol* **91**: 365-369.
- JARAMILLO-GUTIERREZ G., RODRIGUES J., NDIKUYEZE G., POVELONES M., MOLINA-CRUZ A. *et al.*, 2009. Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiol* **9**: 154.
- JOY D. A., GONZALEZ-CERON L., CARLTON J. M., GUEYE A., FAY M. *et al.*, 2008. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol* **25**: 1245-1252.
- KABIRU E. W., MBOGO C. M., MUIRURI S. K., OUMA J. H., GITHURE J. I. *et al.*, 1997. Sporozoite loads of naturally infected *Anopheles* in Kilifi District, Kenya. *J Am Mosq Control Assoc* **13**: 259-262.
- KAPPE S. H., BUSCAGLIA C. A. et NUSSENZWEIG V., 2004. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 29-59.
- KASLOW D. C., 1990. Immunogenicity of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens: implications for the design of a transmission blocking vaccine. *Immunol Lett* **25**: 83-86.
- KASLOW D. C., 1997. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* **27**: 183-189.
- KASLOW D. C., QUAKYI I. A., SYIN C., RAUM M. G., KEISTER D. B. *et al.*, 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**: 74-76.
- KELLY R. et EDMAN J. D., 1992. Mosquito size and multiple transmission of avian malaria in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc* **8**: 386-388.

- KOELLA J. C., 1999. An evolutionary view of the interactions between anopheline mosquitoes and malaria parasites. *Microbes Infect* **1**: 303-308.
- KOELLA J. C. et SORENSE F. L., 2002. Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol* **16**: 316-320.
- KOELLA J. C., SORENSEN F. L. et ANDERSON R. A., 1998. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci* **265**: 763-768.
- KOELLA J. C. et ZAGHLOUL L., 2008. Using evolutionary costs to enhance the efficacy of malaria control via genetically manipulated mosquitoes. *Parasitology* **135**: 1489-1496.
- LAL A. A., PATTERSON P. S., SACCI J. B., VAUGHAN J. A., PAUL C. *et al.*, 2001. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5228-5233.
- LAMBRECHTS L., CHAVATTE J. M., SNOUNOU G. et KOELLA J. C., 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc Biol Sci* **273**: 1501-1506.
- LAMBRECHTS L., HALBERT J., DURAND P., GOUAGNA L. C. et KOELLA J. C., 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **4**: 3.
- LAMBRECHTS L., MORLAIS I., AWONO-AMBENE P. H., COHUET A., SIMARD F. *et al.*, 2007. Effect of infection by *Plasmodium falciparum* on the melanization immune response of *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 475-480.
- LAWNICZAK M. K., EMRICH S. J., HOLLOWAY A. K., REGIER A. P., OLSON M. *et al.*, 2010. Widespread divergence between incipient *Anopheles gambiae* species revealed by whole genome sequences. *Science* **330**: 512-514.
- LEE Y., COLLIER T. C., SANFORD M. R., MARSDEN C. D., FOFANA A. *et al.*, 2013. Chromosome inversions, genomic differentiation and speciation in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* **8**: e57887.
- LEFEVRE T., VANTAUX A., DABIRE K. R., MOULINE K. et COHUET A., 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog* **9**: e1003365.
- LEHMANN T. et DIABATE A., 2008. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infect Genet Evol* **8**: 737-746.
- LEMASSON J. J., FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIA I., SIMARD F. *et al.*, 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* **34**: 396-403.
- LENGELER C., 2004. Insecticide-treated nets for malaria control: real gains. *Bull World Health Organ* **82**: 84.
- LENSEN A. H., VAN GEMERT G. J., BOLMER M. G., MEIS J. F., KASLOW D. *et al.*, 1992. Transmission blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote/ookinete surface protein Pfs25 also influences sporozoite development. *Parasite Immunol* **14**: 471-479.
- LONG K. Z. et NANTHAKUMAR N., 2004. Energetic and nutritional regulation of the adaptive immune response and trade-offs in ecological immunology. *Am J Hum Biol* **16**: 499-507.
- LUCKHART S., LI K., DUNTON R., LEWIS E. E., CRAMPTON A. L. *et al.*, 2003. *Anopheles gambiae* immune gene variants associated with natural *Plasmodium* infection. *Mol Biochem Parasitol* **128**: 83-86.
- LYIMO E. O. et KOELLA J. C., 1992. Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae s.l.* and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **104** (Pt 2): 233-237.
- LYIMO I. N., KEEGAN S. P., RANFORD-CARTWRIGHT L. C. et FERGUSON H. M., 2012. The impact of uniform and mixed species blood meals on the fitness of the mosquito vector *Anopheles gambiae s.s.*: does a specialist pay for diversifying its host species diet? *J Evol Biol* **25**: 452-460.

- MACDONALD G., 1956. Epidemiological basis of malaria control. *Bull World Health Organ* **15**: 613-626.
- MACDONALD W. W., 1967. Genetics of vectorial capacity. *Bull World Health Organ* **36**: 566-568.
- MAIGA O., DJIMDE A. A., HUBERT V., RENARD E., AUBOUY A. *et al.*, 2007. A shared Asian origin of the triple-mutant dhfr allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. *J Infect Dis* **196**: 165-172.
- MANDA H., GOUAGNA L. C., NYANDAT E., KABIRU E. W., JACKSON R. R. *et al.*, 2007. Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. on endemic plants in western Kenya. *Med Vet Entomol* **21**: 103-111.
- MANDAL S., SINHA S. *et* SARKAR R. R., 2013. A Realistic Host-Vector Transmission Model for Describing Malaria Prevalence Pattern. *Bull Math Biol*.
- MARTIN G., GRANT A. *et* D'AGOSTINO M., 2012. Global health funding and economic development. *Global Health* **8**: 8.
- MAYOR A., APONTE J. J., FOGG C., SAUTE F., GREENWOOD B. *et al.*, 2007. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. *Malar J* **6**: 3.
- MENDES A. M., SCHLEGELMILCH T., COHUET A., AWONO-AMBENE P., DE IORIO M. *et al.*, 2008. Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog* **4**: e1000069.
- MICHALAKIS Y., 2007. Parasitisme et évolution des traits d'histoire de vie. *Biologie*: 131-142.
- MICHEL K. *et* KAFATOS F. C., 2005. Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 677-689.
- MINISTÈRE DE LASANTÉ, 2013. Annuaire statistique sanitaire. Direction Générale de l'information et des statistiques sanitaires: 237.
- MIOTTO O., ALMAGRO-GARCIA J., MANSKE M., MACINNIS B., CAMPINO S. *et al.*, 2013. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*.
- MITRI C., JACQUES J. C., THIERY I., RIEHLE M. M., J. XU *et al.*, 2009. Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. *PLoS Pathog* **5**: e1000576.
- MITRI C. *et* VERNICK K. D., 2012. *Anopheles gambiae* pathogen susceptibility: the intersection of genetics, immunity and ecology. *Curr Opin Microbiol* **15**: 285-291.
- MOLINA-CRUZ A., DEJONG R. J., ORTEGA C., HAILE A., ABBAN E. *et al.*, 2012. Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1957-1962.
- MOREIRA L. A., ITO J., GHOSH A., DEVENPORT M., ZIELER H. *et al.*, 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* **277**: 40839-40843.
- MORET Y. *et* SCHMID-HEMPEL P., 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**: 1166-1168.
- MORLAIS I., PONCON N., SIMARD F., COHUET A. *et* 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.
- MOUCHET J., CARNEVALE P., COOSEMANS M., JULVEZ J., MANGUIN S. *et al.*, 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. Editions *John Libbey Eurotex*: 428.
- MOULINE K., MAMAI W., AGNEW P., TCHONFIENET M., BRENGUES C. *et al.*, 2012. Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol* **26**: 447-454.
- MUHIA D. K., SWALES C. A., DENG W., KELLY J. M. *et* BAKER D. A., 2001. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **42**: 553-560.

- MUIRHEAD-THOMSON R. C., 1951. The distribution of anopheline mosquito bites among different age groups; a new factor in malaria epidemiology. *Br Med J* **1**: 1114-1117.
- MULLA M. S., 1994. Mosquito control then, now, and in the future. *J Am Mosq Control Assoc* **10**: 574-584.
- MULLER G. C., BEIER J. C., TRAORE S. F., TOURE M. B., TRAORE M. M. *et al.*, 2010. Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits/seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. *Malar J* **9**: 262.
- NAITZA S., SPANO F., ROBSON K. J. *et* CRISANTI A., 1998. The Thrombospondin-related Protein Family of Apicomplexan Parasites: The Gears of the Cell Invasion Machinery. *Parasitol Today* **14**: 479-484.
- NAJERA J. A., GONZALEZ-SILVA M. *et* ALONSO P. L., 2011. Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969). *PLoS Med* **8**: e1000412.
- NAMOUNTOUGOU M., DIABATE A., ETANG J., BASS C., SAWADOGO S. P. *et al.*, 2013. First report of the L1014S kdr mutation in wild populations of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop* **125**: 123-127.
- NASSIR E., ABDEL-MUHSIN A. M., SULIAMAN S., KENYON F., KHEIR A. *et al.*, 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.
- NDIATH M. O., BRENGUES C., KONATE L., SOKHNA C., BOUDIN C. *et al.*, 2008. Dynamics of transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* and the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* in Dielmo, Senegal. *Malar J* **7**: 136.
- NDIATH M. O., COHUET A., GAYE A., KONATE L., MAZENOT C. *et al.*, 2011. Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malar J* **10**: 269.
- NIARE O., MARKIANOS K., VOLZ J., ODUOL F., TOURE A. *et al.*, 2002. Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science* **298**: 213-216.
- NWAKANMA D. C., NEAFSEY D. E., JAWARA M., ADIAMOH M., LUND E. *et al.*, 2013. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics* **193**: 1221-1231.
- OBBARD D. J., CALLISTER D. M., JIGGINS F. M., SOARES D. C., YANG G. *et al.*, 2008. The evolution of TEPI, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. *BMC Evol Biol* **8**: 274.
- OKECH B. A., GOUAGNA L. C., KABIRU E. W., BEIER J. C., YANG G. *et al.*, 2004. Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *Plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers. *J Insect Sci* **4**: 33.
- OLIVEIRA J. H., GONCALVES R. L., OLIVEIRA G. A., OLIVEIRA P. L., OLIVEIRA M. F. *et al.*, 2011. Energy metabolism affects susceptibility of *Anopheles gambiae* mosquitoes to *Plasmodium infection*. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 349-355.
- OMS, 2012. Rapport sur le paludisme dans le monde. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/fr/ [consulté le 15 decembre 2013].
- ONYABE D. Y., ROITBERG B. D. *et* FRIEND W. G., 1997. Feeding and mating strategies in *Anopheles* (*Diptera: Culicidae*): theoretical modeling approach. *J Med Entomol* **34**: 644-650.
- OSTA M. A., CHRISTOPHIDES G. K. *et* KAFATOS F. C., 2004 Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* **303**: 2030-2032.
- OUEDRAOGO A., TIONO A. B., DIARRA A., SANON S., YARO J. B. *et al.*, 2013. Malaria morbidity in high and seasonal malaria transmission area of Burkina Faso. *PLoS One* **8**: e50036.
- OUEDRAOGO A. L., ROEFFEN W., LUTY A. J., DE VLAS S. J., NEBIE I. *et al.*, 2011. Naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission. *Infect Immun* **79**: 4957-4964.

- PERERA O. P., HARRELL I. R. et HANDLER A. M., 2002. Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyBac/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. *Insect Mol Biol* **11**: 291-297.
- PETRARCA V., PETRANGELI G., ROSSI P. et SABATINELLI G., 1986. Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages. *Parassitologia* **28**: 41-61.
- PETRARCA V., VERCROYSSSE J. et COLUZZI M., 1987. Observations on the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River Basin, West Africa. *Med Vet Entomol* **1**: 303-312.
- PHYO A. P., NKHOMA S., STEPNIWSKA K., ASHLEY E. A., NAIR S. *et al.*, 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* **379**: 1960-1966.
- PONSA N., SATTABONGKOT J., KITTAYAPONG P., EIKARAT N. et 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**: 542-547.
- PRAKASH A., BHATTACHARYYA D. R., MOHAPATRA P. K. et MAHANTA J., 2001. Estimation of vectorial capacity of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in a forest-fringed village of Assam (India). *Vector Borne Zoonotic Dis* **1**: 231-237.
- PRUDENCIO M., RODRIGUEZ A. et MOTA M. M., 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* **4**: 849-856.
- PRUGNOLLE F., DURAND P., JACOB K., RAZAKANDRAINIBE F., ARNATHAU C. *et al.*, 2008. A comparison of *Anopheles gambiae* and *Plasmodium falciparum* genetic structure over space and time. *Microbes Infect* **10**: 269-275.
- PUMPUNI C. B., DEMAIO J., KENT M., DAVIS J. R. et BEIER J. C., 1996. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 214-218.
- QUAKYI I. A., CARTER R., RENER J., KUMAR N., GOOD M. F. *et al.*, 1987. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol* **139**: 4213-4217.
- RASGON J. L., REN X. et PETRIDIS M., 2006. Can *Anopheles gambiae* be infected with *Wolbachia pipientis*? Insights from an in vitro system. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7718-7722.
- RAZAKANDRAINIBE F. G., DURAND P., KOELLA J. C., DE MEEUS T., ROUSSET F. *et al.*, 2005. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17388-17393.
- READ A. F., LYNCH P. A. et THOMAS M. B., 2009. How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol* **7**: e1000058.
- REIDENBACH K. R., NEAFSEY D. E., COSTANTINI C., SAGNON N., SIMARD F. *et al.*, 2012. Patterns of genomic differentiation between ecologically differentiated M and S forms of *Anopheles gambiae* in West and Central Africa. *Genome Biol Evol* **4**: 1202-1212.
- REISEN W. K., MAHMOOD F. et PARVEEN T., 1980. *Anopheles culicifacies* Giles: a release-recapture experiment with cohorts of known age with implications for malaria epidemiology and genetical control in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **74**: 307-317.
- RIEHLE M. A., MOREIRA C. K., LAMPE D., LAUZON C. et JACOBS-LORENA M., 2007. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *Int J Parasitol* **37**: 595-603.
- RIEHLE M. M., GUELBEOGO W. M., GNEME A., EIGLMEIER K., HOLM I. *et al.*, 2011. A cryptic subgroup of *Anopheles gambiae* is highly susceptible to human malaria parasites. *Science* **331**: 596-598.
- RIEHLE M. M., MARKIANOS K., NIARE O., XU J., LI J. *et al.*, 2006. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science* **312**: 577-579.

- RINKER D. C., PITTS R. J., ZHOU X., SUH E., ROKAS A. *et al.*, 2013. Blood meal-induced changes to antennal transcriptome profiles reveal shifts in odor sensitivities in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8260-8265.
- RIVERO A., AGNEW P., BEDHOMME S., SIDOBRE C. et MICHALAKIS Y., 2007. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology* **134**: 1355-1362.
- RIVERO A. et FERGUSON H. M., 2003. The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence? *Proc Biol Sci* **270**: 1365-1371.
- RIVERO A., VEZILIER J., WEILL M., READ A. F. et GANDON S., 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* **6**: e1001000.
- ROBERT V., AWONO-AMBENE H. P. et THIOULOUSE J., 1998. Ecology of larval mosquitoes, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in market-garden wells in urban Dakar, Senegal. *J Med Entomol* **35**: 948-955.
- ROBERT V. et BOUDIN C., 2003. Biology of man-mosquito *Plasmodium* transmission. *Bull Soc Pathol Exot* **96**: 6-20.
- ROBERT V., VERHAVE J. P. et CARNEVALE P., 1990. *Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**: 346-347.
- ROSSIGNOL P. A., RIBEIRO J. M. et SPIELMAN A., 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **33**: 17-20.
- ROTTSCHAEFER S. M., RIEHLE M. M., COULIBALY B., SACKO M., NIARE O. *et al.*, 2011. Exceptional diversity, maintenance of polymorphism, and recent directional selection on the APL1 malaria resistance genes of *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol* **9**: e1000600.
- SACHS J. et MALANEY P., 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**: 680-685.
- SANGARE I., MICHALAKIS Y., YAMEOGO B., DABIRE R., MORLAIS I. *et al.*, 2013. Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J* **12**: 2.
- SANTOLAMAZZA F., CALZETTA M., ETANG J., BARRESE E., DIA I. *et al.*, 2008. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* **7**: 74.
- SCHMID-HEMPEL, P., 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc Biol Sci* **270**: 357-366.
- SCHWARTZ, A. et KOELLA J. C., 2001. Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends Parasitol* **17**: 189-194.
- SCHWARTZ, A. et KOELLA J. C., 2004. The cost of immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* depends on immune activation. *J Evol Biol* **17**: 834-840.
- SCOTT J. A., BROGDON W. G. et COLLINS F. H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **49**: 520-529.
- SIMARD F., 1999. Variabilité génétique et flux de gènes chez les moustiques *Anopheles arabiensis* et *Anopheles gambiae*, vecteurs du paludisme en Afrique : apport des loci microsatellites. *Thèse Université Henri Poincaré - NANCY I*: 272p.
- SIMARD F., AYALA D., KAMDEM G. C., POMBI M., ETOUNA J. *et al.*, 2009. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol* **9**: 17.
- SIMARD F., LICHT M., BESANSKY N. J. et LEHMANN T., 2007. Polymorphism at the defensin gene in the *Anopheles gambiae* complex: testing different selection hypotheses. *Infect Genet Evol* **7**: 285-292.
- SINDEN R. E., 2009. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology* **136**: 1427-1434.

- SINDEN R. E., ALAVI Y. et RAINE J. D., 2004. Mosquito--malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 625-629.
- SINDEN R. E. et BILLINGSLEY P. F., 2001. *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* **17**: 209-212.
- SINKINS S. P. et GOULD F., 2006. Gene drive systems for insect disease vectors. *Nat Rev Genet* **7**: 427-435.
- SMITH D. L. et MCKENZIE F. E., 2004. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar J* **3**: 13.
- SNOW W. F., 1987. Studies of house-entering habits of mosquitoes in The Gambia, West Africa: experiments with prefabricated huts with varied wall apertures. *Med Vet Entomol* **1**: 9-21.
- SPENCE P. J., JARRA W., LEVY P., REID A. J., CHAPPELL L. et al., 2013. Vector transmission regulates immune control of *Plasmodium* virulence. *Nature* **498**: 228-231.
- SU X., HAYTON K. et WELLEMS T. E., 2007. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet* **8**: 497-506.
- SU X. et WELLEMS T. E., 1996. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics* **33**: 430-444.
- SUMBA L. A., OKOTH K., DENG A. L., GITHURE J., KNOLS B. G. et al., 2004. Daily oviposition patterns of the African malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles (*Diptera: Culicidae*) on different types of aqueous substrates. *J Circadian Rhythms* **2**: 6.
- TAHAR R., BOUDIN C., THIERY I. et BOURGOUIN C., 2002. Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* **21**: 6673-6680.
- TANAKA T. Q., DEU E., MOLINA-CRUZ A., ASHBURNE M. J., ALI O. et al., 2013. *Plasmodium* dipeptidyl aminopeptidases as malaria transmission-blocking drug targets. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 4645-4652.
- TAUTZ D. et RENZ M., 1984 Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* **12**: 4127-4138.
- TAYLOR L. H., 1999. Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles* mosquitoes in Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol* **93**: 659-662.
- THOMAS D. D., DONNELLY C. A., WOOD R. J. et ALPHEY L. S., 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* **287**: 2474-2476.
- TKACHUK A. P., KIM M. V., SAVITSKII V. et SAVITSKII M., 2011. The prospects of using transgenic insects in biocontrol programs. *Zh Obshch Biol* **72**: 93-110.
- TOURE Y. T., PETRARCA V., TRAORE S. F., COULIBALY A., MAIGA H. M. et al., 1994. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.s. in Mali, west Africa. *Genetica* **94**: 213-223.
- TOURE Y. T., PETRARCA V., TRAORE S. F., COULIBALY A., MAIGA H. M. et al., 1998. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* **40**: 477-511.
- TRIPET F., 2009. Ecological immunology of mosquito-malaria interactions: Of non-natural versus natural model systems and their inferences. *Parasitology* **136**: 1935-1942.
- TRIPET F., ABOAGYE-ANTWI F. et HURD H., 2008. Ecological immunology of mosquito-malaria interactions. *Trends Parasitol* **24**: 219-227.
- TRIPET F., WRIGHT J., CORNEL A., FOFANA A., MCABEE R. et al., 2007. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 81-87.
- TURNER T. L. et HAHN M. W., 2010. Genomic islands of speciation or genomic islands and speciation? *Mol Ecol* **19**: 848-850.
- TURNER T. L., HAHN M. W. et NUZH DIN S. V., 2005. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol* **3**: e285.

- VAUGHAN J. A., NODEN B. H. et BEIER J. C., 1992. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J Parasitol* **78**: 716-724.
- VAZQUEZ A. I., BATES D. M., ROSA G. J., GIANOLA D. et WEIGEL K. A., 2010. Technical note: an R package for fitting generalized linear mixed models in animal breeding. *J Anim Sci* **88**: 497-504.
- VON SEIDLEIN L. et BEJON P., 2013. Malaria vaccines: past, present and future. *Arch Dis Child*.
- WALKER T. et MOREIRA L. A., 2011. Can Wolbachia be used to control malaria? *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106 Suppl 1**: 212-217.
- WALLIKER D., 2005. The hitchhiker's guide to malaria parasite genes. *Trends Parasitol* **21**: 489-493.
- WEKESA J. W., COPELAND R. S. et MWANGI R. W., 1992. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **47**: 484-488.
- WHITE B. J., CHENG C., SIMARD F., COSTANTINI C. et BESANSKY N. J., 2010. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol* **19**: 925-939.
- WHITE G. B., 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **68**: 278-301.
- WONGSRICHANALAI, C. et SIBLEY C. H., 2013. Fighting drug-resistant *Plasmodium falciparum*: the challenge of artemisinin resistance. *Clin Microbiol Infect* **12**: 241-298.
- WOOLHOUSE M. E. et ANDERSON R. M., 1997. Understanding the epidemiology of BSE. *Trends Microbiol* **5**: 421-424.
- WOOTTON J. C., FENG X., FERDIG M. T., COOPER R. A., MU J. *et al.*, 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **418**: 320-323.
- WU Y., ELLIS R. D., SHAFFER D., FONTES E., MALKIN E. M. *et al.*, 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* **3**: e2636.
- YADOLETON A. W., PADONOU G., ASIDI A., MOIROUX N., BIO-BANGANNA S. *et al.*, 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J* **9**: 83.
- YAMANA T. K. et ELTAHIR E. A., 2013. Incorporating the effects of humidity in a mechanistic model of *Anopheles gambiae* mosquito population dynamics in the Sahel region of Africa. *Parasit Vectors* **6**: 235.
- YARO A. S., DAO A., ADAMOU A., CRAWFORD J. E., TRAORE S. F. *et al.*, 2006. Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms. *J Med Entomol* **43**: 833-839.
- YASSINE H. et OSTA M. A., 2010. *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cell Microbiol* **12**: 1-9.
- YAWSON A. E., MCCALL P. J., WILSON M. D. et DONNELLY M. J., 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol* **18**: 372-377.
- ZIELER H., KEISTER D. B., DVORAK J. A. et RIBEIRO J. M., 2001. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp Biol* **204**: 4157-4167.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN À PARTIR DES OOCYSTES

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 eppendorf de 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 trs pendant 1 min ;
7. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube ;
8. Ajouter 500 µl de Buffer AW1 ;
9. Centrifuger à 9000trs pendant 1 min ;
10. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube ;
11. Ajouter 500 µl de Buffer AW2;
12. Centrifuger à 12 000trs 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 Buffer AE pour l'éluat ;
15. Centrifuger à 9000 trs 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

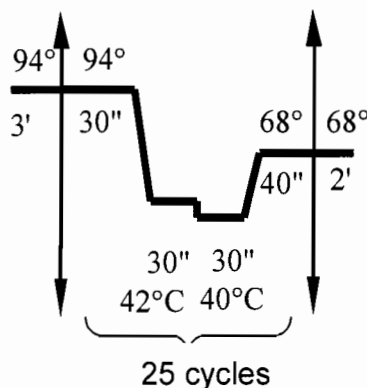
ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE GENOTYPAGE DE *P. falciparum* PAR MARQUEURS MICROSATELLITES

Pour un volume final de 15 µl par réaction,

| | | 1ere PCR |
|------------------------|--------------|---------------|
| Réactifs | Conc. finale | 1 échantillon |
| Tampon de Taq 10 X | 1 X | 1.5 µl |
| MgCl ₂ 5 mM | 1. mM | 0.5 µl |
| 10 mM dNTP | 0.2 mM each | 0.3 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 | 0.2 µl |
| ddH ₂ O | | 10.2 µl |
| DNA (1 à 5 ng/µl) | | 2.0 µl |

Amplification :

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



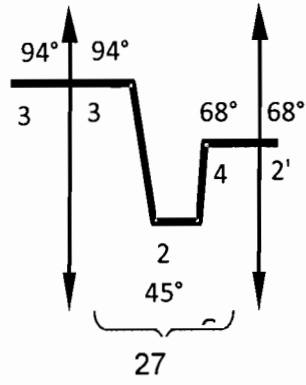
Pour la **nested** en prenant 1,5 µl du produit de la 1ere PCR comme matrice ADN et pour un volume réactionnel de 15 µl

| Réactifs | Conc. finale | 1 échantillon |
|------------------------|--------------|---------------|
| Tampon de Taq 10 X | 1 X | 1.5 µl |
| MgCl ₂ 5 mM | 0.7 mM | 0.4 µl |
| 10 mM dNTP | 0.2 mM each | 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 (1 à 5 ng/µl) | | 1.5 µl |

Amplification :

3' [30'', 20'', 40'']_{27c} 2'

94° [94°, 45°, 65°] 68°



ANNEXE 3 : PUBLICATIONS

SELECTION D'ARTICLES

Sangare I, Michalakis Y, Yameogo B, Dabire R, Morlais I, Cohuet A: Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malar J* 2013, 12:2.

Sangare I, Dabire R., Yameogo B., Da DF., Michalakis Y., Cohuet A.: Stress dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. *Infect Genet Evol* 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.006>

Kapulu M.C., Da D.F., Miura K., Blagborough A.M., Churcher T.S., Yuanyuan Li, Williams A.R, Goodman A.L., **Sangare I**, Turner A.V., Cottingham M.G., Nicosia A., Tsuboi U. Straschil, T., Gilbert S.C., Long Carole A., Sinden R.E., Draper S.J, Hill A.V.S., Cohuet A., and Biswas S.: Comparative Assessment of Transmission-Blocking Vaccine Candidates against *Plasmodium falciparum*. *Science Translational Medicine Manuscript* 3007009 (Accepté).

METHODOLOGY

Open Access

Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control

Ibrahim Sangare^{1,2}, Yannis Michalakis², Bienvenue Yameogo¹, Roch Dabire¹, Isabelle Morlais^{2,3} and Anna Cohuet^{1,2*}

Abstract

Background: The question whether *Plasmodium falciparum* infection affects the fitness of mosquito vectors remains open. A hurdle for resolving this question is the lack of appropriate control, non-infected mosquitoes that can be compared to the infected ones. It was shown recently that heating *P. falciparum* gametocyte-infected blood before feeding by malaria vectors inhibits the infection. Therefore, the same source of gametocyte-infected blood could be divided in two parts, one heated, serving as the control, the other unheated, allowing the comparison of infected and uninfected mosquitoes which fed on exactly the same blood otherwise. However, before using this method for characterizing the cost of infection to mosquitoes, it is necessary to establish whether feeding on previously heated blood affects the survival and fecundity of mosquito females.

Methods: *Anopheles gambiae* M molecular form females were exposed to heated versus non-heated, parasite-free human blood to mimic blood meal on non-infectious versus infectious gametocyte-containing blood. Life history traits of mosquito females fed on blood that was heat-treated or not were then compared.

Results: The results reveal that heat treatment of the blood did not affect the survival and fecundity of mosquito females. Consistently, blood heat treatment did not affect the quantity of blood ingested.

Conclusions: The study indicates that heat inactivation of gametocyte-infected blood will only inhibit mosquito infection and that this method is suitable for quantifying the fitness cost incurred by mosquitoes upon infection by *P. falciparum*.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Vectors, Infection cost, Negative control, Fitness

Background

Mosquito fitness is a crucial factor of vectorial capacity and malaria transmission [1]. However, the question whether *Plasmodium* parasites affect the fitness of mosquito vectors they infect remains open. Ten years ago, a review pointed out conflicting results in previous studies according to the design of experiments, environmental conditions, and the parasite-mosquito species used [2]. This underlined the need to develop experiments using natural vector-parasite species combinations in controlled environmental conditions. In the last decade, additional

studies aimed at deciphering the cost of infection in malaria vectors by using different species and methods and produced again contrasted results [3-7]. Some studies showed a shorter lifespan in infected mosquitoes or no detected effect of infection depending on the parasite load and/or environmental conditions [3,5-7]. Recently, another study observed a longer lifespan in infected mosquitoes associated with a lower fecundity [4]. Concerning the most important vectorial system for human malaria: *Anopheles gambiae/Plasmodium falciparum*, some studies suggested an infection cost in this combination of species [7,8], others did not find it [9,10]. Further investigations are therefore needed to determine how infection affects the mosquito vector in this epidemiologically relevant system.

* Correspondence: anna.cohuet@ird.fr

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé-Direction Régionale de l'Ouest, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

²Institut de Recherche pour le Développement, Unité MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), BP 64501, Montpellier Cedex 5 34394, France

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

Measuring how parasite infection affects fitness traits requires the comparison of infected and non-infected mosquitoes, either collected from the field or produced in laboratory conditions. Comparison of field-collected infected and non-infected mosquitoes is limited by the difficulties to obtain a large number of infected mosquitoes [7], and by the lack of a reliable method for ageing the field-collected mosquitoes [8]. In the laboratory, obtaining a large number of *Plasmodium*-infected mosquitoes is facilitated by exposing insectary-reared *Anopheles* to gametocytes through membrane feeding (gametocyte-infected blood from naturally infected patients in direct membrane feeding assays, DMFA, or gametocyte-containing parasite culture in standard membrane feeding assays, SMFA) [11]. Different methods were used so far for producing non-infected mosquitoes to be compared to the ones exposed to *Plasmodium* gametocytes. In DMFA, in parallel to the experimental infection of mosquitoes, other females were exposed to parasite-free blood from another volunteer [10,12]; in SMFA the control mosquitoes were fed on a parasite culture not producing gametocytes [13]. Also exposing the mosquitoes that ingested infectious gametocytes to high temperatures just after the blood feeding can limit the infection success and produce non-infected mosquitoes [13]. All these methods however, incur the problem of confounding factors: when using the blood of uninfected hosts, one cannot rule out that host effects are responsible for the potential differences in mosquito life-history traits [14]; also, parasite strain-specific effects, or temperature effects [15,16] may be confounded with the effect of infection. This underlines a need for a proper control for evaluating the cost of infection.

It was shown recently that heating *P. falciparum* gametocyte-infected blood before feeding by malaria vectors impedes the infection by killing or inhibiting the infectivity of gametocytes [17,18]. This potentially allows the comparison of infected to non-infected mosquitoes that fed on the same blood at the same time. However, before using this method for characterizing the cost of infection to mosquitoes, it is necessary to establish whether feeding on previously heated blood affects the survival and fecundity of mosquito females. Therefore, life history traits of female mosquitoes exposed to non-infected blood that was subjected or not to a heat treatment, were compared. This allowed validating the method of using heat inactivation of *P. falciparum* gametocytes for comparison of fitness traits between infected and non-infected *An. gambiae*.

Methods

Mosquitoes

A mosquito colony of *An. gambiae* M molecular form was used. The colony was established in 2008 from wild-caught gravid females collected in Kou Valley (30 km north from

Bobo Dioulasso), Burkina Faso [19]. The females laid eggs individually before their species was determined by PCR-RFLP [20] and M form egg batches were pooled. The colony was maintained in the insectary under standard conditions (12 h day/night cycle, 28+/-2°C, 80+/-5% humidity).

The first blood meal of *An. gambiae* females is potentially used to compensate for nutritional deficiencies carried over from larval life and induce complete egg development and laying only in bigger females, whereas almost all females are able to fully develop eggs at subsequent blood meals [21-23]. The second blood meal is therefore more representative of female fecundity along its lifespan and egg production was observed after the second blood meal. Before measures of life history traits, females were fed on rabbit blood three days after adult emergence and on human blood the fifth or sixth day of adult life. Sugar was removed 36 h prior to blood feeding. For mosquito feeding on human blood, venous blood was collected from five volunteers, non-infected by *P. falciparum*, who were enrolled after written informed consent. Ethical approval was obtained from the relevant institutional Ethics Committee.

Blood feeding

Non-infected human blood was treated in the same manner as for experimental infections of malaria vectors by DMFA using natural isolates of *P. falciparum* and using gametocyte heat inactivation in parallel [17,18]. The blood was first centrifuged at 2,000 rpm at 37°C for three min, and the serum was replaced by the same volume of European AB serum. In experimental infections, this step limits the effect of human transmission blocking immunity [24]. To mimic gametocyte heat inactivation, half of the reconstituted blood was placed in a thermo-mixer and heated at 43°C for 15 min and 900 rpm while the remaining blood was maintained at 37°C. Five hundred µl of blood (heated or not) were distributed in membrane feeders maintained at 37°C by water jackets. At least two different feeders were used for each group (blood donor and heat treatment) in order to limit potential feeder effects. Cups containing 50 mosquito females were placed under the feeders to allow blood feeding through Parafilm membranes for 30 min. Fed females were sorted and placed in individual 30 ml plastic tubes for subsequent measures of life history traits. Because of logistic limitations, the blood feeding with the different blood donors had to be carried out at different days and using different mosquito batches from the same colony and therefore constituted different experimental blocks. In the statistical analyses the effect "blood donor" could thus be due to either differences in the "quality" of the blood of the various donors, intrinsic differences of the different mosquito batches, date effects, or a combination of the above.

Table 1 Statistical analysis of effects on *Anopheles gambiae* females survival

| Source | DF | X ² | P value |
|-----------------------------|----|----------------|---------|
| Heat treatment | 1 | 1.441 | 0.2300 |
| Blood donor | 4 | 95.705 | <.0001 |
| Heat treatment* Blood donor | 4 | 3.114 | 0.5390 |
| Wing length | 1 | 8.087 | 0.0045 |
| Haematin | 1 | 10.240 | 0.0014 |

Analysis of the effect of blood heat treatment, blood donor and their interaction on female mosquito survival after the blood meal using the Cox Proportional Hazards model.

Measure of life history traits

From the day of membrane blood feeding on heated *versus* non-heated blood and until death of all mosquitoes, females were observed every eight hours. Dead females were immediately processed: ovaries were dissected for egg counting and wings were mounted on slides to measure their length. If both wings of a female were intact one wing was randomly chosen to be measured. When one wing was damaged, the undamaged wing was measured. Wing size was measured from the alula to the wing tip, excluding scales as previously described [25] by using the software ImageJ [26].

The amount of haematin, a by-product of the decomposition of haemoglobin, was measured for each female [27] to obtain a relative measure of blood meal size. For all mosquitoes that died at least three days after blood feeding and therefore completed digestion and excreted all the haematin, 1 ml of 1% LiCO₃ was distributed in individual tubes to elute faeces. The absorbance of the resulting solution was read at 387 nm, using LiCO₃ solution as a blank, and compared with a standard curve made with porcine serum haematin (Sigma-Aldrich).

Statistical analyses

To investigate whether the blood heating treatment affects mosquito survival, Kaplan-Meier survival estimates were calculated and the effects of heat treatment, blood donor, and their interaction, were tested using Cox's Proportional Hazards model. Wing length and the quantity of excreted haematin were used as co-variables.

Preliminary analysis of the results on fecundity revealed that a variable proportion of females did not develop any eggs, thus yielding distributions with a spike at zero and a more or less normal distribution for larger values of the number of eggs produced. The analysis of fecundity results were thus split in two parts. First, nominal logistic regressions were used to test whether heat treatment affects the probability that a female may develop at least one egg. Because the size of an individual and its blood meal size may affect female fecundity wing length and quantity of haematin excreted were included as co-variables in the model. Second, the effect of blood treatment on the number of eggs developed per female, exclusively on females that developed at least one egg, was tested with an analysis of variance including wing length and quantity of haematin excreted as co-variables.

In order to investigate whether heating the blood may influence the quantity ingested by a female, the potential effect of the heat treatment on the blood meal size was tested with an analysis of variance with blood donor as a co-variable.

In the analyses, the blood-donor effect is considered as fixed. The choice of this option was done because (i) fixed effects models are easier to present than mixed effects models; (ii) when declaring the blood-donor effect and its interaction with the heat treatment as random effects, similar conclusions were always reached; (iii) the small number of blood donors (five) legitimately questions whether they can be considered as a representative sample of the blood donor population.

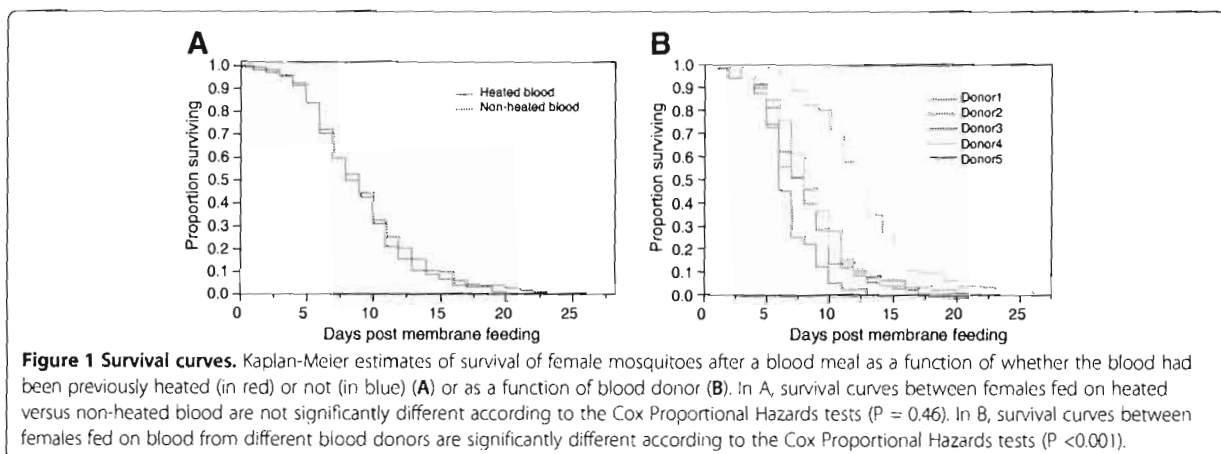


Table 2 Statistical analysis of effects on development of at least one egg in *Anopheles gambiae*

| Source | DF | X ² | P value |
|-----------------------------|----|----------------|---------|
| Heat treatment | 1 | 0.304 | 0.5816 |
| Blood donor | 4 | 5.611 | 0.2302 |
| Heat treatment *Blood donor | 4 | 1.829 | 0.7672 |
| Wing length | 1 | 1.811 | 0.1784 |
| Haematin | 1 | 20.151 | <.0001 |

Nominal logistic regression on whether a female laid any eggs as a function of blood treatment, blood donor, their interaction, female wing length and quantity of haematin excreted.

Results

Survival

A total of 485 *An. gambiae* females were included in the analysis, ranging from 70 to 131 per blood donor. The Cox Proportional Hazards model revealed that the blood heating treatment, whether alone or in interaction with the blood donor, did not affect mosquito survival (Table 1, Figure 1A). In contrast, a significant difference in survival among females that fed on blood from different donors was evidenced (Table 1, Figure 1B). Similar conclusions were obtained if instead of carrying out the analysis on survival after the membrane blood meal the total adult lifespan since emergence was used (results not shown). Longevity was highly different between mosquito batches fed on different blood donors, with median day of death post membrane feeding ranging from six (blood donor 2) to 12 (blood donor 3), corresponding to 11 and 17 days post-emergence respectively. Longevity was also significantly affected by wing length and the quantity of haematin excreted (Table 1). The estimates indicated that the former relation is negative and the latter positive (not shown). This suggests a longer lifespan for the females that ingested more blood, while larger females died faster.

Fecundity

The proportion of females that did not develop any egg varied significantly among blood donors and was negatively influenced by blood meal size: females that feed more blood were more prone to develop at least one egg. In contrast, the proportion of females that did not develop any egg was not affected by the blood treatment

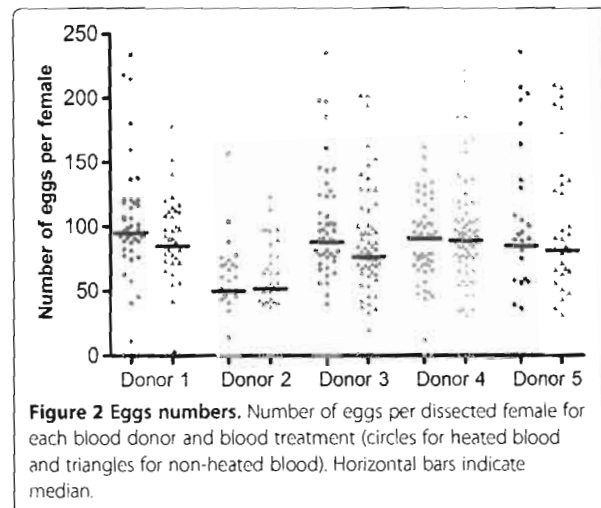


Figure 2 Eggs numbers. Number of eggs per dissected female for each blood donor and blood treatment (circles for heated blood and triangles for non-heated blood). Horizontal bars indicate median.

or female wing length (Table 2). For females that developed at least one egg, blood treatment did not affect the number of eggs developed by each female. There was significant variation among donors, the average number of eggs per female across patients ranging from 66 to 107 (Table 3, Figure 2). The number of eggs was also significantly larger in bigger females and females that ingested larger blood meals (Table 3).

Blood meal size

The analysis did not detect any effect of blood heat treatment on the quantity of blood ingested by female mosquitoes. However, the donor effect was significant (Table 4), suggesting that the blood meal size taken by the mosquitoes differs between blood donor.

Discussion

In the present study, it was investigated whether a heat treatment of human blood that mimics heat inactivation of *P. falciparum* gametocytes affects the fitness of the vector mosquitoes. Life history traits of *An. gambiae* females fed on parasite-free blood that was heat treated to that of females fed on not-treated blood were compared. The results revealed that heat treatment of the blood did not affect the survival and fecundity of mosquito females. Consistently, blood heat treatment did

Table 3 Statistical analysis of effects on number of eggs developed in *Anopheles gambiae*

| Source | DF | Sum of squares | F ratio | Prob > F |
|-----------------------------|----|----------------|---------|----------|
| Heat treatment | 1 | 1921.585 | 1.3775 | 0.2414 |
| Blood donor | 4 | 24304.107 | 4.3557 | 0.0019 |
| Heat treatment *Blood donor | 4 | 8354.035 | 1.4972 | 0.2027 |
| Wing length | 1 | 68160.616 | 48.8617 | <.0001 |
| Haematin | 1 | 3889.278 | 2.7881 | 0.0959 |

Analysis of variance of the number of eggs developed per female as a function of blood treatment, blood donor and their interaction, female wing length and haematin excreted (model R² = 0.24).

Table 4 Statistical analysis of effects on blood meal size in *Anopheles gambiae*

| Source | DF | Sum of squares | F ratio | Prob > F |
|-----------------------------|----|----------------|---------|----------|
| Heat treatment | 1 | 3.4092 | 0.0756 | 0.7835 |
| Blood donor | 4 | 1165.2930 | 6.4596 | <.0001 |
| Heat treatment *Blood donor | 4 | 346.0512 | 1.9183 | 0.1062 |

Analysis of variance of the quantity of haematin excreted as a function of blood treatment and blood donor (model $R^2 = 0.07$).

not affect the quantity of blood ingested. Then, it can be conjectured that heat inactivation of gametocyte-infected blood will only inhibit mosquito infection and that this method is suitable for quantifying the fitness cost incurred by mosquitoes upon an infection by *P. falciparum*.

Mosquito body size can affect both longevity and fecundity e.g. [21,28-30], either directly or indirectly through its potential effect on the quantity of ingested blood [31,32]. These variables were therefore included into the analysis. The results evidenced positive relations of both the body size, estimated by wing length, and the blood meal size, estimated from the quantity of haematin excreted, with the number of eggs developed. This confirms that bigger females and the ones that ingest more blood have higher fecundity, as previously observed in *An. gambiae* and other mosquito species [33-35]. Blood meal size was also found positively related to longevity but bigger females were found to die faster. This result indicates that nutritive resources of the blood meal are used by the mosquito females for survival; however there is no clear explanation for why larger females died faster in this experiment. A trade-off between fecundity and longevity could explain this relation, but the data did not support this hypothesis.

The present study revealed large variations in fecundity and longevity of mosquitoes between replicates. The replicates differed by the batch of mosquitoes, taken from same mosquito colony, the day of experiment, and the blood donor. It is therefore not possible to conclude whether differences are due to blood characteristics or uncontrolled variations in insectary conditions that affect mosquito fitness. Further experiments will be needed to determine the effect of human blood variations on mosquito fitness, which could be a key parameter of mosquito preference for blood feeding and then malaria transmission [36,37].

Conclusion

This study aimed at validating an accurate method for producing control non-infected mosquitoes to be compared with *P. falciparum*-infected mosquitoes for measures of life history traits. The blood heat treatment at 43°C for 15 min and 900 rpm, which was previously demonstrated to effectively hinder *P. falciparum* infectivity, does not affect mosquito longevity and fecundity.

Therefore, this method can be used to feed simultaneously mosquitoes on gametocyte-containing blood versus heat-inactivated blood from the same donor. This procedure will enable accurate characterization of the cost of *P. falciparum* infection incurred by mosquitoes while avoiding potentially confounding factors from parasites or blood donors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IS, BY carried out the experiments. IS drafted the manuscript. YM participated in the design of the study and carried out the statistical analysis. RD and IM participated in the design of the study. AC conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the French "Agence Nationale pour la Recherche" (ANR-06-MIME-001-01), from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreements N° 242095 and N° 223736. This work was also supported by a scholarship from DSF-IRD to IS.

Author details

¹Institut de Recherche en Sciences de la Santé-Direction Régionale de l'Ouest, Bobo Dioulasso, Burkina Faso. ²Institut de Recherche pour le Développement, Unité MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), BP 64501, Montpellier Cedex 5 34394, France. ³Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Yaoundé BP 288, Cameroon.

Received: 20 September 2012 Accepted: 29 December 2012
Published: 2 January 2013

References

1. Smith DL, McKenzie FE: Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar J* 2004, **3**:13.
2. Ferguson HM, Read AF: Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol* 2002, **18**:256-261.
3. Lambrechts L, Chavatte JM, Snounou G, Koella JC: Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc Biol Sci* 2006, **273**:1501-1506.
4. Vezilier J, Nicot A, Gandon S, Rivero A: *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc Biol Sci* 2012, **279**:4033-4041.
5. Ferguson HM, Mackinnon MJ, Chan BH, Read AF: Mosquito mortality and the evolution of malaria virulence. *Evolution* 2003, **57**:2792-2804.
6. Dawes EJ, Churcher TS, Zhuang S, Sinden RE, Basanez MG: *Anopheles* mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malar J* 2009, **8**:228.
7. Aboagye-Antwi F, Guindo A, Traore AS, Hurd H, Coulibaly M, Traore S, Tripet F: Hydric stress-dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild-caught *Anopheles gambiae* female mosquitoes. *Malar J* 2010, **9**:243.
8. Hogg JC, Hurd H: The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. *Parasitology* 1997, **114**(Pt 4):325-331.

9. Chege GM, Beier JC: **Effect of *Plasmodium falciparum* on the survival of naturally infected afrotropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 1990, **27**:454–458.
10. Robert V, Verhave JP, Carnevale P: ***Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *Anopheles gambiae*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990, **84**:346–347.
11. Bousema T, Drakeley C: **Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination.** *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**:377–410.
12. Lavazec C, Boudin C, Lacroix R, Bonnet S, Diop A, Thiberge S, Boisson B, Tahar R, Bourgoignie C: **Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine.** *Infect Immun* 2007, **75**:1635–1642.
13. Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C: *Science* 2010, **329**:1353–1355.
14. Ferguson HM, Rivero A, Read AF: **The influence of malaria parasite genetic diversity and anaemia on mosquito feeding and fecundity.** *Parasitology* 2003, **127**(Pt 1):9–19.
15. Blanford S, Read AF, Thomas MB: **Thermal behaviour of *Anopheles stephensi* in response to infection with malaria and fungal entomopathogens.** *Malar J* 2009, **8**:72.
16. Paaijmans KP, Blanford S, Bell AS, Blanford JL, Read AF, Thomas MB: **Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:15135–15139.
17. Mendes AM, Awono-Ambene PH, Nsango SE, Cohuet A, Fontenille D, Kafatos FC, Christophides GK, Morlais I, Vlachou D: **Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Infect Immun* 2011, **79**:4708–4715.
18. Mendes AM, Schlegelmilch T, Cohuet A, Awono-Ambene P, De Iorio M, Fontenille D, Morlais I, Christophides GK, Kafatos FC, Vlachou D: **Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000069.
19. Harris C, Morlais I, Churcher TS, Awono-Ambene P, Gouagna LC, Dabire RK, Fontenille D, Cohuet A: ***Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations.** *PLoS One* 2012, **7**:e30849.
20. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A: **Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP.** *Med Vet Entomol* 2002, **16**:461–464.
21. Takken W, Klowden MJ, Chambers GM: **Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small.** *J Med Entomol* 1998, **35**:639–645.
22. Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C, Petrarca V, Rosario Vdo E: **A mate or a meal?—pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of Sao Tome and Principe, West Africa.** *Malar J* 2003, **2**:9.
23. Mouline K, Mamai W, Agnew P, Tchoufienet M, Brengues C, Dabire R, Robert V, Simard F: **Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa).** *Med Vet Entomol* 2012, **26**:447–454.
24. Boudin C, Diop A, Gaye A, Gadiaga L, Gouagna C, Safeukuri I, Bonnet S: ***Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity in three areas with perennial or seasonal endemicity and different levels of transmission.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:1090–1095.
25. Charlwood JD: **Biological variation in *Anopheles darlingi* Root.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996, **91**:391–398.
26. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**:671–675.
27. Briegel H: **Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects.** *Experientia* 1980, **36**:1428.
28. Lehmann T, Dalton R, Kim EH, Dahl E, Diabate A, Dabire R, Dujardin JP: **Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*.** *Infect Genet Evol* 2006, **6**:410–416.
29. Ameshewa B, Service MW: **The relationship between female body size and survival rate of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Ethiopia.** *Med Vet Entomol* 1996, **10**:170–172.
30. Yaro AS, Dao A, Adamou A, Crawford JE, Traore SF, Toure AM, Gwadz R, Lehmann T: **Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms.** *J Med Entomol* 2006, **43**:833–839.
31. Mura T, Takahashi RM: **The fecundity of *Aedes nigromaculus* in the laboratory - effects of body weight and size of blood meal.** *Mosq News* 1972, **32**:417–421.
32. Albuquerque CM, Cavalcanti VM, Melo MA, Vercosa P, Regis LN, Hurd H: **Bloodmeal microfilariae density and the uptake and establishment of *Wuchereria bancrofti* infections in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999, **94**:591–596.
33. Briegel H: **Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria.** *J Med Entomol* 1990, **27**:839–850.
34. Briegel H: **Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*.** *J Insect Physiol* 1990, **36**:165–172.
35. Clements AN: *The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction.* Oxfordshire: Cabi Publishing; 2000.
36. Kelly DW: **Why are some people bitten more than others?** *Trends Parasitol* 2001, **17**:578–581.
37. Lyimo IN, Ferguson HM: **Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors.** *Trends Parasitol* 2009, **25**:189–196.

doi:10.1186/1475-2875-12-2

Cite this article as: Sangare et al.: Studying fitness cost of *Plasmodium falciparum* infection in malaria vectors: validation of an appropriate negative control. *Malaria Journal* 2013 **12**:2.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



susceptibility to infection in natural vector populations (Mitri and Vermick, 2012; Riehle et al., 2006) as well as parasite genotype \times mosquito genotype interactions on the success of *Plasmodium* infection in the vector (Harris et al., 2010; Lambrechts et al., 2005) are additional hints that infection imposes a fitness cost (Schmid-Hempel, 2003). Indeed, resistance and susceptibility alleles to different genotypes of parasites are predicted to be maintained in vector populations at frequencies that depend on the cost and the occurrence of infection (Tripet et al., 2008).

Several studies investigated whether *Plasmodium* infection induces fitness costs to their vector mosquitoes. Most of them were carried out in non natural combinations of vector–parasite species and a majority showed that infection affects the mosquito (Ferguson and Read, 2002b). The relevance of artificial species combinations in coevolutionary considerations is however questionable: evidence for contrasted interactions between artificial and natural vector–*Plasmodium* associations accumulates (Cohuet et al., 2006; Dong et al., 2006; Tahar et al., 2002) and several authors stressed the need for studying mosquito–*Plasmodium* interactions in natural species combinations (Boete, 2005; Tripet, 2009). In studies where *Plasmodium* infected their natural vector species, contradictory results on the cost of infection were found (Ferguson and Read, 2002b). Some studies did not reveal a *Plasmodium falciparum* infection cost in *Anopheles gambiae* (Chege and Beier, 1990; Robert et al., 1990), whereas others detected a reduced fecundity (Hogg and Hurd, 1997) or survival (Aboagye-Antwi et al., 2010) in infected mosquitoes compared to the non infected ones. Also, an indirect infection cost was observed for sporozoite infected females: infected mosquitoes increased their persistence in foraging behavior (Wekesa et al., 1992) and the associated risks of mortality due to the host defensive behavior (Anderson et al., 2000), likely as a consequence of a reduced saliva enzyme activity which may disturb blood ingestion (Rossignol et al., 1984). The contrasted results reported on the infection cost of *P. falciparum* in its natural vectors are likely to be due to difficulties to collect large numbers of infected mosquitoes in the wild and to compare them to non infected counterparts without precise method to age field caught mosquitoes (Aboagye-Antwi et al., 2010; Chege and Beier, 1990; Hogg and Hurd, 1997). One experiment used membrane feeding assays to obtain large numbers of experimentally infected mosquitoes of known age to be compared to non infected controls and did not reveal infection cost (Robert et al., 1990). However, infected and non infected ‘control’ mosquitoes were fed on blood from different donors, which is likely to induce differences in mosquito fitness unrelated to infection (Sangare et al., 2013) and may have potentially hidden a fitness cost. In the natural avian malaria system, *Plasmodium* infection induced mosquito mortality under condition of oviposition site deprivation or on nutritional stress (Lalubin et al., 2013; Zele et al., 2012). However, a decreased investment in fecundity when oviposition sites were provided could counteract and overcome the infection cost on survival, so that infected mosquito revealed an increased survival compared to the non infected ones, hence favoring parasite transmission (Vezilier et al., 2012). These contrasted results highlight the need to better understand the impact of *Plasmodium* parasites on their natural vectors, in particular for the most deadly parasite of humans, *P. falciparum*.

Anopheles–Plasmodium interactions, like any other host parasite interaction, are modulated by environmental conditions (Lefevre et al., 2013). It was established in the *An. gambiae–P. falciparum* system that infection outcome is conditioned by environmental variations such as temperature (Okech et al., 2004b), diet (Okech et al., 2004a) and microbial gut flora (Boissiere et al., 2012; Cirimotich et al., 2011b). Infection costs were also showed to be enhanced in stressful conditions for the mosquitoes in artificial species combinations (Ferguson and Read, 2002a; Lambrechts

et al., 2006) and a study using wild caught *An. gambiae* females suggested that *P. falciparum* infection imposes fitness cost under hydric stress conditions (Aboagye-Antwi et al., 2010). By acting on vector competence and fitness costs in *Anopheles–Plasmodium* interactions, environmental effects may participate in shaping the diversity of resistance to infection and explain patterns of infection (Tripet et al., 2008). However, most studies on mosquito malaria interactions were carried out in laboratory conditions standardized to maximize the mosquito fitness. It is therefore likely that the parasite-induced cost was so far underestimated (Ferguson and Read, 2002b).

In the field, there is increasing evidence that female anopheles use plant sugar as nutritional resource (Manda et al., 2007a,b; Muller et al., 2010). However there are large variations in vegetation availability across seasons, especially in sahelian regions where dry seasons impose harsh conditions for mosquitoes (Aboagye-Antwi et al., 2010). In the present study, we investigated the effect of exposition to and infection by field isolates of *P. falciparum* in one of their most important vector mosquitoes in the field, *Anopheles coluzzii*. To do this, we compared life history traits of mosquitoes fed on *P. falciparum* gametocyte containing blood samples from naturally infected patients and control mosquitoes fed on a non infectious control blood. To avoid the potential confounding effects of different blood origins for the infected and control treatments, control treatment mosquitoes were provided the same blood as infected mosquitoes though briefly heated. Indeed, it has been shown that heat treatment inhibits the infection (Mendes et al., 2011, 2008), which we also verified in this experiment; and we have previously shown that blood heat treatment did not affect mosquito survival nor fecundity (Sangare et al., 2013). The environmental effect on infection cost was explored by exposing the females to different conditions of sugar resources after blood feeding.

2. Material and methods

2.1. Mosquitoes

We used mosquitoes of the *An. gambiae* complex species recently named *An. coluzzii* (Coetzee et al., 2013). The colony was established from wild-caught gravid females collected in the vicinity of Bobo Dioulasso in 2008, Burkina Faso (Harris et al., 2012). Mosquitoes were maintained in the insectary under standard conditions (12 h day/night cycle, 28 ± 2 °C, $80 \pm 5\%$ humidity). Larvae were reared in plastic trays in local spring water changed every two days, and were fed *ad libitum* with TetraMin Baby. Pupae were collected in cups and placed in $30 \times 30 \times 30$ cm cages. Newly emerged adults were allowed to feed on a 5% glucose solution for 2 days and then starved for 24 h before blood feeding. Female mosquitoes were transferred in paper cups at least two hours before blood feeding.

2.2. *Plasmodium* isolates and mosquito membrane feeding

P. falciparum gametocytes were collected from naturally infected patients recruited in villages surrounding Bobo Dioulasso in Burkina Faso. To do this, thick blood smears were produced for 5–11 year old children. Asexual and sexual stages of *P. falciparum* were examined by light microscopy and gametocyte density was evaluated against 1000 white blood cells (WBC), assuming the standard number of 8000 WBC/ μ L of blood. After health examination of the selected gametocyte carriers, venous blood was collected. Experimental infections of *An. coluzzii* female mosquitoes were processed by membrane feeding with serum replacement as previously described (Bousema et al., 2012). Half of the

gametocyte-containing blood was treated to inhibit infectivity by heating at 43 °C for 15 min and 900 rpm in a thermo-mixer (control blood) while the remaining blood was maintained at 37 °C (infectious blood). This heat treatment was previously showed to fully inhibit gametocyte infectivity (Mendes et al., 2011, 2008) without affecting other blood characteristics relevant to mosquito fitness (Sangare et al., 2013), allowing comparison of mosquitoes fed on the same blood and preventing from confounding differences of mosquito fitness due to infection-independent blood meal quality (Emami et al., 2013; Sangare et al., 2013). Five hundred microliter of blood (infectious or control) were distributed in each membrane feeder maintained at 37 °C by circulating water. A minimum of two different feeders were used per group of mosquitoes (fed on infectious versus control blood) in order to limit a potential feeder effect. At least 60 mosquito females were exposed to each feeder for 30 min. Fed females were then sorted and placed in individual 30 ml plastic tubes for subsequent measures of life history traits. Because of logistic limitations, the membrane feeding with the blood from the different gametocyte carriers had to be carried out at different days and using different mosquito batches from the same colony. In the statistical analyses the effect "gametocyte donor" could thus be due to differences among parasite isolates including for instance density, genotypes, multiplicity of infection but also the characteristics of the blood of the donors, intrinsic differences of the different mosquito batches, date effects, or a combination of the above.

2.3. Life history traits

For all experiments, we chose to maintain the mosquitoes in individual tubes after blood meal. This prevents potential cage effects and allows considering each individual mosquito within experimental blocks as independent for statistical analysis. However, *Anopheles* barely lay eggs in individual plastic tubes and the number of developed eggs counted after dissection of ovaries was therefore used as a proxy of fecundity. Because *Anopheles* can resorb their eggs when subjected to oviposition site deprivation (Dieter et al., 2012), we could not use the females followed for survival to estimate fecundity. We thus measured these two life history traits on distinct individuals, which unfortunately did not allow us to statistically account for potential effects of a survival – fecundity trade-off.

2.3.1. Survival

In order to measure exposition and infection effects on mosquito survival, three day old female mosquitoes were exposed at their first blood meal to *P. falciparum* infection and compared to control females fed on the same blood but heat-treated for gametocyte inactivation. In a first experiment, all blood fed mosquitoes were provided cotton pads soaked with a 5% glucose solution on each individual tube, changed every day. This experiment included 5 gametocyte donors. In a second experiment, females fed on both infectious and control blood were divided into 3 groups in which they were provided either 5% glucose solution, 2.5% glucose solution or only water in soaked cotton pads changed every day. This second experiment included 3 gametocyte donors.

From the day of membrane blood feeding and until death of all mosquitoes, females were observed every eight hours. Dead females were immediately processed for determination of the infection status. For the females that died from the day of blood meal to 3 days later, midguts were isolated and homogenized in PBS solution. Ookinete/young oocysts were detected under fluorescent microscope by using FITC-labeled anti Pfs25 antibody in 0.05% Evans Blue as previously described (Crawford et al., 2012). For the females that died from the fourth day after the blood meal, midguts were dissected in a drop of 0.5% mercurochrome, mounted on slides under

a coverslip and examined by light microscopy to detect oocysts. In addition, for each female that died from day 8 post blood meal, the head and thorax were separated from the abdomen and used for sporozoite detection by PCR. To do this, DNA was isolated from mosquito head and thorax as previously described (Morlais et al., 2004). DNA quality was controlled by amplifying a fragment specific for the species of the *An. gambiae* complex (Fanello et al., 2002) and parasite detection was carried out by PCR, using *P. falciparum* mitochondrial DNA specific primers (F: 5'-GGAATGTTATTGCTAACAC-3', R: 5'-AATGAAGAGCTGTGTATC-3') (Morassin et al., 2002). Amplification of a 501 bp fragment was indicative of parasite DNA and the mosquito was then considered as infected. For females that fed heat-treated blood, midguts were examined by light microscopy for a subset of at least 20 individuals. None were found infected. For females used in the first experiment, wings were mounted on slides to measure their length. Wing size was measured from the alula to the wing tip, excluding scales as previously described (Charlwood, 1996). Moreover, to obtain a relative measure of blood meal size, fecal material of the blood fed females was dissolved from the plastic tubes in 1% lithium carbonate solution. The amount of hematin, a by-product of the decomposition of hemoglobin, was estimated by measuring absorbance of the mixture compared with a standard curve made with porcine serum hematin (Sigma-Aldrich) (Briegel, 1980).

2.3.2. Fecundity

From previous measures of fecundity in *Anopheles*, it was noticed that a large proportion of *Anopheles* females do not complete egg maturation after the first blood meal, whereas most females are able to fully develop their eggs at subsequent blood meals (Charlwood et al., 2003; Mouline et al., 2012; Sangare et al., 2013; Takken et al., 1998). This was interpreted as a compensation mechanism for nutritional deficiencies carried over from larval life (Takken et al., 1998). For this reason, we made the assumption that the second gonotrophic cycle is more representative of female fecundity along its lifespan than the first one and egg production was observed after the second blood meal. Females used to estimate fecundity were fed on rabbit blood on the third day after emergence and on human infectious versus control blood the sixth day of adult life. Female mosquitoes were processed four days later. We chose that time point to estimate at the same time the number of developed eggs and the number of oocysts in each mosquito. Indeed, at this time, corresponding to the average gonotrophic duration time in nature (Afrane et al., 2005), egg resorption is not expected to affect egg batch size whereas oocysts are visible by light microscopy (Aboagye-Antwi et al., 2010). Midguts were dissected in a drop of 0.5% mercurochrome, mounted on slides under a coverslip and examined by light microscopy to detect oocysts. Ovaries were dissected and mature eggs (Christopher's stage V) were counted. Wing length and quantity of excreted hematin were also measured for each individual as described above. This experiment included 3 gametocyte donors.

2.4. Statistical analyses

We categorized individuals to "controls", "exposed" and "infected", depending on their infection status after the blood meal. We considered as "controls" individuals which took a heated blood meal, i.e., individuals which could not have been infected by *Plasmodium*. We called "infected" individuals those fed on non-heated blood and which were *a posteriori* found to be infected either through oocyst counts or through PCR at later stages. Finally we considered as "exposed" individuals which fed on non-heated blood but were not found infected *a posteriori*.

To investigate whether infection affects mosquito survival we calculated Kaplan–Meier survival estimates from female

longevities after the blood meal and tested the effects of gametocyte donor, infection status and their interactions using the Cox Proportional Hazards model. The wing length and the quantity of excreted hematin were used as covariables after being reduced and centered. To estimate the effect of nutritional resource restriction after blood meal in interaction with infection on mosquito survival, we calculated Kaplan–Meier survival estimates from female longevities after the blood meal and tested the effects of gametocyte donor, glucose availability/concentration, infection status and their interactions using the Cox Proportional Hazards model.

We then investigated the effect of infection on mosquito fecundity. A number of females which took a blood meal did not develop any egg. We first looked whether gametocyte donor, infection status and their interactions affected the probability that a female will not develop any eggs using logistic regressions. We subsequently considered only females which developed at least one egg, and used linear models to look at the effects of gametocyte donor, infection status and their interactions on the number of eggs developed by each female. Because fecundity may depend on the size of the blood meal and the body size of the females, the wing length and the quantity of excreted hematin were used as covariables after being reduced and centered.

In the analyses, the gametocyte donor effect is considered as fixed. The choice of this option was done because (i) fixed effects models are easier to present than mixed effects models; (ii) when declaring the gametocyte donor effect and its interaction with the infection as random effects, similar conclusions were always reached; (iii) the small number of gametocyte donors (three to five) legitimately questions whether they can be considered as a representative sample of the gametocyte donor population.

3. Results

3.1. Survival

The first experiment investigated the effect of *P. falciparum* infection on *An. coluzzii* survival when sugar was provided after membrane feeding. It included 596 females followed for survival after the blood meal and maintained with 5% glucose solution. Five gametocyte-containing blood samples, named A, B, C, D and E, were used with gametocyte densities ranging from 72 to 296 gametocytes/ μ L (Table 1). Among the females fed on infectious blood samples, 192 were subsequently found infected whereas 94 females, exposed to the same infectious blood, were found non-infected *a posteriori*. 310 Females fed on corresponding non infectious heated blood samples were used as controls. The Cox proportional hazards model revealed significant effects

Table 2

Analysis of the effects of gametocyte donor, infection, their interaction, wing length and quantity of excreted hematin on female mosquito survival using the Cox Proportional Hazards model.

| Source | DF | χ^2 | P value |
|------------------------------|----|----------|---------------------|
| Gametocyte donor | 4 | 32.81 | <.0001 ^a |
| Infection | 2 | 8.61 | 0.0135 ^j |
| Gametocyte donor * infection | 8 | 20.59 | 0.0083 ^d |
| Hematin | 1 | 2.55 | 0.1105 |
| Wing length | 1 | 7.57 | 0.0059 ^d |

^a Indicates significant effect of parameters or interactions (P < 0.05).

of gametocyte donor, infection status and the interaction between them, as well as wing length (Table 2). The significant gametocyte donor * infection interaction is due to the fact that the rank of the average female survival changed depending on gametocyte donor: infected females which fed on blood from gametocyte donor B had a higher survival than uninfected ones, whereas infected females fed on blood from the other gametocyte donors had either the same or lower survival than controls; exposed but non infected females had a lower or similar survival than controls (Fig. 1). Analysis per gametocyte donor indicated a significant infection effect for 3 out of 5 assays (with donors A, C and E), one with similar survival for infected and non exposed controls (A) and two assays with a reduced survival for infected females compared to their controls (C and E). Exposed but non infected individuals showed either reduced or similar survival compared to control mosquitoes. The estimates indicated a negative relation between wing length and survival suggesting that larger females died faster. Although such a relation is not explained so far, it is consistent with previous observations (Sangare et al., 2013) and may be the result of a trade-off between survival and fecundity.

The second experiment included glucose deprivation in combination with infection. A total of 326 infected females fed on 3 different infectious blood samples (named F, G, H) containing 80–600 gametocytes/ μ L (Table 1), were compared to 162 exposed but not infected females and 500 females fed on the corresponding non infectious control blood samples. The Cox proportional hazards model revealed significant effects of glucose treatment, infection status, the interaction between the glucose treatment and gametocyte donor and the interaction between glucose treatment and infection status (Table 3). Infected and exposed females showed respectively a 31% and 24% higher risk of dying than control females; individuals that did not receive any glucose after the blood meal are 5.5 times as likely to die as individuals which received 2.5% glucose solution and 9.1 times as likely to die as individuals which received 5.0% glucose solution; females

Table 1

Blood stage parasite densities and infectivity to mosquitoes for each gametocyte donor. Prevalence of infection is the proportion of mosquitoes found infected either at oocyst or porozoite stages. Mean numbers of oocysts were estimated after dissecting mosquito midguts from day 4 to 7 after infectious blood feeding. n: number of mosquitoes dissected.

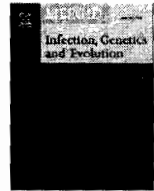
| Donor ID | Experiment | Trophozoite density (nb/ μ L) | Gametocyte density (nb/ μ L) | n | Prevalence of infection (95% CI) | Mean number of oocysts at day 4–7 (95% CI) |
|----------|------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----|----------------------------------|--|
| A | Survival 1 | 0 | 88 | 107 | 86.2 (75.9–93.4) | 15.5 (10.5–20.6) |
| B | Survival 1 | 736 | 296 | 116 | 76.2 (64.5–85.7) | 34.4 (22.5–45.5) |
| C | Survival 1 | 0 | 72 | 120 | 58.1 (45.1–70.4) | 7.0 (4.4–9.7) |
| D | Survival 1 | 0 | 152 | 156 | 60.0 (48.8–70.5) | 37.8 (15.1–64.7) |
| E | Survival 1 | 0 | 216 | 97 | 36.3 (24.6–49.3) | 7.0 (4.2–10.0) |
| F | Survival 2 | 800 | 600 | 400 | 68.1 (61.9–73.9) | 24.1 (19.3–29.4) |
| G | Survival 2 | 1600 | 128 | 337 | 54.1 (47.1–61.0) | 8.7 (6.0–11.7) |
| H | Survival 2 | 0 | 80 | 251 | 40 (32.5–47.7) | 2.5 (1.8–3.38) |
| I | Fecundity | 0 | 952 | 131 | 84.8 (74.2–91.5) | 201.0 (166.8–237.7) |
| J | Fecundity | 400 | 256 | 227 | 75.0 (66.6–81.9) | 21.0 (17.5–24.8) |
| K | Fecundity | 0 | 96 | 163 | 32.7 (21.8–45.9) | 3.0 (1.66–4.88) |
| L | Fecundity | 0 | 416 | 144 | 61.0 (50.0–71.3) | 18.4 (13.53–23.89) |



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



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

I. Sangare^{a,b}, R. Dabire^a, B. Yameogo^a, D.F. Da^{a,b}, Y. Michalakis^{b,1}, A. Cohuet^{a,b,*}

^aInstitut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale, 399 avenue de la liberté, 01 BP 545 Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2014
Received in revised form 1 April 2014
Accepted 8 April 2014
Available online xxx

Keywords:
Malaria transmission
Vector–parasites interactions
Environment
Infection cost
Mosquito fitness

ABSTRACT

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

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

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

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Unraveling selective forces that shape vector–parasite interactions is of critical interest for malaria control. It may help understanding the outcome of infection of mosquito vectors (Tripet et al., 2008) which may, in turn, improve predictions of transmission blocking strategies' efficacy (Churcher et al., 2012). Further, understanding the processes that maintain genetic diversity in mosquito immune systems is necessary to interpret signatures of genetic selection by mosquito pathogens (Cohuet et al., 2008; Crawford et al., 2012; Obbard et al., 2008) and potentially allow identification of genes implicated in defenses against such parasites. Moreover, as genetic manipulation of mosquitoes to make them refractory to *Plasmodium* infection progresses (Dong et al., 2011; Isaacs et al., 2011) and genetic drive systems

able to spread genes become sophisticated (Sinkins and Gould, 2006), consideration of evolutionary costs in mosquito–malaria parasites interactions remains an essential prerequisite for strategies aiming to spread refractory genes in natural vector populations (Cirimotich et al., 2011a; Koella, 2003; Koella and Zaghoul, 2008).

In spite of the epidemiological importance of malaria, studies on evolutionary forces in mosquito–*Plasmodium* interactions still suffer an important gap of knowledge. Indeed, it remains unclear whether *Plasmodium* infection induces a fitness cost to the mosquito vectors. Because *Plasmodium* transmission obligatorily relies on female mosquito gonotrophic cycles, it is conventional to assume that malaria parasites may evolve towards an innocuous relationship with their vectors. This implies a strong selective pressure on malaria parasites to not reduce the mosquito fitness especially on the crucial trait for vector disease transmission which is survival (Smith and McKenzie, 2004). However, the extensive immune response developed upon *Plasmodium* invasion (Dong et al., 2006; Mendes et al., 2008) is indicative of a benefit for the mosquito to limit or clear the infection. This suggests that *Plasmodium* infection causes damages to the vector and justifies an investment in immune response, itself expected to be costly (Moret and Schmid-Hempel, 2000). Moreover, polymorphisms in

* Corresponding author at: Institut de Recherche pour le Développement, unité MIVEGEC (UM1-UM2-CNRS 5290-IRD 224), 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 (0) 4 67 41 63 23.

E-mail addresses: babaibrasangare@yahoo.fr (I. Sangare), dabire_roch@hotmail.com (R. Dabire), vamkbienvendue@yahoo.fr (B. Yameogo), dafrenick@yahoo.fr (D.F. Da), yannis.michalakis@ird.fr (Y. Michalakis), anna.cohuet@ird.fr (A. Cohuet).

¹ Equally contributed.

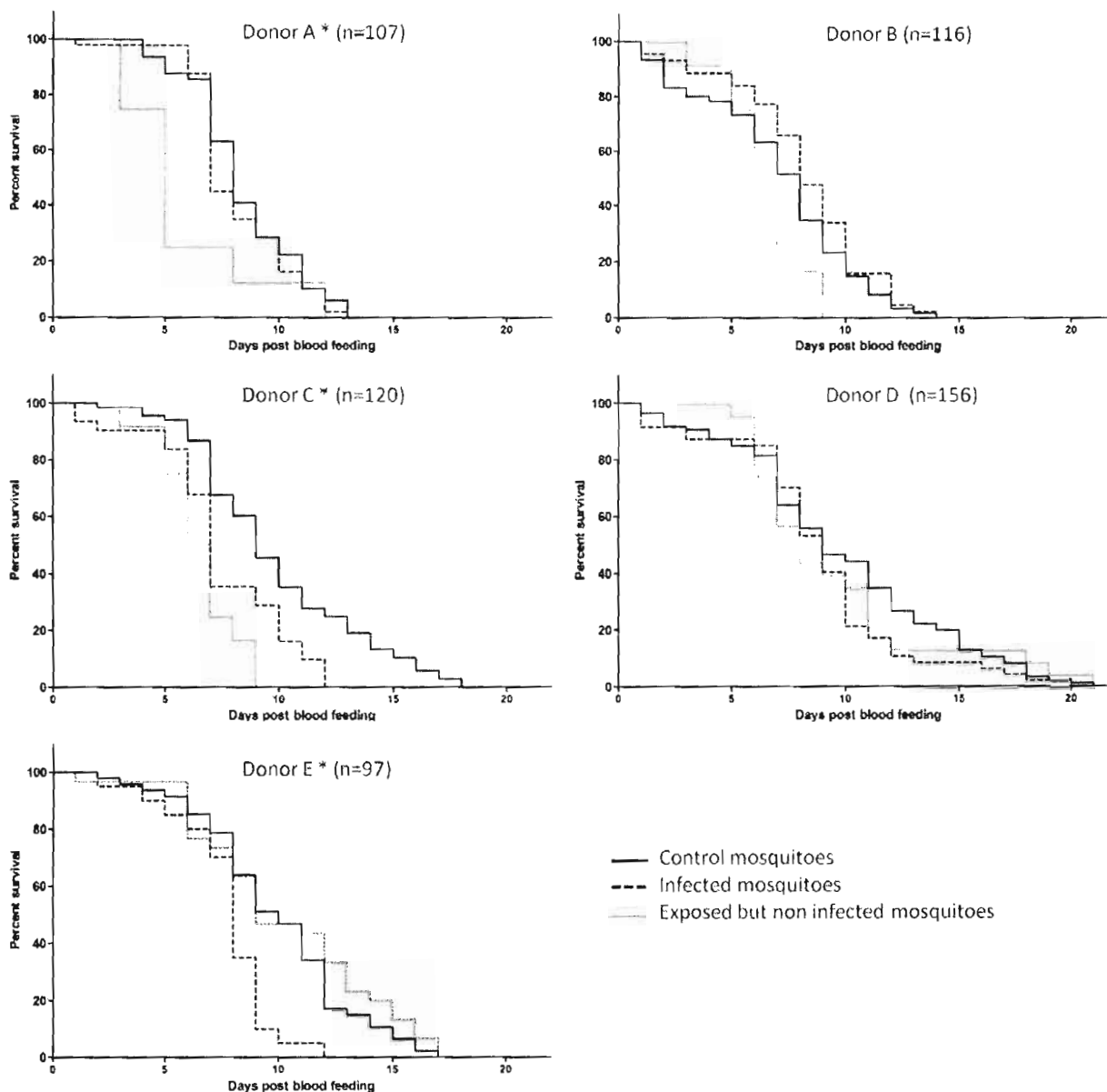


Fig. 1. Kaplan-Meier estimates of survival of female mosquitoes after a blood meal as a function of whether the mosquitoes were infected (dashed lines), exposed but non infected (thin dotted lines) or not exposed to infection (full lines) for five gametocyte donors. *Indicates significant difference between the curves ($P < 0.05$), n indicates the number of mosquitoes observed in the assay.

Table 3

Analysis of the effects of infection status, glucose treatment, gametocyte donor and their interactions on female mosquito survival using the Cox Proportional Hazards model.

| Source | DF | X ² | P value |
|--|----|----------------|---------------------|
| Glucose | 2 | 343.34 | <.0001 ^a |
| Gametocyte donor | 2 | 2.90 | 0.2345 |
| Infection | 2 | 12.16 | 0.0023 ^a |
| Glucose * gametocyte donor | 4 | 12.76 | 0.0125 ^a |
| Glucose * infection | 4 | 11.64 | 0.0202 ^a |
| Gametocyte donor * infection | 4 | 4.24 | 0.3745 |
| Glucose * gametocyte donor * infection | 8 | 10.33 | 0.2424 |

^a Indicates significant effect of parameters or interactions ($P < 0.05$).

415 which received 2.5% glucose solution are 1.66 times as likely to
 4 die as those which received 5% glucose solution (Fig. 2). The sig-
 4 nificant glucose * donor interaction is due to the fact that the

intermediate concentration of glucose (2.5%) induced either an 418
 intermediate average per donor female survival (donor F) or only 419
 slightly reduced the lifespan compared to the females that 420
 received 5% glucose (donors G and H). The glucose * infection 421
 status interaction is due to the fact that the rank of the average 422
 female survival changed depending on glucose concentration or 423
 availability: infected females which received only water had a 424
 lower survival than uninfected counterparts for the three blood 425
 donors whereas infected females which received sugar solutions 426
 revealed similar survival than controls (e.g., Donor F, water versus 427
 5% glucose solution). Analysis per gametocyte donor and glucose 428
 concentration indicated no significant infection effect for the 6 429
 assays when 5% or 2.5% glucose solution was provided, and sig- 430
 nificant infection effect for the 3 assays when females received 431
 only water, with each time a reduced survival for infected 432
 females compared to their control non exposed counterparts and 433

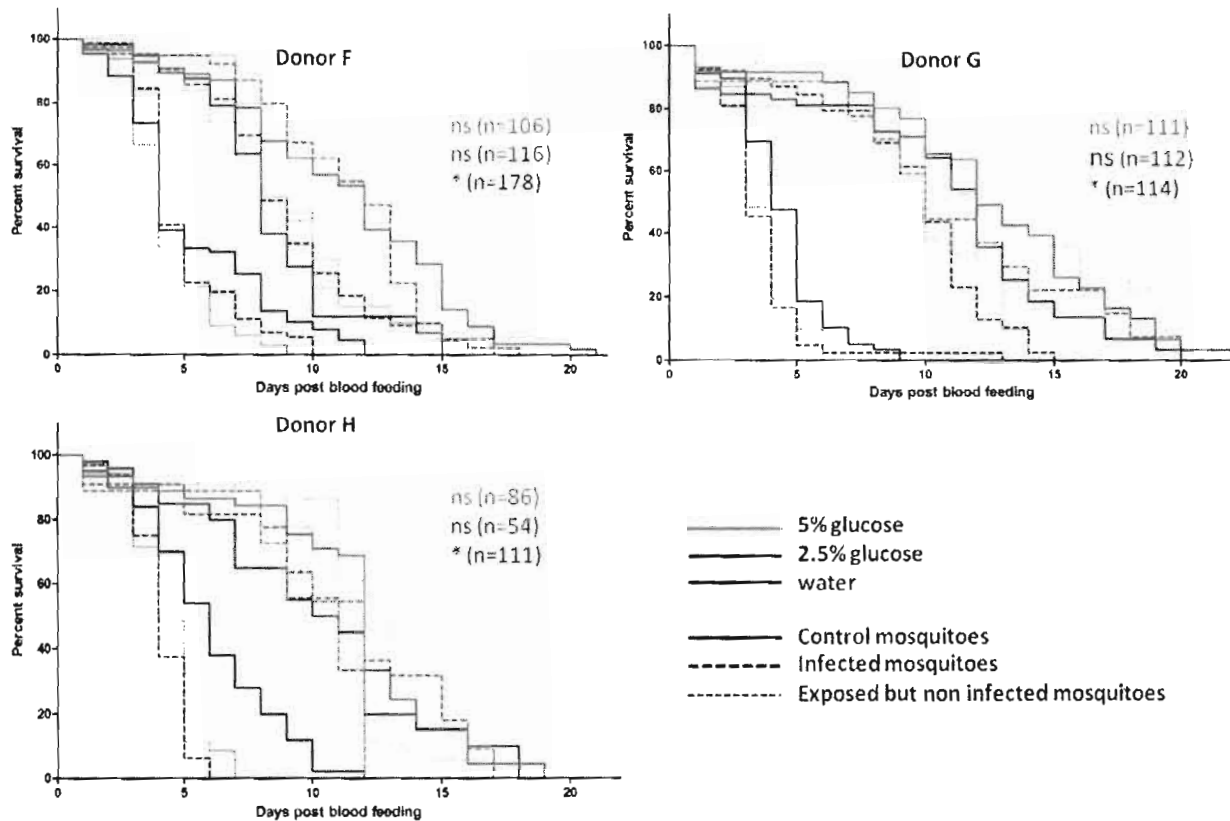


Fig. 2. Kaplan-Meier estimates of survival of female mosquitoes after a blood meal as a function of whether the mosquitoes were infected (dashed lines), exposed but non infected (thin dotted line) or not exposed to infection (full lines) for three gametocyte donors and sugar availability: 5% glucose solution (green), 2.5% glucose solution (red) or only water (blue) after blood meal. *Indicates significant infection status effect ($P < 0.05$), ns indicates non significant infection status effect, n indicates the number of mosquitoes observed in the assay. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

similar survival of the infected females compared to the exposed but non infected mosquitoes.

3.2. Fecundity

To investigate the effect of *P. falciparum* infection on the fecundity of vector mosquitoes, we analyzed 208 infected, 119 exposed but non infected and 338 control females exposed to infectious versus non infectious blood from 4 gametocyte donors (named I, J, K, L) containing from 96 to 952 gametocytes/ μL (Table 1). The number of females that did not develop any eggs was low (less than 10) for females which fed on blood from all donors except for donor I for which 73 out of 131 females did not develop any eggs. We considered only females which fed on this blood to examine whether the probability to develop at least one egg was affected by their infection status, the size of the blood meal they had taken or the body size. The analysis showed that neither infection status ($X^2 = 2.19$; $df = 2$; $p = 0.33$) nor body size ($X^2 = 0.88$; $df = 1$; $p = 0.35$) affected that probability. The size of the blood meal, as estimated through the quantification of hematin, did affect this probability ($X^2 = 22.58$; $df = 1$; $p < 0.001$) in an unexpected way: females which took a smaller blood meal had a higher probability to develop eggs.

We then investigated the effects of gametocyte donor, infection and their interaction, with wing length and quantity of hematin used as covariables on egg development. We only considered females that developed at least one egg. Among the exposed females for donor I, only 2 developed at least one egg; we therefore excluded this donor from this analysis. The model revealed a

Table 4

Analysis of the effects of infection, gametocyte donor, their interaction, wing length and quantity of excreted hematin on female mosquito fecundity.

| Source | DF | Sum of squares | F ratio | Prob > F |
|------------------------------|----|----------------|---------|---------------------|
| Gametocyte donor | 2 | 58,063.50 | 13.0642 | <.0001 ^a |
| Infection | 2 | 20,306.88 | 4.5690 | 0.0108 ^a |
| Gametocyte donor * infection | 4 | 115,827.16 | 13.0305 | <.0001 ^a |
| Hematin | 1 | 15,966.67 | 7.1850 | 0.0076 ^a |
| Wing length | 1 | 115,529.15 | 51.9878 | <.0001 ^a |

^a Indicates significant effect of parameters or interactions ($P < 0.05$).

highly significant effect of the donor * infection interaction (Table 4): control individuals developed approximately the same number of eggs independently of the blood donor they fed on. However, the fecundity of infected and exposed individuals varied

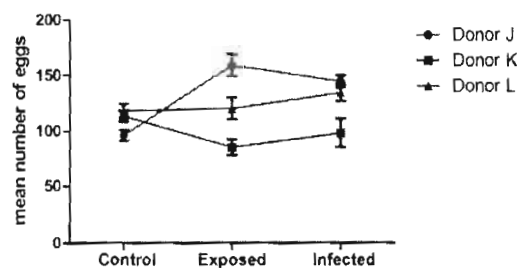


Fig. 3. Mean number of eggs developed depending on their infection status for *Plasmodium falciparum* in mosquitoes fed on blood from 3 gametocyte donors. Vertical bars indicate standard errors.

largely as a function of the blood donor: infected and exposed females had higher numbers of eggs than controls for 2 donors (donors J and L), whereas control females had more eggs than infected and exposed ones for donor K (Fig. 3). For the 3 donors, exposed and infected mosquitoes had the same number of eggs. The quantity of hematin and wing length both affected fecundity (Table 4), showing that bigger females and females that ingested more blood developed more eggs.

4. Discussion

By using membrane feeding on *P. falciparum* naturally infected blood by natural malaria vector mosquitoes, we produced a large number of infected mosquitoes under controlled conditions, such that they could be compared to exposed but non infected and to control counterparts. By using heat inactivated gametocytes containing blood as negative control, we were able compare life history traits between mosquitoes that were all fed on the same blood. This avoids potential confounding effects due to infection-independent differences in blood quality among donors which may induce differences in mosquito fitness (Emami et al., 2013; Sangare et al., 2013).

The results of our study showed that *An. coluzzii* females exposed and subsequently infected by field isolates of *P. falciparum* as well as exposed but non infected females incur a fitness cost with a reduced survival dependent on nutritional resources. When a glucose solution was available after blood feeding, the effect on survival varied between blood donors from no detected effect of infection and exposition to a reduced survival in exposed-infected mosquitoes compared to non exposed counterparts. In contrast, when no nutritional resource was provided after the blood meal, all the assays showed reduced survival of infected and exposed females. Infection and exposition effects on fecundity were more complex with either increased or decreased number of eggs relative to control depending on the blood donor. This unexplained pattern for fecundity may be due to trade-offs between survival and fecundity (Dao et al., 2010), which could not be measured here because of the refractoriness of *An. coluzzii* to lay eggs in individual tubes.

The present study strongly supports previous results from naturally infected mosquitoes which suggested a *P. falciparum* infection associated mortality under hydric stress (Aboagye-Antwi et al., 2010). In this study, by using wild caught mosquitoes, the authors could not presume of mosquito age, whether uninfected mosquitoes had been previously exposed to *P. falciparum* or not, or any other parameters of the mosquito life history. Moreover, sample sizes were limited because of difficulties to collect large numbers of infected vectors in the wild (Aboagye-Antwi et al., 2010). In our experiment, by using mosquitoes originated from the local vector population but reared in an insectary, we were able to compare a large number of individuals of same age, reared under similar conditions, fed on the same blood and exposed or not to *Plasmodium* infection. By investigating the cost of infection under several conditions of nutritional resources, we evidenced environmental effects on *An. coluzzii* – *P. falciparum* interactions. Absence of nutritional resources after the infectious blood meal enhanced the infection cost. Although, the unavailability of nutritional resources, as sugar or blood meal, may not be frequent in natural settings or limited to specific seasons and areas, our results highlight the increased susceptibility to stress of exposed and infected mosquitoes compared to non exposed counterparts and suggest competition for nutritional resources between the host and the parasites. This is consistent with recent findings showing that *P. falciparum* increases sugar attraction and uptake in *An. gambiae* (Nyasembe et al., 2014). Our experiments carried in insectary conditions are likely to minimize infection costs. Indeed, in nature,

mosquitoes are likely to incur multiple kinds of stress such as defensive behavior of the hosts, predation, desiccation, multiple microbial infection or exposure to pesticide, which may enhance infection costs in the field. It can also be hypothesized that mosquitoes may compensate infection costs in the field in ways that were not available in the insectary. Therefore, further studies should aim at investigating the cost of *P. falciparum* infection in its natural vectors under various environmental conditions to give a broader picture of the interactions between malaria parasites and vectors.

Our results showed that infected females but also females that were exposed to the parasites without a *a posteriori* infection incur a fitness cost. This suggests that females exposed to infectious gametocytes mounted an immune response efficient to clear the infection but also that this resistance was costly. This is consistent with previous studies in insects showing that immune response in insects, including mosquitoes, reduces fitness (Ahmed and Hurd, 2006; Moret and Schmid-Hempel, 2000; Schwartz and Koella, 2004; Sheldon and Verhulst, 1996). By using heated gametocyte containing blood as negative control, we inhibited the infection in control mosquitoes. However, one cannot exclude that the presence of parasites in the control blood, although inactivated, may trigger an immune response (Akman-Anderson et al., 2007; Arrighi et al., 2009; Lim et al., 2005; Pakpour et al., 2012). Control mosquitoes would then incur part of the immune response cost, which would minimize the measured exposition–infection effects when comparing exposed and infected mosquitoes to controls. This suggests that our protocol may have underestimated the cost of *P. falciparum* exposition and infection in *An. coluzzii*.

In our experiments, the different parasite isolates produced different levels of infections. The number of parasites was however not included in the analyses because the infection was measured at different times after blood ingestion, which does not allow comparison due to large variations in parasite numbers along sporogony (Dawes et al., 2009). However, the mean number of oocysts in a window of four days gives a relative infection intensity resulting from the different infectious blood samples (Table 1). We did not observe an obvious relation between the intensity of infection and the effect on survival: the blood samples from donors A, C and E for which infection or exposition had significant effects on survival induced infection intensities that were intermediate (mean oocyst number per midgut from 7 to 15) among the infections intensities produced in this study (mean oocysts number per midgut from 2.5 to 201). In contrast, one blood sample (donor I) produced an infection intensity much higher than the other ones (mean oocysts number per midgut = 201, CI 166.8–237.7) and a large proportion of mosquitoes that fed on this blood did not develop any eggs. Additional feeding assays using high infective doses would be needed to investigate if high infection intensities have an effect on the proportion of females that develop eggs. Considering the number of developed eggs among females that developed at least one egg, a reduced fecundity was observed with lowest infection intensity (Donor K) whereas higher infection intensities were associated to increased number of developed eggs (Donors J and L). However we cannot conclude if infection intensity was a determinant of the effect of infection on mosquito fitness. Indeed, other parameters than infection intensity can vary between parasite isolates and cannot be distinguished here from infective dose. For instance, different results obtained from the replicates using different blood samples may be explained by genetic differences among parasite isolates, including multiplicity of infection. Because membrane feeding must take place during the minutes following blood drawing, it is not possible to use the same blood for several replicates separated in the time. Also, the large number of mosquitoes needed to test the effect of one parasite isolate

makes tricky to test several blood isolates at the same time. For these reasons due to field work related limitations, we cannot distinguish parasite isolate effects from experimental block effects and we can only state that parasite genetics is one of the potential sources of variation between assays.

By affecting the survival of their vectors, *P. falciparum* parasites may exert an important selective pressure. The frequency at which infection in wild vector population occurs is also an important determinant of selective pressure from parasite infection. The sporozoite rates found in natural vector populations are barely above 5% (Antonio-Nkondjio et al., 2002; Drakeley et al., 2003). This intuitively suggests that only a small proportion of mosquitoes are in contact with the parasites. However, taking into account the daily survival rate (Costantini et al., 1996), the duration of sporogonic development (Vaughan et al., 1992), and the existence of resistance to infection (Niare et al., 2002; Riehle et al., 2006), the proportion of mosquitoes that ingest infectious parasites at some point may be important in endemic areas. In the other hand, because of the long duration of sporogony of *P. falciparum* in regards to mosquito lifespan, affecting mosquito longevity may drastically impact vectorial capacity (Smith and McKenzie, 2004), suggesting that the parasite is under a strong selective pressure to not reduce its host survival. This is contrasting with the reduced survival we observed for infected mosquitoes compared to the non infected ones. All together, this suggests that the cost of infection by *P. falciparum* in its natural vector may have major importance in shaping the mosquito – parasites interactions.

In conclusion, we evidenced fitness costs induced by an exposition and infection by *P. falciparum* field isolates on *An. coluzzii* mosquitoes colonized from the local vector population. When sugar was available after the infectious blood meal, the infection effect on survival and fecundity depended on the blood sample used. Under conditions of nutritional stress, without any energetic resource after the infectious blood, the survival was reduced for exposed and infected mosquitoes. We therefore provide here evidence of an environment dependant reduced survival in mosquitoes exposed to infection, in a natural and the most important to human health malaria mosquito species association. Identification of the mechanisms involved in the cost of infection may have crucial implications in malaria control by highlighting specific weaknesses of infected malaria vectors that would help design vector control measures specifically targeting infected mosquitoes.

Acknowledgments

This study was funded by the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007–2013) under grant agreements Nos. 242095 and 223736. The authors acknowledge support from CNRS, IRD and the Laboratoire Mixte International LAMIVECT, Bobo Dioulasso, Burkina Faso. This work was also supported by a fellowship from DSF-IRD to I.S.

References

Aboagye-Antwi, F., Guindo, A., Traore, A.S., Hurd, H., Coulibaly, M., Traore, S., Tripet, F., 2010. Hydric stress-dependent effects of *Plasmodium falciparum* infection on the survival of wild-caught *Anopheles gambiae* female mosquitoes. *Malar. J.* 9, 243.

Arfane, Y.A., Lawson, B.W., Githeko, A.K., Yan, G., 2005. Effects of microclimatic changes caused by land use and land cover on duration of gonotrophic cycles of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in western Kenya highlands. *J. Med. Entomol.* 42, 974–980.

Ahmed, A.M., Hurd, H., 2006. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes Infect.* 8, 308–315.

kman-Anderson, L., Olivier, M., Luckhart, S., 2007. Induction of nitric oxide synthase and activation of signaling proteins in *Anopheles* mosquitoes by the malaria pigment, hemozoin. *Infect. Immun.* 75, 4012–4019.

Anderson, R.A., Knols, B.G., Koella, J.C., 2000. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitology* 120, 329–333.

Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P., Toto, J.C., Meunier, J.Y., Zebaze-Kemleu, S., Nyambam, R., Wondji, C.S., Tchuinkam, T., Fontenille, D., 2002. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J. Med. Entomol.* 39, 350–355.

Arighi, R.B., Debierre-Grockiego, F., Schwarz, R.T., Faye, I., 2009. The immunogenic properties of protozoan glycosylphosphatidylinosols in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 216–223.

Boete, C., 2005. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol.* 21, 445–447.

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.

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., 2012. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One* 7, e42821.

Briegleb, H., 1980. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia* 36, 1428.

Charlwood, J.D., 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 391–398.

Charlwood, J.D., Pinto, J., Sousa, C.A., Ferreira, C., Petrarca, V., Rosario Vdo, E., 2003. 'A mate or a meal' – pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of Sao Tome and Principe, West Africa. *Malar. J.* 2, 9.

Chege, G.M., Beier, J.C., 1990. Effect of *Plasmodium falciparum* on the survival of naturally infected afro-tropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 27, 454–458.

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, 1037–1044.

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, 855–858.

Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., della Torre, A., Coulibaly, M., Besansky, N., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619.

Cohuet, A., Osta, M.A., Morlais, I., Awono-Ambene, P.H., Michel, K., Simard, F., Christophides, G.K., Fontenille, D., Kafatos, F.C., 2006. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285–1289.

Cohuet, A., Krishnakumar, S., Simard, F., Morlais, I., Koutsos, A., Fontenille, D., Mindrinos, M., Kafatos, F.C., 2008. SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. *BMC Genomics* 9, 227.

Costantini, C., Li, S.G., Della Torre, A., Sagnon, N., Coluzzi, M., Taylor, C.E., 1996. Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a west African Sudan savanna village. *Med. Vet. Entomol.* 10, 203–219.

Crawford, J.E., Bischoff, E., Garnier, T., Gnome, A., Eiglmeier, K., Holm, I., Riehle, M.M., Guelbeogo, W.M., Sagnon, N., Lazzaro, B.P., Vernick, K.D., 2012. Evidence for population-specific positive selection on immune genes of *Anopheles gambiae*. *G3 (Bethesda)* 2, 1505–1519.

Dao, A., Kassogue, Y., Adamou, A., Diallo, M., Yaro, A.S., Traore, S.F., Lehmann, T., 2010. Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 47, 769–777.

Dawes, E.J., Zhuang, S., Sinden, R.E., Basanez, M.G., 2009. The temporal dynamics of *Plasmodium* density through the sporogonic cycle within *Anopheles* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1197–1198.

Dieter, K.L., Huestis, D.L., Lehmann, T., 2012. The effects of oviposition-site deprivation on *Anopheles gambiae* reproduction. *Parasit Vectors* 5, 235.

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, 513–525.

Dong, Y., Das, S., Cirimotich, C., Souza-Neto, J.A., McLean, K.J., Dimopoulos, G., 2011. Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. *PLoS Pathog.* 7, e1002458.

Drakeley, C., Schellenberg, D., Kihonda, J., Sousa, C.A., Arez, A.P., Lopes, D., Lines, J., Mshinda, H., Lengeler, C., Armstrong Schellenberg, J., Tanner, M., Alonso, P., 2003. An estimation of the entomological inoculation rate for Ifakara: a semi-urban area in a region of intense malaria transmission in Tanzania. *Trop. Med. Int. Health* 8, 767–774.

Emami, S.N., Ranford-Cartwright, L.C., Ferguson, H.M., 2013. The impact of low erythrocyte density in human blood on the fitness and energetic reserves of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 12, 45.

Fanello, C., Santolamazza, F., della Torre, A., 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med. Vet. Entomol.* 16, 461–464.

- Ferguson, H.M., Read, A.F., 2002a. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc. Biol. Sci.* 269, 1217–1224.
- Ferguson, H.M., Read, A.F., 2002b. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol.* 18, 256–261.
- Harris, C., Lambrechts, L., Rousset, F., Abate, L., Nsango, S.E., Fontenille, D., Morlais, I., Cohuet, A., 2010. Polymorphisms in *Anopheles gambiae* immune genes associated with natural resistance to *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 6, e1001112.
- Harris, C., Morlais, I., Churcher, T.S., Awono-Ambene, P., Gouagna, L.C., Dabire, R.K., Fontenille, D., Cohuet, A., 2012. *Plasmodium falciparum* produce lower infection intensities in local versus foreign *Anopheles gambiae* populations. *PLoS One* 7, e30849.
- Hogg, J.C., Hurd, H., 1997. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. *Parasitology* 114, 325–331.
- Isaacs, A.T., Li, F., Jasinskiene, N., Chen, X., Nirmala, X., Marinotti, O., Vinetz, J.M., James, A.A., 2011. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS Pathog.* 7, e1002017.
- Koella, J.C., 2003. On the evolutionary ecology of mosquito immunity and the use of transgenic mosquitoes for malaria control. In: Takken, W., Scott, T.W. (Eds.), *Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes*.
- Koella, J.C., Zaghoul, L., 2008. Using evolutionary costs to enhance the efficacy of malaria control via genetically manipulated mosquitoes. *Parasitology* 135, 1489–1496.
- Lalubin, F., Deledevant, A., Glairot, O., Christe, P., 2013. Natural malaria infection reduces starvation resistance of nutritionally stressed mosquitoes. *J. Anim. Ecol.*
- 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.
- Lambrechts, L., Chavatte, J.M., Snounou, G., Koella, J.C., 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 273, 1501–1506.
- Lefevre, T., Vantoux, A., Dabire, K.R., Mouline, K., Cohuet, A., 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9, e1003365.
- Lim, J., Gowda, D.C., Krishnegowda, G., Luckhart, S., 2005. Induction of nitric oxide synthase in *Anopheles stephensi* by *Plasmodium falciparum*: mechanism of signaling and the role of parasite glycosylphosphatidylinositols. *Infect. Immun.* 73, 2778–2789.
- Manda, H., Gouagna, L.C., Foster, W.A., Jackson, R.R., Beier, J.C., Githure, J.I., Hassanali, A., 2007a. Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6, 113.
- Manda, H., Gouagna, L.C., Nyandati, E., Kabiru, E.W., Jackson, R.R., Foster, W.A., Githure, J.I., Beier, J.C., Hassanali, A., 2007b. Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. on endemic plants in western Kenya. *Med. Vet. Entomol.* 21, 103–111.
- 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.
- 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, 4708–4715.
- Mitri, C., Vernick, K.D., 2012. *Anopheles gambiae* pathogen susceptibility: the intersection of genetics, immunity and ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 285–291.
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, A., Magnaval, J.F., 2002. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 503–508.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290, 1166–1168.
- 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.
- Mouline, K., Mamai, W., Agnew, P., Tchoufienet, M., Brengues, C., Dabire, R., Robert, V., Simard, F., 2012. Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med. Vet. Entomol.*
- Muller, G.C., Beier, J.C., Traore, S.F., Toure, M.B., Traore, M.M., Bah, S., Dombia, S., Schlein, Y., 2010. Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits/seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. *Malar. J.* 9, 262.
- Niare, O., Markianos, K., Volz, J., Oduol, F., Toure, A., Bagayoko, M., Sangare, D., Traore, S.F., Wang, R., Blass, C., Dolo, G., Bouare, M., Kafatos, F.C., Kruglyak, L., Toure, Y.T., Vernick, K.D., 2002. Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science* 298, 213–216.
- Nyaseembe, V.O., Teal, P.E., Sawa, P., Tumlinson, J.H., Borgemeister, C., Torto, B., 2014. *Plasmodium falciparum* infection increases *Anopheles gambiae* attraction to nectar sources and sugar uptake. *Curr. Biol.*
- Obbard, D.J., Callister, D.M., Jiggins, F.M., Soares, D.C., Yan, G., Little, T.J., 2008. The evolution of TEP1, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. *BMC Evol. Biol.* 8, 274.
- Okech, B.A., Gouagna, L.C., Kabiru, E.W., Beier, J.C., Yan, G., Githure, J.I., 2004a. Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *Plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers. *J. Insect Sci.* 4, 33.
- Okech, B.A., Gouagna, L.C., Kabiru, E.W., Walczak, E., Beier, J.C., Yan, G., Githure, J.I., 2004b. Resistance of early midgut stages of natural *Plasmodium falciparum* parasites to high temperatures in experimentally infected *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol.* 90, 764–768.
- Pakpour, N., Corby-Harris, V., Green, G.P., Smithers, H.M., Cheung, K.W., Riehle, M.A., Luckhart, S., 2012. Ingested human insulin inhibits the mosquito NF-kappaB-dependent immune response to *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 80, 2141–2149.
- Riehle, M.M., Markianos, K., Niare, O., Xu, J., Li, J., Toure, A.M., Podiougou, B., Oduol, F., Diawara, S., Diallo, M., Coulibaly, B., Ouatarara, A., Traore, S.F., Vernick, K.D., 2006. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science* 312, 577–579.
- Robert, V., Verhave, J.P., Carnevale, P., 1990. *Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *Anopheles gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 346–347.
- Rosignol, P.A., Ribeiro, J.M., Spielman, A., 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 17–20.
- 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.
- Schmid-Hempel, P., 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. Biol. Sci.* 270, 357–366.
- Schwartz, A., Koella, J.C., 2004. The cost of immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* depends on immune activation. *J. Evol. Biol.* 17, 834–840.
- Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Evol. Ecol.* 11, 317–321.
- Sinkins, S.P., Gould, F., 2006. Gene drive systems for insect disease vectors. *Nat. Rev. Genet.* 7, 427–435.
- Smith, D.L., McKenzie, F.E., 2004. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar. J.* 3, 13.
- Tahar, R., Boudin, C., Thiery, I., Bourgoin, C., 2002. Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 21, 6673–6680.
- Takken, W., Klowden, M.J., Chambers, G.M., 1998. Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. *J. Med. Entomol.* 35, 639–645.
- Tripet, F., 2009. Ecological immunology of mosquito-malaria interactions: of non-natural versus natural model systems and their inferences. *Parasitology* 136, 1935–1942.
- Tripet, F., Aboagye-Antwi, F., Hurd, H., 2008. Ecological immunology of mosquito-malaria interactions. *Trends Parasitol.* 24.
- 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.
- Vezielier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2012. *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc. Biol. Sci.*
- Wekesa, J.W., Copeland, R.S., Mwangi, R.W., 1992. Effect of *Plasmodium falciparum* on blood feeding behavior of naturally infected *Anopheles* mosquitoes in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 484–488.
- Zelev, F., Nicot, A., Duron, O., Rivero, A., 2012. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *J. Evol. Biol.* 25, 1243–1252.

RESUME

Le développement de *Plasmodium* est l'aboutissement d'interactions complexes avec l'hôte vertébré et l'hôte moustique, qui constituent l'environnement du parasite.

Le transit et le développement du parasite dans le moustique est un parcours dangereux et difficile avec une perte parasitaire importante. Le parasite est soumis à une forte pression de sélection des enzymes digestives de l'hôte, des barrières physiques et surtout du système immunitaire.

La connaissance des forces évolutives de l'infection à *P. falciparum* chez *An. gambiae* est instructive en termes de recherche fondamentale sur les interactions vecteur-parasite mais aussi essentielle pour l'amélioration des stratégies de contrôle du paludisme par blocage du parasite chez le vecteur. Cette présente thèse avait pour objectif d'étudier les déterminants écologiques des interactions *An. gambiae* et *P. falciparum* dans la transmission du paludisme.

Dans un premier temps, nous avons comparé la susceptibilité des 3 espèces majeures du complexe *An. gambiae* vis-à-vis de souches de terrain de *P. falciparum* d'une même aire géographique.

Les moustiques ont été élevés dans des conditions identiques et nourris sur le sang du même porteur de gamétocytes en utilisant un système d'infection expérimentale. *Anopheles coluzzii* avait une forte charge en oocystes ($21 \pm 1,3$) comparativement à *An. gambiae* ($19,2 \pm 1,7$) et *An. arabiensis* ($16,4 \pm 1,4$). Nous avons observé une corrélation positive entre la gamétocytemie, la taille du repas de sang sur la charge oocystique chez les 3 espèces de moustiques. Enfin, il y avait un effet négatif de la taille de moustique sur l'intensité de l'infection par les plus grosses femelles hébergeant nettement moins d'oocystes que les petites femelles indépendamment de l'espèce de moustique.

Par contre, nous n'avons pas noté de différence significative en termes de prévalence de l'infection chez les 3 espèces de moustiques. Ni la gamétocytemie, ni la taille de l'aile n'ont eu un impact sur la prévalence de l'infection. L'analyse de la structuration génétique entre les oocystes au sein des 3 espèces en utilisant les marqueurs microsatellites n'a pas montré de différenciation génétique significative. Le nombre d'allèles par locus était compris entre 2 à 5 et l'hétérozygotie attendue entre 0,2491 et 0,3055.

Le second volet de notre étude a consisté à déterminer le coût de l'infection et de la résistance à *P. falciparum* chez *An. gambiae*. Après avoir validé un contrôle négatif adapté, nous avons effectué des infections d'*An. coluzzii* par leurs parasites naturels, *P. falciparum*, en utilisant un système de gorgement sur membrane sous différentes conditions nutritionnelles et climatiques. *Plasmodium falciparum* avait un impact négatif sur la survie et souvent sur la fécondité de son vecteur. L'effet de l'exposition ou de l'infection parasitaire était d'autant plus net en condition de stress alimentaire.

La notification d'un coût de l'infection pourrait avoir des implications cruciales dans la lutte contre le paludisme en mettant en évidence des « points faibles » des vecteurs du paludisme pour la mise au point des mesures de lutte antivectorielle ciblant spécifiquement les moustiques infectés.

Mots clés : Interactions *Anopheles-Plasmodium*, compétence vectorielle, coût de l'infection, valeur sélective, environnement.