

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

[Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes]

THÈSE présentée par :

[Albert BAYIBEKI NGANO]

Soutenue le : **28 juin 2018**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Résistance des moustiques vs virulence du parasite : Etude des interactions génétiques entre le parasite humain *Plasmodium falciparum* et les vecteurs *Anopheles gambiae* et *Anopheles coluzzii* en conditions naturelles.

THÈSE dirigée par :

[Dr. Stéphanie BLANDIN] CR-INSERM, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
[Dr. Eveline S. NSANGO] CC-FMSP, Université de Douala-Centre Pasteur du Cameroun

RAPPORTEURS :

[Dr. Elena LEVASHINA] DR-CNRS, Max Planck Institute for Infection Biology
[Dr. Christophe PAUPY] DR-IRD, Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Prof. Joseph SCHACHERER] Président du jury
PR PUPH, Université de Strasbourg

INVITÉS : (le cas échéant)

[Dr. Isabelle MORLAIS] DR-IRD, Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

REMERCIEMENTS :

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre du projet *MALARES Starting Grant* à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) à Strasbourg en France et à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) à Yaoundé au Cameroun. Et j'ai bénéficié de l'encadrement des Docteurs Stéphanie BLANDIN, Sandrine NSANGO et Isabelle MORLAIS.

Stéph, tu as été pour moi un guide tout au long des années passées dans ces travaux où j'ai appris à me questionner avant d'entreprendre une expérience. Ceci a édifié en moi une plus grande implication au travail que j'ai dû réaliser avec engouement, tout en considérant rigoureusement les « détails » dans l'application des protocoles. Je tiens à m'excuser pour les manquements dont j'ai été la cause. Et j'espère que les poursuites des analyses génomiques et transcriptomiques qui font l'objet d'intenses travaux en ce moment, sur les échantillons collectés à la suite des expériences de terrain, donneront des résultats probants.

Sandrine, merci à toi pour la proximité dont tu m'as témoigné dans la réalisation de mes travaux. Nous avons mené ensemble les travaux de terrain qui nous ont conduits à Tibati et Mfou pour la collecte des moustiques de terrain et la recherche des porteurs de gamétocytes. Le succès de ces travaux dans les collectes, les analyses d'échantillons et la rédaction de thèse, porte bien le sceau de ton labeur.

Isa... C'est toujours difficile de dire en quelques mots ce que tu as fait pour que j'en arrive jusqu'ici. A chaque difficulté tu trouves toujours l'occasion de me renouveler ta confiance. Je n'oublie pas lorsque tu me disais un matin sur le terrain : « Albert tu dois te reposer. Chaque jour n'a que 24 heures ; jamais plus, jamais moins. De toutes les façons pour ta thèse ne te fais pas de soucis, ça va aller ; ça finira bien par aller... ». J'ai bénéficié de ta grande expérience du terrain, et avec toi j'ai appris que la recherche n'est pas simplement le fait de mener des expériences, obtenir des résultats, savoir les interpréter, les discuter et les publier. Mais c'est aussi la hauteur de vue, avec le sérieux, l'obstination et l'audace. Car c'est ton audace qui nous fait retourner inattendument sur le terrain en Janvier 2016 et ramener, deux mois plus tard, des résultats qu'en deux années passées (2014 et 2015) nous n'avions pas peu obtenir. C'est ta hauteur de vue qui m'a permis de gérer les sensibilités du travail avec un certain recul et esprit d'anticipation... Merci Isa... merci infiniment.

Merci aux Docteurs Constant Roger AYENENGOYE et Manuel NSO OBIANG ADA, secrétaires exécutifs de l'OCEAC, et au Docteur Parfait Herman AWONO-AMBENE, responsable du laboratoire de recherche contre le paludisme (LRP-OCEAC), pour m'avoir permis d'effectuer des

stages de thèse au sein de l'organisation sous régionale de recherche en santé des pays de la zone CEMAC (Communauté Economique et Monétaire d'Afrique Centrale).

Je remercie les Professeurs Jean-Marc Reichhart et Jean-Luc Imler, Directeurs de l'Unité UPR 9022 « Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes » à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire *AnophelesGroup*, où j'ai eu l'opportunité de réaliser cette thèse dans un environnement scientifique pluridisciplinaire.

Merci à tous les membres du jury (Joseph SCHACHERER, Elena LEVASHINA, Christophe PAUPY, Sandrine NSANGO, Stéphanie BLANDIN et Isabelle MORLAIS) qui ont accepté volontiers de se rendre disponible pour évaluer ce travail et apporter leur contribution à son amélioration.

Merci à Geoffrey GIMONNEAU, Luc ABATE et Majoline TCHIOFFO qui se sont disposés infatigablement à me former sur le travail de terrain, la lecture et la rédaction des articles scientifiques durant les années de Master. Les savoirs et compétences que j'ai acquis avec vous me rendront toujours redevable d'un sincère merci.

Je tiens à remercier très sincèrement Eric MAROIS, Nathalie SHALOM, Mélanie SAENGER, Noémie JELLY, Christine KAPPLER, Marie STAÜB, Julien SOICHOT, Delphine KAPPS, et tous le personnel de l'équipe *AnophelesGroup/Mosquito immune responses* de l'UPR 9022 à l'IBMC-Strasbourg pour votre assistance qui m'a été d'un apport incommensurable.

Merci à toi Mélanie MUSER. Ta sympathie est une identité remarquable qui donne du sens à ton travail. Tu as aimablement assuré la communication entre l'école doctorale et moi, et cela m'a été d'un grand secours. Vraiment merci.

Merci à tout le personnel du collège doctoral européen pour l'hospitalité offerte à ma personne durant les séjours passés à Strasbourg.

Mes remerciements sont aussi adressés à tout le personnel IRD-Cameroun pour leur convivialité qui a rendu facile toutes les procédures de déploiement sur le terrain et de voyage en France.

Merci au Professeur Alexandre Benjamin NKOUM, Directeur de l'Ecole des Sciences de la Santé de l'Université Catholique d'Afrique Centrale. Vous avez porté votre choix sur ma personne pour me conduire à l'OCEAC afin d'y effectuer différents stages de recherche. Par votre soutien j'ai connu Isabelle MORLAIS, avec ses savoirs, sa rigueur scientifique et ses qualités humaines. Elle m'a fait intégrer une équipe dynamique, et avec l'aide de Geoffrey GIMONNEAU, Sandrine NSANGO,

Majoline TCHIOFFO et Luc ABATE, j'ai intégré l'équipe de Stéphanie BLANDIN à l'IBMC pour mes travaux de thèse. Cordialement merci...

Merci aux Professeurs et Docteurs Parfait Herman AWONO-AMBENE, Josiane ETANG, Carole EBOUMBOU, Pierre KENGNE, Antonio Christophe NKONDJIO, Charles WONDJI, Jacob RIVERON, Emmanuel ELANGA, Basile KAMGANG, Cyril NDO, Philippe NWANE, Billy TENE, Maurice Marcel SANDEU, Michel KENGNE et Lawrence AYONG pour votre disponibilité chaque fois que le besoin s'est fait sentir. Recevez ici les sentiments de ma profonde gratitude.

Merci à Rose NYAMBAM, Jean Pierre AGBOR, Etienne ONANA, Serge DONFACK, Amidou NGOUHOUO, Brice FEUFACK DONFACK, Christelle NGOU MAFFO, Gaëlle BOUOPDA, Wolfgang EKOKO, Edmond KOPIA, YACOUBA, Tanislasse MANDENG, Armel Pierre NGOM, Jérôme Achille BINYANG, Bélisse NDOUMBE et tout le personnel de l'OCEAC pour l'encadrement et l'assistance que vous m'avez apportés lors des travaux sur le terrain.

Merci au Professeur Serge ZEBAZE pour le soutien durant tout mon parcours académique à l'université de Yaoundé I et mon admission à l'université catholique d'Afrique centrale où l'achèvement du cycle Master à l'OEAC m'a permis de poursuivre aussitôt mes travaux de thèse.

Merci à toute la grande famille AHANDA d'Emombo. Vous avez été mon toit et mon grenier ... Et il me reste encore beaucoup à dire. Dans vos mains bienveillantes le Seigneur a pourvu à la réalisation et l'achèvement de ce travail de recherche. Merci...

Merci aux grandes familles NGANO et BAYIBEKI : Honorine NDEM YEMBEN Epouse NGANO, Anselme NGANO, Grégoire YEMBEN NGANO, Franck AYABAKAN NGANO, Thierry NDOUMILIENG NGANO et André Parfait OMANG NGANO, et Honorine Winny ETSINE NGANO, Nadine BILEGUE ONGONO et Paule Honorine NDEM BAYIBEKI, pour votre franche collaboration et votre assistance qui n'ont cessé de m'encourager à plus d'effort et de persévérance.

Merci à tous les membres des communautés des églises adventistes de Yaoundé-centre et de Strasbourg pour l'assistance et la collaboration fraternelles reçues de votre part au cours de mes travaux.

Merci à mes chers amis et camarades Paule MAY DE BASSO, Armand EFFEMBA ONDOUA, Pierre Stéphane AWONO, Luc INGENBLEEK, Jean-Baptiste WANDJI, Berthe Gladys EPET'A TOUBE, Berthe Solange DIWANDJA BITOK, M et Mme PIAMEU, Carine TADENFOCK épouse VOUKING, Jean BOPDA, Nina MAMBE, Emmanuelle AFANA, Henry MANGA, Jeanne MANGA, Syvanus TEKWE FON, Welysiane NGALEU, Adèle KANZE.

A ma mère...

Femme...

Tu as porté mon être dans ton sein téméraire

Tu as nourri ma chair du lait de ta chair

Tu as bâti, de ta ferveur de femme, l'aurore de mes pensées

Tu as forgé, de ta vaillance, ma vaillance

M'apprenant à marcher quiet sur les hauts et les bas de la vie.

Merci femme...

Merci mère...

Table des matières

REMERCIEMENTS :	i
Introduction et Généralités	5
Contexte de la thèse :	7
Partie I : Généralités sur le paludisme	8
I- Vecteurs du paludisme :	8
I-1- Systématique :	8
- Le groupe <i>An. moucheti s.l.</i> (Evans) 1925 :.....	8
- Le complexe <i>An. nili s.l.</i> (Theobald) 1904 :	8
- Le sous-groupe <i>An. funestus s.l.</i> (Giles) 1900 :	9
- Le complexe <i>An. gambiae s.l.</i> (Giles) 1902 :	9
I-2- Méthodes d'identification des anophèles :	11
Identification morphologique :	11
Les méthodes cytogénétiques :	11
Les méthodes de biologie moléculaire :	11
I-3- Cycle de développement des anophèles :	13
Stade immature :	13
Stade adulte :	13
II- Importance épidémiologique des anophèles :	14
III- Parasites du paludisme :	15
III-1- Systématique :	15
- <i>P. falciparum</i> (Welch, 1897) :.....	15
- <i>P. malariae</i> (Laveran, 1880) :	16
- <i>P. vivax</i> (Grassi et Feletti, 1890) :	16
- <i>P. ovale</i> (Stephens, 1922) :.....	16
- <i>P. knowlesi</i> (Knowles et Gupta, 1932) :	16
III-2- Cycle de développement des plasmodies humains :	17
Chez l'homme :	18
Chez le moustique :	20
III-3- Infectivité des gamétocytes :	20
IV- Diagnostic biologique de l'infection à <i>Plasmodium</i> :	21
IV-1- La microscopie :	21
IV-2- Les méthodes immunologiques :	22
IV-3- Les méthodes de biologie moléculaire :	22
V- Epidémiologie du paludisme au Cameroun :	23

VI- Stratégies de contrôle du paludisme :	25
VI-1- Traitement du paludisme :	25
VI-2- Chimio prophylaxie anti palustre :	26
VI-3- Immunoprophylaxie anti palustre :	26
VI-4- Lutte antivectorielle :	27
L'approche chimique :	27
Partie II : Réponse immunitaire et interactions <i>An. gambiae</i> - <i>P. falciparum</i> :	29
I- Interactions moustique/parasite : Modèles d'interactions <i>Anopheles-Plasmodium</i>.	31
II- Barrières anatomiques de l'immunité chez le moustique :	31
III- Pénétration des ookinètes dans l'épithélium intestinal :	32
IV- Reconnaissance des motifs du pathogène et immunité basale :	32
V- Voies de signalisation intracellulaire :	33
V-1- Voie de signalisation JNK :	34
V-2- Voie de signalisation Toll :	35
V-3- Voie de signalisation Imd :	36
V-4- Voie de signalisation JAK/STAT :	38
VI- Système du complément et réponse immunitaire à médiation humorale contre le parasite :	39
VI-1- Système du complément chez le moustique <i>An. gambiae</i> :	39
VI-2- Autres effecteurs de la voie humorale :	41
VII- Réponse immunitaire à médiation cellulaire :	42
VIII- Facteurs génétiques contrôlant la compétence vectorielle chez <i>An. gambiae</i> et la virulence chez <i>P. falciparum</i> :	45
VIII-1- Encapsulation des parasites par mélanisation :	47
VIII-2- Contrôle de la compétence vectorielle :	47
VIII-2-1- Résistance au parasite murin <i>P. berghei</i> :	47
VIII-2-2- Résistance au parasite humain <i>P. falciparum</i> :	49
VIII-3- Pfs47, un facteur clé de la virulence chez <i>P. falciparum</i> :	50
Partie III : Objectifs de la thèse	52
Matériel et méthodes	54
I- Sites d'étude :	56
I-1- Mfou :	56
I-2- Yaoundé :	57
II- Procédures éthiques et population d'étude :	58
III- Elevage de moustiques à l'OCEAC (Yaoundé) et à l'IBMC (Strasbourg) :	59
IV- Sélection de lignées de moustiques résistantes et sensibles à <i>P. berghei</i> (S1low et S1high) à partir de la lignée Ngouso :	60

V-	Collecte et élevage de moustiques :	61
VI-	Infections expérimentales :	62
VI-1-	Diagnostic et sélection des porteurs humains de gamétocytes de <i>P. falciparum</i> :	62
VI-2-	Infections expérimentales de moustiques avec <i>P. falciparum</i> :	63
IV-3-	Collecte d'échantillons de moustiques après infections expérimentales sur le terrain :	65
IV-4-	Purification des gamétocytes de <i>P. falciparum</i> :	66
IV-5-	Infections expérimentales de moustiques avec le parasite murin <i>P. berghei</i> :	67
VII-	Extraction d'ADN génomique (ADNg) et analyses moléculaires :	69
VII-1-	Extraction d'ADN génomique :	69
VII-2-	Diagnostic moléculaire des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i> et étude du polymorphisme des gènes candidats pro/anti parasitaires :	69
VII-2-1-	Diagnostic moléculaire des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i> chez les moustiques de terrain :	69
VII-2-2-	Etude du polymorphisme de TEP1 :	70
VII-2-3-	Identification moléculaire des moustiques L3-5 et NG. :	72
VII-3-	Génotypage des gamétocytes de <i>P. falciparum</i> :	75
III-2-2-	Caractérisation du polymorphisme de <i>Pf47</i>	76
VIII-	Préparation des bibliothèques d'ADN génomique pour le séquençage à haut débit :	77
	Résultats	78
	Chapitre 1 :	80
	Chapitre 2 :	82
	Introduction :	85
	Résultats :	86
I-	Dépistage des porteurs de gamétocytes et diversité génétique des parasites :	86
II-	Résistance/Sensibilité des moustiques L3-5 et Ngousso à l'infection à <i>P. falciparum</i> :	89
	Polymorphisme de <i>Pfs47</i> et infections chez L3-5 vs Ngousso :	95
	Discussion :	98
	Conclusion :	101
	Références Bibliographiques :	102
	Chapitre 3 :	105
	Introduction	107
	Résultats :	108
	Sélection des lignées de moustiques résistants et sensibles à <i>P. berghei</i> :	108
	La différence de phénotype entre les S1high/S1low n'est pas due à une différence d'accouplement entre les lignées :	110
	Le phénotype des S1high/S1low n'est pas conservé lors d'infections avec <i>P. falciparum</i> :	111

La gamétoctémie des porteurs influence la prévalence et le niveau d'infection chez les S1high/S1low :	116
Discussion et conclusion :	117
Références Bibliographiques :	119
Chapitre 4 :	123
Introduction	125
Résultats :	126
I- Distribution géographique d'<i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> dans la ville de Yaoundé :	126
II- Sensibilité comparée d'<i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> à l'infection avec des isolats naturels de <i>P. falciparum</i> :	127
III- Polymorphisme de <i>TEPI</i> chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> :	128
III-1- Distribution géographique des allèles de <i>TEPI</i> chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> :	129
III-2- Polymorphisme de <i>TEPI</i> et résistance/susceptibilité d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	131
Discussion et conclusion :	135
Références Bibliographiques :	138
Discussion générale et Conclusion	141
I- Données épidémiologiques	144
II- Comparaison de la densité parasitaire et de l'infectivité des gamétocytes du sang veineux et du sang capillaire :	145
III- Répartition géographique d'<i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> dans la ville de Yaoundé et détermination de leur compétence vectorielle :	146
IV- D'autres facteurs génétiques que <i>TEPI</i> déterminent la charge oocystique des Ngousso lors d'une infection avec <i>P. berghei</i> :	148
V- Conservation partielle des facteurs génétiques qui contrôlent la compétence vectorielle des moustiques :	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :	153
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX :	176
LISTE DES ABREVIATIONS :	180
LISTE DES PUBLICATIONS :	184
ANNEXES	186

Introduction et Généralités

Contexte de la thèse :

Le paludisme est une maladie infectieuse causée par des parasites hématozoaires du genre *Plasmodium*. Les parasites sont naturellement transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Parmi les cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'homme, *Plasmodium falciparum* est responsable de la forme la plus sévère de la maladie et de la plupart des décès dus au paludisme. De nombreuses autres espèces de *Plasmodium* parasitent un large spectre d'hôtes (oiseaux, rongeurs, mammifères). *P. berghei* est un parasite du rongeur et le modèle *P. berghei*/souris est largement utilisé comme modèle expérimental du fait de la facilité à maintenir le cycle du parasite en conditions de laboratoire. Par ailleurs, *P. berghei* infecte facilement *Anopheles gambiae* et *A. coluzzii*, les vecteurs majeurs de *P. falciparum* en Afrique sub-Saharienne.

En 2016, on a estimé à 216 millions et 445 000 le nombre de cas de paludisme et de décès associés, respectivement (WHO, 2017). L'Afrique sub-Saharienne reste la région la plus touchée, avec plus de 90% des cas et des décès, et la maladie touche particulièrement les enfants et les femmes enceintes (WHO, 2017). Depuis les années 2000, le déploiement de programmes de lutte contre le paludisme a permis de réduire significativement l'incidence de la maladie (-21%) et la mortalité associée (-29%). Mais les progrès accomplis dans la lutte contre le paludisme sont actuellement menacés par la résistance des moustiques aux insecticides et des parasites aux anti-malariques. Pour atteindre l'objectif 3 de développement durable, de réduire de 90% la mortalité palustre au niveau mondial d'ici 2030, de nouvelles méthodes de lutte doivent être développées. Les recherches actuelles explorent différentes voies, allant de la découverte de nouveaux médicaments à la mise au point de vaccins, de l'évaluation des mâles stériles pour contrôler les populations d'insectes à l'utilisation de moustiques incompetents pour interrompre la transmission.

La transmission de *Plasmodium* est complexe, multifactorielle. Elle dépend des facteurs génétiques, écologiques, ainsi que des mesures prophylactiques mises en place dans différents faciès épidémiologiques.

La diversité génétique des parasites et des vecteurs en conditions naturelles rend encore plus complexe notre compréhension des interactions entre *An. gambiae*-*P. falciparum*. Il est clairement établi que les mécanismes de la réponse immunitaire mis en exergue avec le modèle murin ne représentent pas toujours ceux rencontrés en conditions naturelles de transmission (Cohuet et al., 2006). Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à identifier les facteurs qui déterminent la compétence vectorielle des moustiques et la virulence des parasites dans un contexte naturel de transmission. Le travail a été réalisé en alternance entre le Cameroun et la France.

Partie I : Généralités sur le paludisme

I- Vecteurs du paludisme :

I-1- Systématique :

Règne : **Animalia**, Embranchement : **Arthropoda**, Classe : **Insecta**, Sous-classe : **Pterygota**,
Ordre : **Diptera**, Sous-ordre : **Nematocera**, Famille : **Culicidae**, Sous-famille : **Anophelinae**,
Genre : **Anopheles**.

Parmi les 484 espèces appartenant au genre *Anopheles*, seules une soixantaine est considérée comme vecteurs de paludisme. Elles présentent une distribution géographique hétérogène, certaines restreintes à des régions bien limitées, et d'autres plus largement réparties à l'échelle d'un continent. La faune anophélienne camerounaise est très diversifiée et compte 48 espèces parmi lesquelles 14 seulement peuvent transmettre le paludisme (Hervy et al., 1998 ; Coetzee et al., 2013). Elles sont réparties en 6 vecteurs majeurs (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti moucheti*) et 8 vecteurs secondaires (*An. hancocki*, *An. paludis*, *An. marshallii*, *An. coustani*, *An. wellcomei*, *An. ovengensis*, *An. ziemanni* et *An. pharoensis*), chacune de ces espèces pouvant assurer simultanément ou en alternance la transmission. Ces espèces appartiennent à des complexes ou groupes d'espèces, composés d'espèces jumelles (ou espèces isomorphes) non distinguables morphologiquement. L'identification spécifique est réalisée à l'aide de marqueurs moléculaires.

- Le groupe *An. moucheti s.l.* (Evans) 1925 :

C'est un groupe de 3 différentes espèces (*An. moucheti moucheti*, *An. moucheti nigeriensis* et *An. moucheti bervoetsi*) distinguables par quelques caractères morphologiques et génétiques (Kengne et al., 2007 ; Fouet et al., 2017). Elles sont inféodées aux blocs forestiers de la Centrafrique, du Nigéria à l'Ouganda, du Cameroun à la République Démocratique du Congo. Les gîtes larvaires sont le plus souvent les cours d'eau à courant lent, au lit souvent ombragé par une végétation flottante (*Pistia*, Jacinthes d'eau). Les adultes d'*An. moucheti moucheti* sont très anthropophiles et endophiles (Mouchet et Gariou, 1957 ; Antonio-Nkondjio et al., 2008). Ce sont des vecteurs d'importance locale dans les milieux situés le long des cours d'eau en zone de forêt (Antonio-Nkondjio et Simard, 2013).

- Le complexe *An. nili s.l.* (Theobald) 1904 :

Les espèces de ce groupe sont également répandues en zones forestières d'Afrique sub-Saharienne (De Meillon, 1951 ; Livadas et al., 1985 ; Hamon et al., 1956 ; Choumara et al., 1959 ; Hanney, 1960 ; Carnevale, 1974). Les larves colonisent les rives des rivières et des fleuves à courant

rapide. Quatre espèces, *An. nili*. (Theobald, 1904), *An. carnevalei* (Brunhes et al., 1999), *An. ovengensis* (Awono-Ambene et al 2004) et *An. somalicus* (Mouchet et Gariou, 1961) sont actuellement décrites. Les 3 premières sont anthropophiles et leur rôle épidémiologique est bien connu dans la transmission du paludisme en zones de forêt équatoriale (Livadas et al., 1958 ; Carnevale et al., 1974 ; Carnevale et al., 1992 ; Antonio-Nkondjio et Simard, 2013).

- **Le sous-groupe *An. funestus s.l.* (Giles) 1900 :**

Six espèces y sont retrouvées : *An. funestus*, *An. confusus*, *An. lesoni*, *An. rivulorum*, *An. rivulorum like* et *An. brucei* (Cohuet et al., 2003). Parmi elles, *An. funestus* est un vecteur majeur du paludisme en Afrique (Antonio-Nkondjio et Simard, 2013) ; sa compétence vectorielle est comparable à celle d'*An. coluzzii* (Ndo et al., 2016). Elle est anthropophile tandis que les autres espèces sont essentiellement zoophiles.

- **Le complexe *An. gambiae s.l.* (Giles) 1902 :**

Ce complexe comprend 3 vecteurs majeurs du paludisme dans la région afro-tropicale : *An. gambiae* (Giles, 1902), *An. coluzzii* (Coetzee et al., 2013), et *An. arabiensis* (Patton, 1905). Le complexe *gambiae* comporte également 5 autres espèces, dont l'importance dans la transmission est moindre : *An. melas* (Theobald, 1903), *An. merus* (Donitz, 1902), *An. amharicus* (Hunt et al., 1998, Coetzee et al., 2013), *An. bwambae* (White, 1985) et *An. quadriannulatus* (Theobald, 1911). La systématique du complexe *An. gambiae s.l.* a été récemment révisée, divisant l'espèce *An. gambiae s.s.* en deux nouvelles espèces, *An. gambiae* et *An. coluzzii* (Coetzee et al., 2013). Cette division correspond aux anciennes formes moléculaires S et M, respectivement (Della Torre, 2001) ; elle est basée sur les résultats de nombreuses études de génétique des populations qui ont montré un isolement reproductif des deux formes, avec des barrières prézygotiques (Lawniczak et al. 2010, Neafsey et al. 2010, Pannetier et al. 2010, Simard et al. 2009, Costantini et al. 2009).

La distribution géographique des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* est caractéristique des types de gîtes larvaires et du climat (Figure 1), et les espèces diffèrent dans leurs préférences trophiques et leur importance épidémiologique. *An. gambiae*, *An. arabiensis*, et *An. coluzzii* sont des espèces héliophiles présentes dans les gîtes larvaires d'eau douce temporaires ou pérennes, d'origine naturelle ou anthropique. *An. gambiae* et *An. coluzzii* sont très anthropophiles, on les retrouve en zones de forêt et de savane d'Afrique sub-Saharienne. Dans les zones de climat aride, elles sont peu fréquentes, alors qu'*An. arabiensis* y est très répandue. La contribution d'*An. arabiensis* à la transmission varie selon son degré d'anthrophilie ; sa préférence trophique est souvent orientée vers le gros bétail (Onyabe et Conn, 2001). Parmi les espèces d'eau douce, on retrouve aussi *An. quadriannulatus* et *An. amharicus*. Ces deux espèces ne jouent aucun rôle dans la transmission du paludisme humain du fait de leur zoophilie (Hunt et al. 1998). Dans les mangroves et les eaux

saumâtres des côtes Ouest et Est d’Afrique, on retrouve respectivement *An. melas* et *An. merus*. Leur rôle de vecteur est limité aux régions côtières où elles sont inféodées ; elles sont considérées comme des vecteurs d’importance locale (Akogbeto et Romano, 1999 ; Mouchet et *al.*, 2004). Au Cameroun, *An. melas* est retrouvé dans les régions côtières mais à la différence de ce qui est observé dans les autres régions côtières d’Afrique sub-Saharienne, l’espèce n’est pas impliquée dans la transmission du paludisme (Bigoga et *al.*, 2007). L’espèce la plus originale de par son écologie larvaire est *An. bwambiae* ; elle est inféodée aux sources d’eau chaude riches en minéraux dans la forêt de Semliki et ses environs, en Ouganda (White, 1985). Bien qu’elle transmette le paludisme, son rôle de vecteur est relativement faible et très localisé du fait de sa distribution géographique très restreinte.

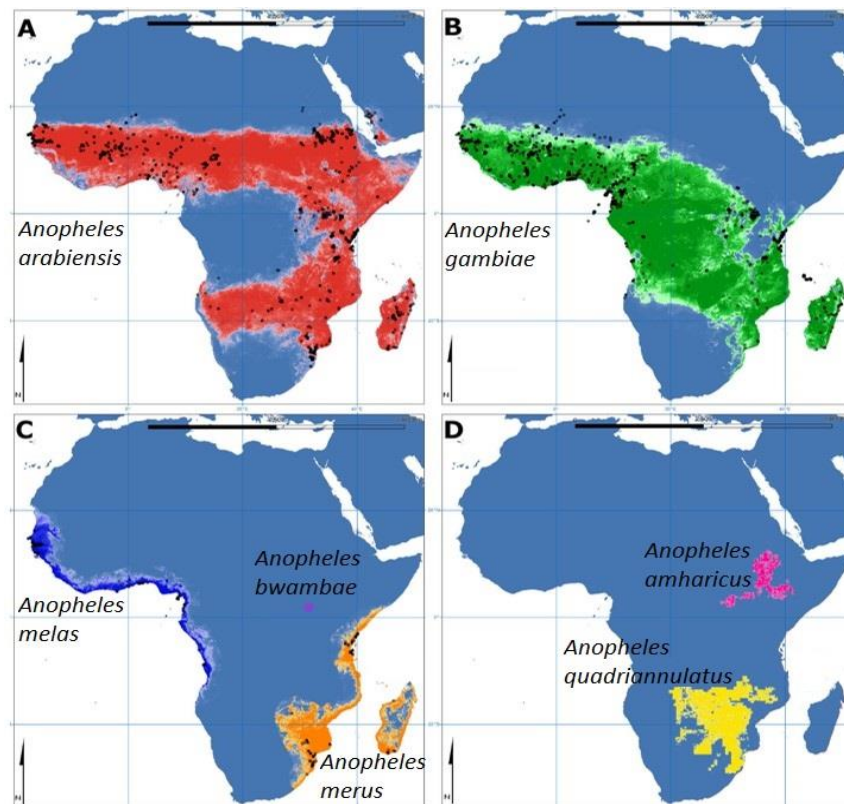


Figure 1 : Distribution géographique des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* (Lanzaro and Lee, 2013). **A** : *An. arabiensis* (rouge); **B** : *An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii* (vert); **C** : *An. melas* (bleu), *An. merus* (orange), et *An. bwambiae* (violet); **D** : *An. quadriannulatus* (jaune), *An. amharicus* (rouge-violet).

I-2- Méthodes d'identification des anophèles :

L'étude des anophèles en santé publique est envisagée principalement dans le but d'identifier les vecteurs d'agents pathogènes, d'étudier leur compétence vectorielle, et de développer des stratégies de lutte antivectorielle visant à réduire les populations de vecteurs ou à bloquer la transmission des pathogènes. Quatre approches sont couramment utilisées ; elles permettent une exploration exhaustive des vecteurs, de la morphologie à la génétique en passant par la cytogénétique.

Identification morphologique :

Elle repose sur l'utilisation de clés d'identification basées sur des critères morphologiques discriminants les stades larvaires ou imaginaux. Pour les anophèles de la région Afrique, différentes clés sont disponibles : Gillies et De Meillon (1968), Gillies et Coetzee (1987), Awono-Ambéné et *al.* (2004). L'identification des espèces est faite par l'observation de caractères morphologiques à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire. Toutefois, cette méthode ne permet pas de distinguer les espèces jumelles des complexes d'espèces.

Les méthodes cytogénétiques :

La cytogénétique est l'analyse des profils des bandes d'hétérochromatine visibles sur les chromosomes polytènes. Les chromosomes polytènes sont des chromosomes géants qui se forment à la suite de plusieurs cycles de réplication de l'ADN sans séparation des chromatides (Klug et *al.*, 2006). Les bandes claires et sombres qui apparaissent selon le degré de polyténisation des chromatides sont caractéristiques et facilement observables au microscope optique à contraste de phase. Chez les anophèles, ces chromosomes polytènes sont retrouvés dans les glandes salivaires du quatrième stade larvaire (Frizzi et Holstein, 1956) et dans les cellules trophocytaires de l'ovocyte chez les femelles semi-gravides (Coluzzi, 1968). L'étude des arrangements chromosomiques a permis de définir différentes espèces du complexe *An. gambiae s.l.*, d'après les inversions paracentriques (Coluzzi 1979, 1984). Les inversions chromosomiques peuvent servir de marqueurs d'espèces lorsqu'elles sont fixées, ou bien de marqueurs de populations lorsqu'elles sont polymorphes, on parle alors de cytotypes (Frizzi, 1953 ; Coluzzi et *al.*, 2002). De nos jours l'identification d'espèces par cytogénétique est nettement moins employée, notamment en raison de la contrainte de travailler sur des stades de développement spécifiques (glandes salivaires de larves de stade 4, ou *cellules trophocytaires* des ovaires de femelles semi-gravides). En plus la préparation des chromosomes est longue et fastidieuse.

Les méthodes de biologie moléculaire :

La caractérisation moléculaire est devenue la méthode la plus utilisée pour l'identification des espèces au sein des complexes d'anophèles (Della Torre et *al.* 2001, Koekemoer 2002, Kengne 2003,

Kengne 2007, Santolamazza et al. 2008). Le diagnostic d'espèce est fait par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Les amplifications peuvent être réalisées avec un ou plusieurs couples d'amorces. Chez les espèces du complexe *gambiae*, les déterminations spécifiques sont basées sur le polymorphisme de séquence des régions transcrites et non transcrites (IGS *Intergenic Spacers* et ITS *Internal Transcribed Spacers*, Figure 2) de l'ADN ribosomal (Scott et al., 1993 ; Favia et al., 2001 ; Fanello et al., 2002). Le polymorphisme d'insertion des éléments transposables SINEs (*Short Interspersed Elements*) permet également de discriminer *An. gambiae* d'*An. coluzzii* (Santolamazza et al., 2008).

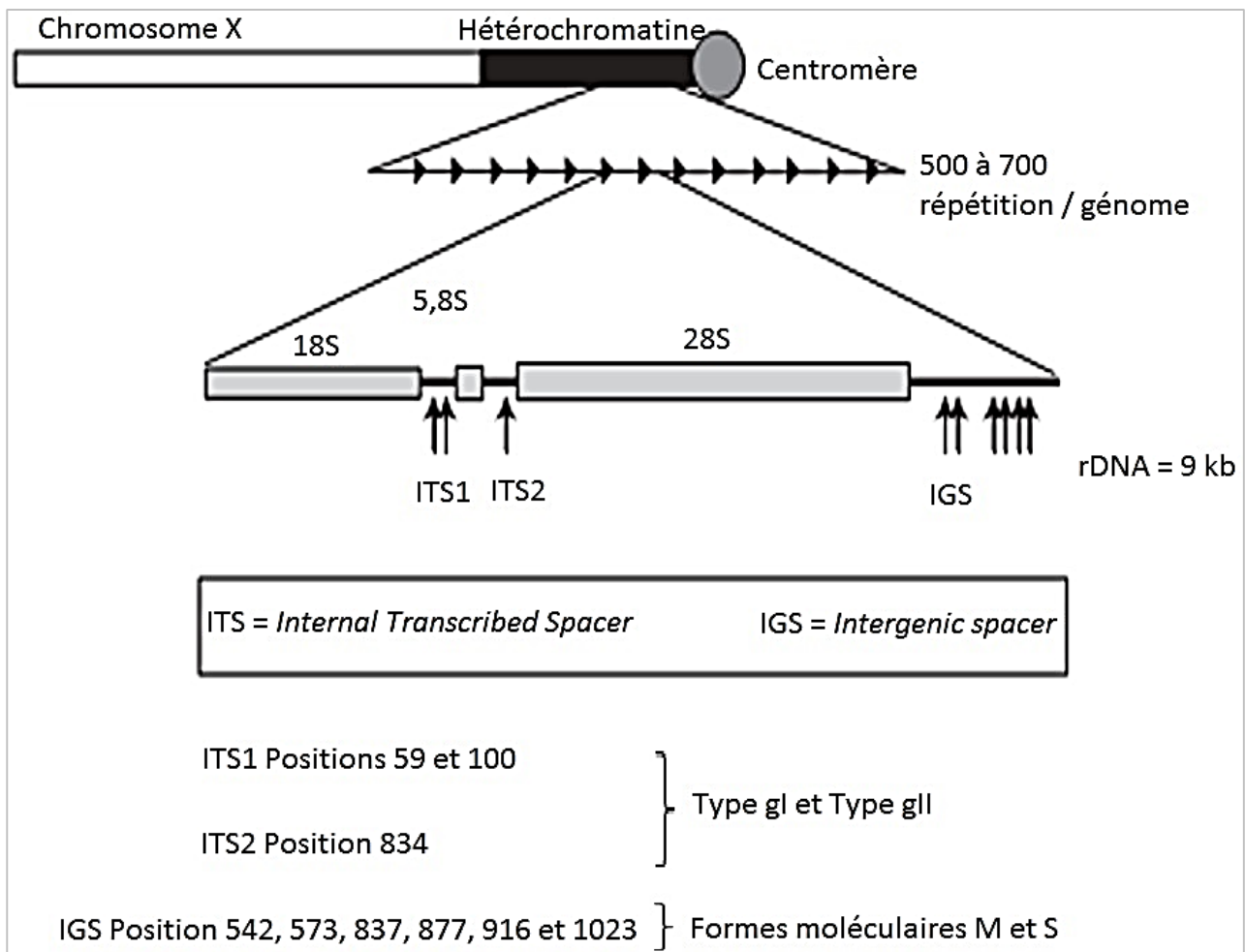


Figure 2 : Fragments d'ADNr ciblés pour le diagnostic moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* (Carnevale et Robert, 2009).

I-3- Cycle de développement des anophèles :

Les anophèles sont des insectes holométaboles¹ avec un cycle de développement (Figure 3) qui comporte 3 stades immatures, tous aquatiques (œuf, larve, nymphe), et un stade adulte aérien (imago).

Stade immature :

Lors de la ponte des femelles, les œufs sont déposés isolément à la surface de l'eau d'un gîte. Ces derniers vont se transformer en larves de stade 1 (L1), qui à leur tour subiront 4 mues successives pour aboutir à la formation de nymphes. Le stade nymphal est marqué par un métabolisme actif au cours duquel l'insecte subit de très profondes transformations morphologiques et physiologiques (Cléments, 1992). Au moment de l'émergence, la cuticule se fend longitudinalement, l'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau. La durée du développement aquatique varie d'une espèce à l'autre, en fonction des conditions de température. Dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, le développement larvaire dure 10 à 12 jours à 28°C (Carnevale et Robert, 2009).

Stade adulte :

Après émergence, les adultes restent au repos à la surface de l'eau pendant 10 à 24 heures. Cette étape permet la consolidation des ailes et pattes, le durcissement de la cuticule et la maturation des organes sexuels. Les mâles sont reconnaissables à leurs antennes plumeuses, par opposition aux femelles pourvues d'antennes glabres. Leur premier repas, pris le plus souvent au crépuscule ou pendant la nuit, est composé de nectar de plantes. Les mâles ne sont fertiles qu'après le troisième jour de la vie imaginaire, délai nécessaire pour le bon fonctionnement de leurs organes reproducteurs. L'accouplement, souvent précédé d'un essaimage des mâles, peut se faire entièrement en vol libre ou se terminer sur un support (Clements, 1992 ; Diabaté et *al.*, 2006). Les femelles ne sont généralement inséminées qu'une seule fois. Une fois fécondées, les femelles stockent le sperme dans leur spermathèque et les spermatozoïdes féconderont les ovocytes lors de leur passage dans l'oviducte à chaque cycle gonotrophique² (Carnevale et *al.*, 2009). L'apport en protéines nécessaire à la maturation des ovaires est procuré par le repas sanguin. Durant le repas de sang, les femelles exsudent à l'extrémité postérieure de l'abdomen des produits aqueux, concentrant l'hémoglobine des hématies dans le tube digestif. La quantité de sang ingéré peut représenter jusqu'à deux fois le poids du

¹ Insectes holométaboles : Insectes à métamorphose complète chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal.

² Le cycle gonotrophique est le délai qui s'étend entre l'émergence et la première ponte dans le cas des femelles nullipares, puis entre deux ovipositions successives dans le cas des femelles pares. Au cours du cycle gonotrophique chez les moustiques femelles il y a : développement des follicules ovariens, fécondation et formation des œufs diploïdes qui sont à l'origine des larves L1 24h après la ponte.

moustique. Le sang est digéré lorsque les femelles sont au repos. Les ovaires se développent ainsi au fur et à mesure de la digestion du repas de sang. Les femelles gorgées deviennent gravides au bout de 48 heures, et les ovocytes arrivés à maturité sont pondus. Après la ponte, les femelles vont à la recherche de nouveaux hôtes pour un prochain repas de sang : c'est le début d'un nouveau cycle gonotrophique.

Selon Brengues & Coz (1973), le cycle gonotrophique dure environ 3 jours dans les régions tropicale et subtropicale d'Afrique. La durée de vie des anophèles adultes varie selon les espèces. Chez *An. gambiae*, elle est d'environ 4 semaines.

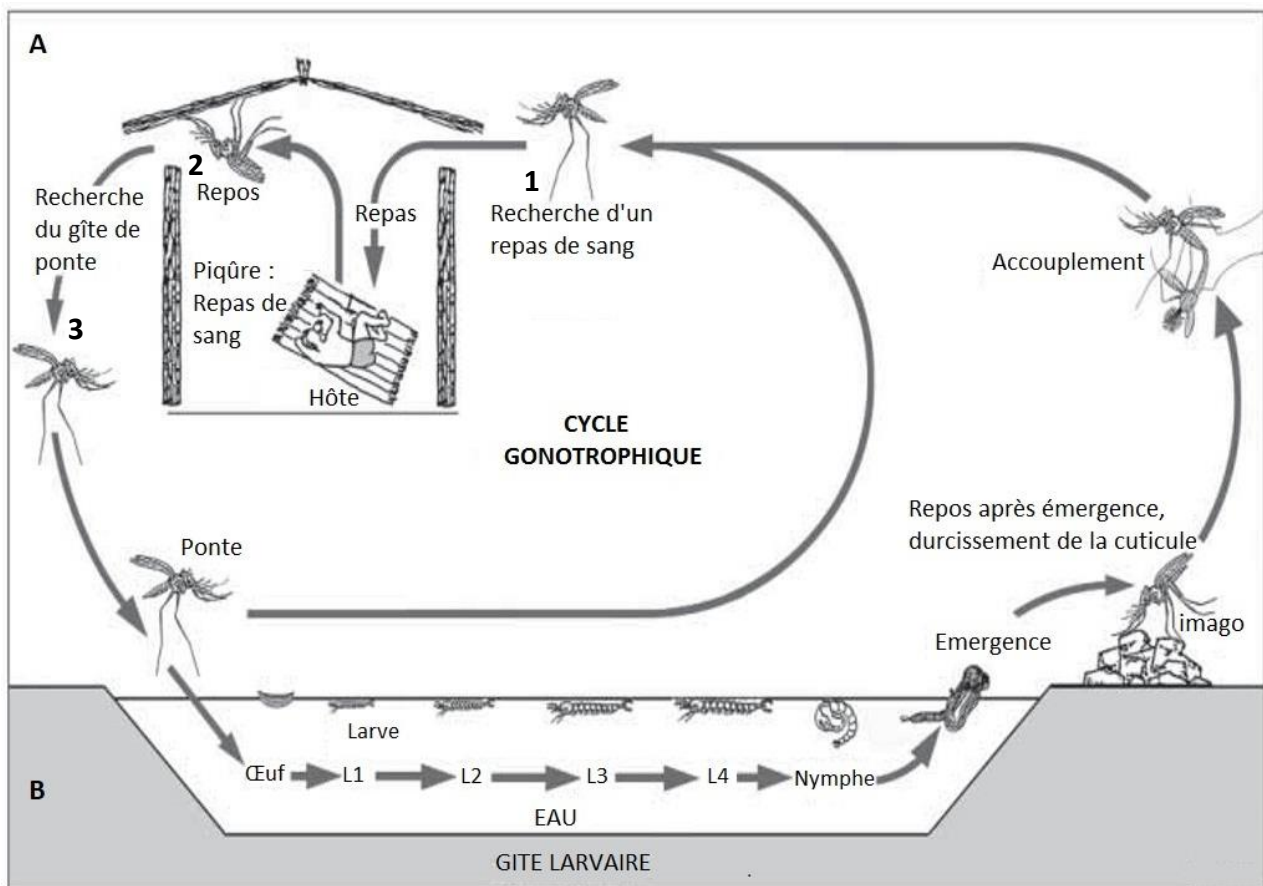


Figure 3 : Cycle de vie des anophèles.

A : Vie aérienne décomposée en trois étapes successives dont l'ensemble constitue le cycle gonotrophique **B :** Vie aquatique, ponctuée de métamorphoses jusqu'à l'obtention du stade nymphal. (Carnevale et al., 2009).

II- Importance épidémiologique des anophèles :

La contribution des anophèles dans la transmission du *Plasmodium* à l'origine du paludisme dépend de paramètres environnementaux et de facteurs génétiques. Connaître la bio-écologie de l'insecte permet d'adapter les mesures de lutte antivectorielle à mettre en place dans la zone considérée.

La préférence trophique, anthropophilie ou zoophilie, d'une espèce d'anophèle capable de transmettre le *Plasmodium* définira son statut de vecteur, une espèce exclusivement zoophile ne

présentant aucun risque pour l'homme en termes de transmission. Le comportement, le cycle d'agressivité des moustiques et leur mode de piqûre, à l'intérieur des maisons (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie), auront également une grande importance dans la transmission.

La capacité vectorielle correspond au nombre d'inoculations attendues par jour à partir d'un cas humain infecté en contact avec une population anophélienne (Garrett-Jones, 1964). Sa formule est la suivante :

$$C = ma^2 p^n / - \ln p$$

- ma** : Agressivité (Nombre de piqûres par jour),
a : Nombre de repas pris sur l'homme par jour,
m : Densité de vecteurs,
p : Probabilité quotidienne de survie des vecteurs,
n : Durée du développement sporogonique.
pⁿ / - ln p : Espérance de vie infectante

III- Parasites du paludisme :

III-1- Systématique :

Règne : **Animal**, Sous-règne : **Protozoaire**, Embranchement : **Apicomplexa**, Classe : **Sporozoea**, Sous-classe : **Coccidia**, Ordre : **Eucoccida**, Sous-ordre : **Haemosporidae**, Famille : **Plasmodiidae**, Genre : **Plasmodium**.

Chez l'homme, 5 espèces (Figure 4) peuvent être responsables du paludisme : *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. malariae* (Laveran, 1880), *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890), *P. ovale* (Stephens, 1922) et *P. knowlesi* (Knowles et Gupta, 1932). Leur distribution géographique diffère selon les régions du globe.

- *P. falciparum* (Welch, 1897) :

Elle sévit en zones chaudes intertropicales : Amérique Centrale et du Sud, Asie tropicale et Afrique Sub-saharienne. C'est l'espèce la plus virulente, responsable de plus de 90% des cas de morbidité et de mortalité palustres en Afrique (WHO 2016), mais également des formes cliniques graves à l'instar du neuropaludisme. Le parasite est à l'origine des fièvres tierces malignes, et souvent les recrudescences de fièvre à *P. falciparum* sont liées aux phénomènes de résistance du parasite aux antimalariques ou aux infections polyclonales (Thu et al., 2017). La transmission du paludisme à *P. falciparum* est pérenne dans les régions forestières d'Afrique Equatoriale.

- ***P. malariae*** (Laveran, 1880) :

Il sévit en Afrique, Asie et Amérique, de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une latence plus longue (15 à 21 jours), un cycle érythrocytaire de 72 heures responsable de fièvre quarte, et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences tardives (WHO, 2016).

- ***P. vivax*** (Grassi et Feletti, 1890) :

Très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, *P. vivax* est beaucoup moins observé en Afrique du Nord et de l'Est. Il est à l'origine des fièvres tierces avec une période d'incubation de 11 à 13 jours, et des rechutes (accès de reviviscence) qui peuvent être observées des mois voire des années plus tard. Autrefois *P. vivax* n'était pas observé en Afrique sub-Saharienne, du fait de l'absence de l'antigène Duffy à la surface des érythrocytes (Ambroise-Thomas, 1991). De nombreuses études ont récemment rapporté la circulation du parasite en Afrique Centrale (Cameroun), de l'Ouest (Benin) et de l'Est (Ethiopie) (Ngassa et al., 2016 ; Poirier et al., 2016 ; Russo et al., 2017 ; Seyoum et al., 2017). En 2015, *P. vivax* était à l'origine de 3100 cas de décès à travers le monde, dont 86% hors de l'Afrique (WHO, 2016).

- ***P. ovale*** (Stephens, 1922) :

Il sévit en Afrique intertropicale du Centre, de l'Ouest et dans certaines régions du Pacifique. *P. ovale* provoque des fièvres tierces bénignes. La phase latente de l'infection dure au minimum 15 jours mais peut être beaucoup plus longue, jusqu'à 4 ans.

- ***P. knowlesi*** (Knowles et Gupta, 1932) :

On le rencontre dans les zones forestières du Sud-Est de l'Asie. C'est originellement un parasite simien, mais des infections chez l'homme sont rapportées depuis une 15^e d'années (Singh Lancet 2004). Bien que morphologiquement proche de *P. malariae*, il présente un cycle érythrocytaire journalier avec des accès palustres survenant toutes les 24h.

Récemment, une sixième espèce *P. cynomolgi* a été identifiée chez des sujets humains (Ta et al, 2014). Il s'agit d'un parasite simien morphologiquement proche de *P. vivax*.

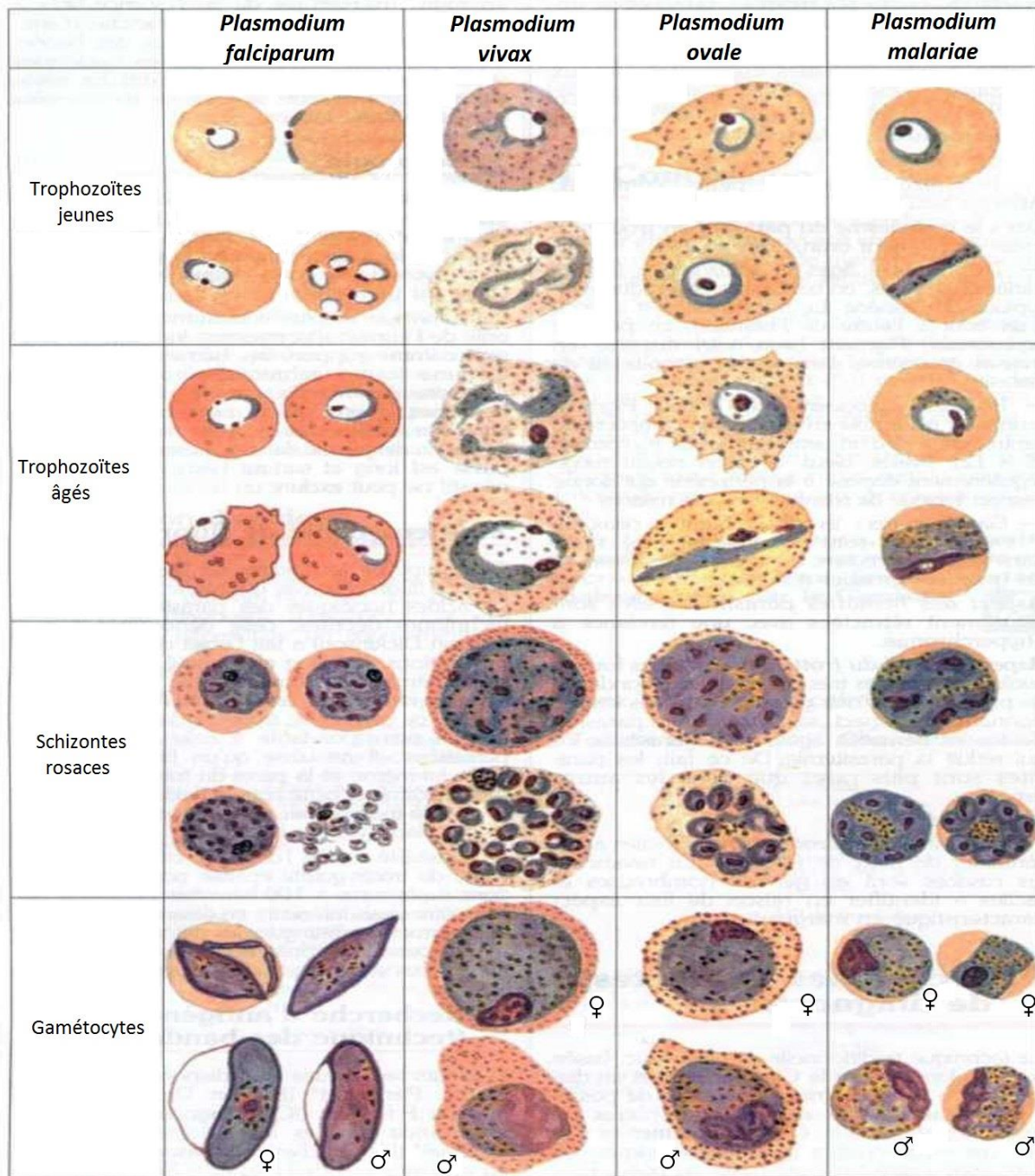


Figure 4 : Les différents stades sanguins de Plasmodium. Aspect observé sur frottis minces (Deluol et al., 1998)

III-2- Cycle de développement des plasmodies humains :

Le cycle de développement de *Plasmodium* est un cycle dixène (Figure 5). L'hôte vertébré, l'homme est l'hôte intermédiaire, chez lequel le parasite subira des multiplications intenses avec formation des gamétocytes (stades sexués). L'hôte invertébré, l'anophèle femelle, est l'hôte définitif chez lequel aura lieu la reproduction sexuée. En général, le cycle complet des plasmodies est haplo-

diploïde avec une courte phase à 2n chromosomes chez le moustique et une phase à n chromosomes, chez l'homme, au cours de laquelle se manifestent les fièvres palustres.

Chez l'homme :

La schizogonie de *Plasmodium* est marquée par une phase hépatique (ou pré-érythrocytaire) suivie de l'invasion des érythrocytes dans le sang circulant (phase érythrocytaire).

Lorsqu'un anophèle femelle infecté inocule des sporozoïtes à l'homme à l'occasion d'un repas de sang, les parasites transitent par des vaisseaux sanguins périphériques pour atteindre le foie. Dans les cellules hépatiques, les sporozoïtes se différencient en schizontes hépatiques, subissant d'intenses multiplications asexuées. Arrivé à maturité, le schizonte éclate et libère des milliers de mérozoïtes uni-nucléés qui migrent dans la circulation sanguine. L'invasion du sang par les mérozoïtes initie la parasitémie. Les mérozoïtes libérés envahissent les érythrocytes et se transforment en trophozoïtes ; ce sont des formes en anneau ou en croissant lunaire avec un noyau entouré d'un cytoplasme. Les trophozoïtes subissent une schizogonie et se différencient en schizontes érythrocytaires. Le schizonte érythrocytaire éclate entraînant la lyse des érythrocytes hôtes et la libération des mérozoïtes dans la circulation. L'éclatement des érythrocytes correspond à un épisode de fièvre palustre.

Après plusieurs cycles de schizogonie, certains trophozoïtes se différencient en gamétocytes mâles et femelles ; c'est le stade infectant pour les moustiques femelles. La différenciation des gamétocytes se fait en 5 stades ; seul le stade V est retrouvé dans le sang circulant (Hawking 1971). Les érythrocytes infectés par des gamétocytes de stade I à IV sont séquestrés dans les tissus profonds, rate et moelle osseuse, et les mécanismes permettant leur relargage dans la circulation ne sont pas encore élucidés (Tiburcio et al., 2012). La maturation des gamétocytes dure 8 à 10 jours et la survie d'un gamétocyte de stade V chez *P. falciparum* est estimée à environ 3 à 4 semaines (Smalley et Sinden, 1977).

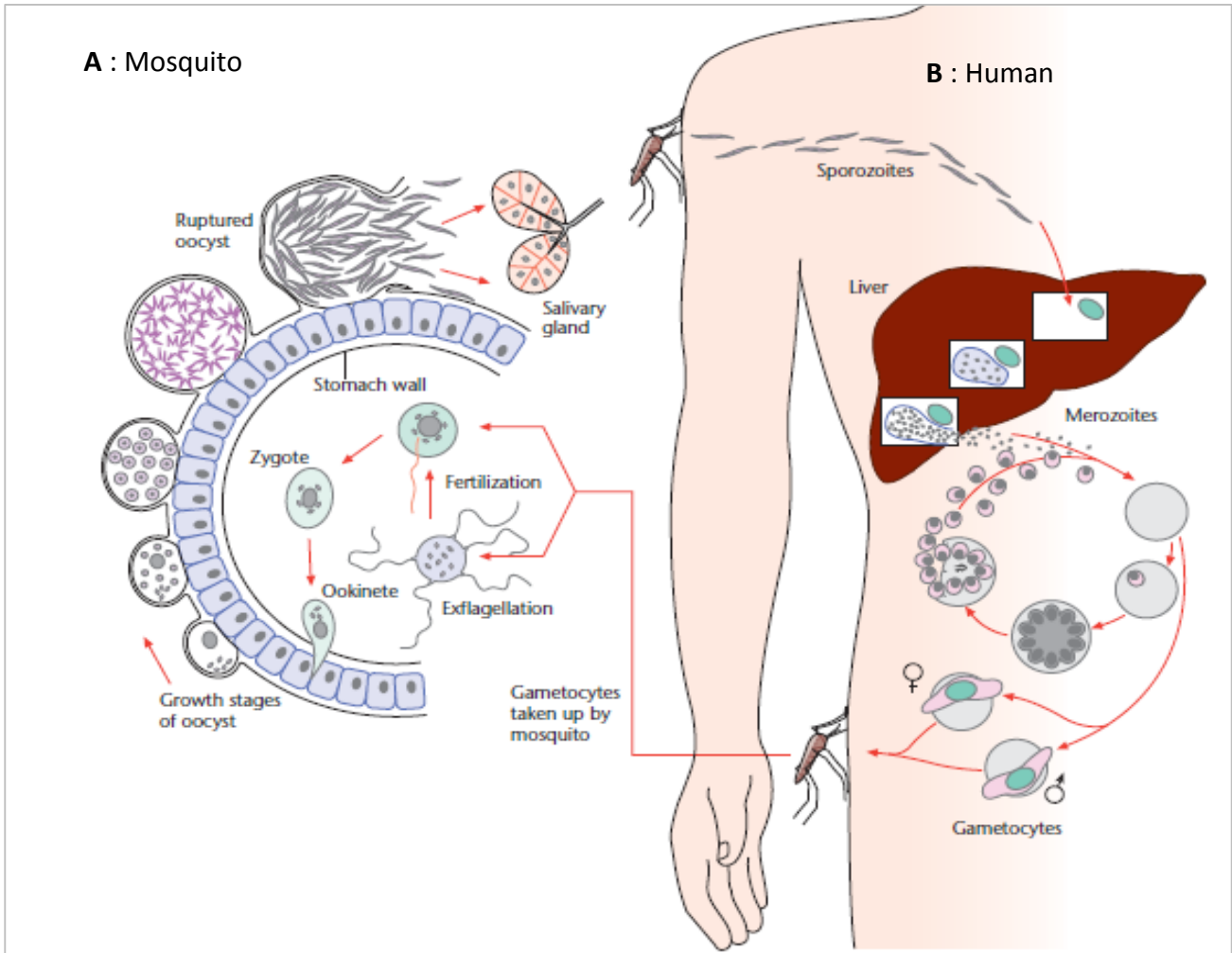


Figure 5 : Cycle de développement de *P. falciparum*

A : Développement chez le moustique (Sporogonie), **B** : Développement chez l'homme (Schizogonie). Lors du repas de sang chez un hôte vertébré, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes mâles et femelles. Ces derniers fusionnent par fécondation pour former un zygote diploïde avant de se différencier successivement en ookinètes mobiles, puis en oocystes sur la face basale de l'épithélium intestinal. L'oocyste formé éclate après maturation et libère dans l'hémolymphe des milliers de sporozoïtes qui vont envahir les glandes salivaires rendant ainsi le moustique infectant. Et lors du prochain repas de sang, le moustique porteur de sporozoïtes inocule à l'homme des sporozoïtes qui vont atteindre le foie au moyen du flux sanguin. Chez l'homme les sporozoïtes vont se différencier en schizonte hépatique, puis en mérozoïtes, et envahir les érythrocytes dans la circulation, avant de se transformer en trophozoïtes. Les trophozoïtes se différencient en schizontes érythrocytaires et le cycle de division asexuée pourrait continuer au travers de plusieurs colonies d'érythrocytes qui parviennent dans la circulation. Ce pendant d'autres trophozoïtes peuvent se différencier en gamétocytes qui sont les formes sexuées du parasite infectant chez le moustique.

(Bannister and Sherman, 2009).

Chez le moustique :

Lors du repas de sang chez un hôte vertébré, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes mâles et femelles. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes femelles se différencient en macrogamètes femelles, tandis que les gamétocytes mâles effectuent une succession de 3 divisions mitotiques et produisent par exflagellation 8 gamètes mâles ou microgamètes. L'exflagellation du parasite est induite par une diminution brusque de température, l'augmentation du pH et la présence d'acide xanthurénique chez le moustique (Sinden and Croll 1975 ; Sinden, Butcher et *al.*, 1996 ; Billker, Lindo et *al.*, 1998). La fécondation du macrogamète femelle par le gamète mâle s'effectue pour former un zygote diploïde ($2n = 28$ chromosomes). Celui-ci évolue en ookinète 24 à 36h après le repas de sang. L'ookinète, mobile, entame la traversée de l'épithélium intestinal, se différencie en oocyste au niveau de la face basale de l'épithélium intestinal où il s'enkyste. A l'intérieur de chaque oocyste, une série de mitoses synchrones permet la production de nombreux sporozoïtes haploïdes ; c'est la sporogonie. A maturité, l'oocyste peut atteindre un diamètre de l'ordre de 20 à 60 μm , au bout de 9 jours à 28°C, il est alors visible à l'observation microscopique avec un grossissement x200. L'éclatement de l'oocyste mature aboutit à la libération dans l'hémocœle de milliers de sporozoïtes. Les sporozoïtes sont drainés par l'hémolymphe et migrent vers les glandes salivaires, ils seront inoculés à l'homme lorsque la femelle prendra son prochain repas de sang. La durée du développement sporogonique varie selon l'espèce de parasite et la température. Au-delà de 35°C et en deçà de 18°C, la sporogonie de *P. falciparum* est stoppée ; le cycle dure en moyenne 14 jours à des températures comprises entre 25 et 28°C (Noden et *al.*, 1995 ; Beier, 1998).

III-3- Infectivité des gamétocytes :

L'infectivité des gamétocytes et le succès du développement chez le moustique dépendent de plusieurs facteurs (Tchuinkam et *al.*, 1994) : (1) l'immunité développée chez l'hôte vertébré (Boudin et *al.*, 2004), (2) la température et l'humidité (Okech et *al.*, 2004 ; Ya Afrene et *al.*, 2005), (3) la densité de gamétocytes (Mendes et *al.*, 2011), (4) le sex-ratio (Robert et *al.*, 1996), (5) la MOI³ (Nsango et *al.*, 2012), (6) la virulence du parasite (Molina-cruz et *al.*, 2012 ; Molina-cruz et *al.*, 2013), (6) la flore microbienne dans le tube digestif des moustiques hôtes (Okech et *al.*, 2007 ; Tchioffo et *al.*, 2016) et (7) la compétence vectorielle du moustique (Collins et *al.*, 1986).

Les travaux sur la virulence de *P. falciparum* chez le moustique rapportent les mécanismes par lesquels le parasite parvient à échapper à la réponse immunitaire et à former des oocystes sur la face basale de l'épithélium intestinal. La virulence du parasite est fonction de la co-adaptation vecteur/parasite (Harris et *al.*, 2012). Mais elle est aussi fonction des facteurs génétiques inhérents au

³ La MOI ou *Multiplicity Of Infection*, est le nombre de clone de parasite contenu dans un repas de sang ingéré par le moustique.

parasite ; les travaux de Molina-cruz et collaborateurs (2012) réalisés en laboratoire rapportent que des souches de *P. falciparum* provenant d’Afrique (GB4, 3D7 et NF54) sont plus virulentes que celles du Brésil (7G8) donnant des infections avec des prévalences de l’ordre de 78%, 89%, 100% et 5% respectivement chez les moustiques L3-5 sélectionnés pour leur résistance aux parasites simiens et murins (Collins et *al.*, 1986 ; Blandin et *al.*, 2004).

IV- Diagnostic biologique de l’infection à *Plasmodium* :

Le diagnostic de l’infection à *Plasmodium* chez l’homme ou le moustique repose sur la détection du parasite dans un échantillon biologique (sang humain, estomac ou glande salivaire de moustique) par des méthodes directes ou indirectes (OMS, 2014). Trois méthodes sont généralement utilisées :

IV-1- La microscopie :

La microscopie permet l’observation de différents stades de développement du parasite.

Chez les moustiques, le diagnostic d’infection à *Plasmodium* est réalisé par l’observation d’oocystes et de sporozoïtes entre lame et lamelle, sur estomac et glandes salivaires, respectivement. Ce qui permet d’une part de déterminer la compétence vectorielle et d’autre part l’indice sporozoïtique⁴ des vecteurs. Les oocystes peuvent être observés à l’état coloré ; l’estomac de moustiques est immergé dans du mercurochrome dilué à 0,4% et monté entre lame et lamelle (Robert et Vincent, 1992). Les sporozoïtes, eux, sont observés dans les glandes salivaires, à l’état frais dans du PBS 1X, entre lame et lamelle (Bassene et *al.*, 2009).

Chez l’homme, le diagnostic microscopique des infections à *Plasmodium* est basé sur les examens de gouttes épaisses et de frottis mince. Ce sont des étalements de sang, respectivement de façon concentrique et rectiligne, sur une lame porte-objet. La fixation des cellules, le séchage et la coloration, dans cet ordre, font suite à l’étalement et précèdent l’observation à l’objectif x100.

- **La goutte épaisse (GE)** : c’est une méthode de détection des stades sanguins du parasite sur un étalement épais. A l’examen microscopique, le nombre de parasites (trophozoïtes et gamétocytes) est dénombré en fonction du nombre de globules blancs. L’estimation du nombre de parasites est donnée en considérant qu’un sujet humain a 8000 leucocytes en moyenne par microlitre (μL) de sang. Le seuil de détection est d’environ 10 à 20 parasites/ μL de sang (El Ghouszi Garraud, 2006). Elle permet aussi de distinguer, d’après leurs formes caractéristiques, les différentes espèces de *Plasmodium*.

- **Le frottis sanguin (FS)** : est une méthode de détection des parasites dans un étalement de sang formant une couche uniforme de cellules sur une lame porte-objet. La densité parasitaire est

⁴ L’indice sporozoïtique est le pourcentage d’anophèles porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires. C’est un paramètre majeur pris en compte lors des mesures de transmission du parasite dans une population naturelle.

déterminée en comptant le nombre d'érythrocytes infectés par rapport au nombre total d'érythrocytes par champs microscopique. Le seuil de détection des parasites est de l'ordre de 150 à 200 parasites/ μ L de sang (El Ghouszi et Garraud, 2006).

En conditions de laboratoire, avec le développement des méthodes de transgénèse, l'observation et la quantification des différents stades de développement du parasite sont rendues possible en microscopie à fluorescence et cytométrie à flux (Franke-Fayard et al., 2004 ; Talman et al., 2010). En effet des souches transgéniques de *P. berghei* ou *P. falciparum* expriment constitutivement une protéine fluorescente (GFP : *Green Fluorescent Protein*) à l'origine de leur identification. Pour l'identification de *P. falciparum*, le transgène est inséré dans le locus Pf47 et est exprimé chez tous les stades du cycle de développement chez le moustique (Talman et al., 2010). Alors que chez *P. berghei*, le transgène est inséré dans une région très conservée du génome contrôlée par le promoteur du gène 1-alpha qui code pour l'expression du facteur d'élongation retrouvé au niveau des ribosomes dans le cytoplasme (Franke-Fayard et al., 2004).

IV-2- Les méthodes immunologiques :

Chez l'homme, les tests immunologiques utilisés le plus souvent pour le dépistage des infections à *Plasmodium* sont des tests de diagnostic rapide (TDR) d'antigènes (Ag) du parasite. Ce sont des méthodes indirectes par immunochromatographie (Maltha et al., 2013). Elles sont pratiquées en routine dans les zones de paludisme stable et utilisées en complément ou en substitution à la microscopie optique. Les Ag ciblés sont le plus souvent caractéristiques d'espèce (*PfHRP₂* : *P. falciparum Histidin-Rich Protein-2*) (Beadle et al., 1994) ou du genre (*pLDH* : *Plasmodium Lactate DesHydrogenase*) (Hunt-Cooke et al., 1999) et exprimés aux stades asexués du développement parasitaire chez l'homme. Souvent, des phénomènes de faux positifs sont observés du fait de la persistance de la protéine *PfHRP₂* dans le sang jusqu'à 2 semaines après le traitement du paludisme (Abeku et al., 2008). La sensibilité des tests dépend largement de la densité parasitaire (Luchavez et al., 2011).

Chez les moustiques, les tests ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) sont utilisés comme méthodes immunoenzymatiques pour le dépistage des infections à *Plasmodium* au niveau des glandes salivaires (ELISA-CSP) (Burkot, 1984 ; Wirtz, 1987). Ces tests permettent la détection de l'antigène circumsporozoïtaire (CSP) exprimé à la surface des sporozoïtes. Ils ont largement été utilisés pour la détermination de l'indice sporozoïtique dans les populations de vecteurs (Collins et al., 1988 ; Boudin et al., 1988).

IV-3- Les méthodes de biologie moléculaire :

Les méthodes de détection moléculaires permettent de mettre en évidence la présence d'ADN ou d'ARN du parasite dans les échantillons. Différentes techniques basées sur l'amplification de

séquences nucléotidiques spécifiques sont disponibles, allant de la PCR simple à la PCR multiplexe, de la PCR nichée à la qPCR (Barker, 1992 ; Snounou et *al.*, 1993 ; Rougement, 2004 ; Kamau et *al.*, 2011). La PCR nichée développée par Snounou et *al.*, 1993 permet de détecter les 4 principales espèces de *Plasmodium* humains, cette méthode est encore largement utilisée dans les études épidémiologiques et notamment dans les zones de faible endémie où les infections sub-microscopiques sont nombreuses (Roper, 1987 ; Okell, 2009). De nombreux autres protocoles ont été mis au point au fur et à mesure des développements technologiques (Rougement, 2004 ; Kamau et *al.*, 2011, Imwong et *al.*, 2014). Les seuils de détection deviennent de plus en plus bas, moins de 20 parasites/mL de sang (Imwong et *al.*, 2014), 1 oocyste/estomac (Boissière et *al.*, 2013) et 10 sporozoïtes/glande salivaire (Marie et *al.*, 2013).

Les méthodes de détection par amplification génique ne sont pas reconnues pour le diagnostic du paludisme et ne permettent pas la prise en charge clinique des cas (Padley, 2008 ; Alemayehu et *al.*, 2013 ; OMS 2014). Néanmoins, ces outils sont largement utilisés en recherche, aussi bien dans les études épidémiologiques et entomologiques, que dans les enquêtes de surveillance ou les investigations nécessitant la détection des porteurs de gamétocytes. Dans ce dernier cas, la détection des gamétocytes repose sur la mise en évidence de transcrits spécifiquement exprimée à ce stade de développement, le plus souvent la *Pfs25*, et l'amplification repose sur les techniques qPCR ou qRT-PCR (Babiker, 1999 ; Wampfler, 2013 ; Schneider, 2004).

V- Épidémiologie du paludisme au Cameroun :

Au Cameroun, les statistiques du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) indiquent que l'incidence de la maladie et la mortalité ont été réduites respectivement de 41% et 68% entre 2000 et 2015 (PNLP-Cameroun, 2016). En 2016, 1 369 512 cas ont été enregistrés dans le pays avec 4 000 décès, dont 70% d'enfants de moins de 5 ans. La région du Nord était la plus affectée avec une morbidité de 29,3% tandis que le Nord-ouest enregistrerait la morbidité la plus basse avec 13,06%.

La réduction de l'incidence et de la mortalité du paludisme serait la conséquence des actions menées par le gouvernement camerounais, à savoir, la gratuité du traitement préventif intermittent chez la femme enceinte mise en œuvre depuis 2005, la gratuité du traitement du paludisme simple et grave chez les enfants de moins de 5 ans depuis février 2011 et 2014 respectivement et la réduction du coût du traitement du paludisme simple dans les formations sanitaires à moins de 300 FCFA. La distribution gratuite de plus de 8 millions et 12 millions de moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée d'action (MILDA) aux populations respectivement en 2011 et entre 2015 et 2016 aurait également contribué à contrôler l'endémie. Il est toutefois rapporté par le PNLN que le taux de couverture en moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) serait de 70%, mais avec seulement 56% du taux d'utilisation.

La dynamique de transmission et le profil épidémiologique varient au Cameroun quand on quitte de la forêt au sud vers le sahel à l'extrême-nord en passant par la savane. Le pays s'étend sur 3 climats (le climat équatorial dans le sud, le climat tropical humide au centre et le climat tropical de type soudano-sahélien au nord) qui se superposent aux 3 différents faciès épidémiologiques (Figure 6) :

- Le faciès soudano-sahélien à l'Extrême-nord où la transmission est limitée durant les trois mois de saison de pluies, elle est interrompue pendant la saison sèche qui dure environ 9 mois. Ici le vecteur majeur est *An. arabiensis* ; *An. gambiae* et *An. coluzzii* n'y sont retrouvés que par endroits (PNLP-Cameroun, 2007).

- Le faciès des plateaux de l'Adamaoua entre l'extrême-nord et le centre-et-sud où la transmission dure le temps de la saison des pluies, soit d'environ 6 mois. La distribution et l'abondance des vecteurs du paludisme sont étroitement liées à la qualité du réseau hydrographique dans la région. Le vecteur majeur est *An. funestus*, secondé par *An. gambiae* et peu souvent *An. coluzzii* (Morlais et Nsango, communication personnelle).

- Les faciès tropical humide au centre et équatorial forestier au sud, où la transmission dure toute l'année en raison de la pluviométrie abondante ; elle est toutefois plus importante pendant les deux saisons pluvieuses. De nombreux vecteurs y sont retrouvés et leur contribution dans la transmission est variable : *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* (Fontenille et al., 2003 ; Cohuet et al., 2004 ; Wondji et al., 2005 ; Kamdem et al., 2012 ; Antonio-Nkondjio and Simard, 2013).

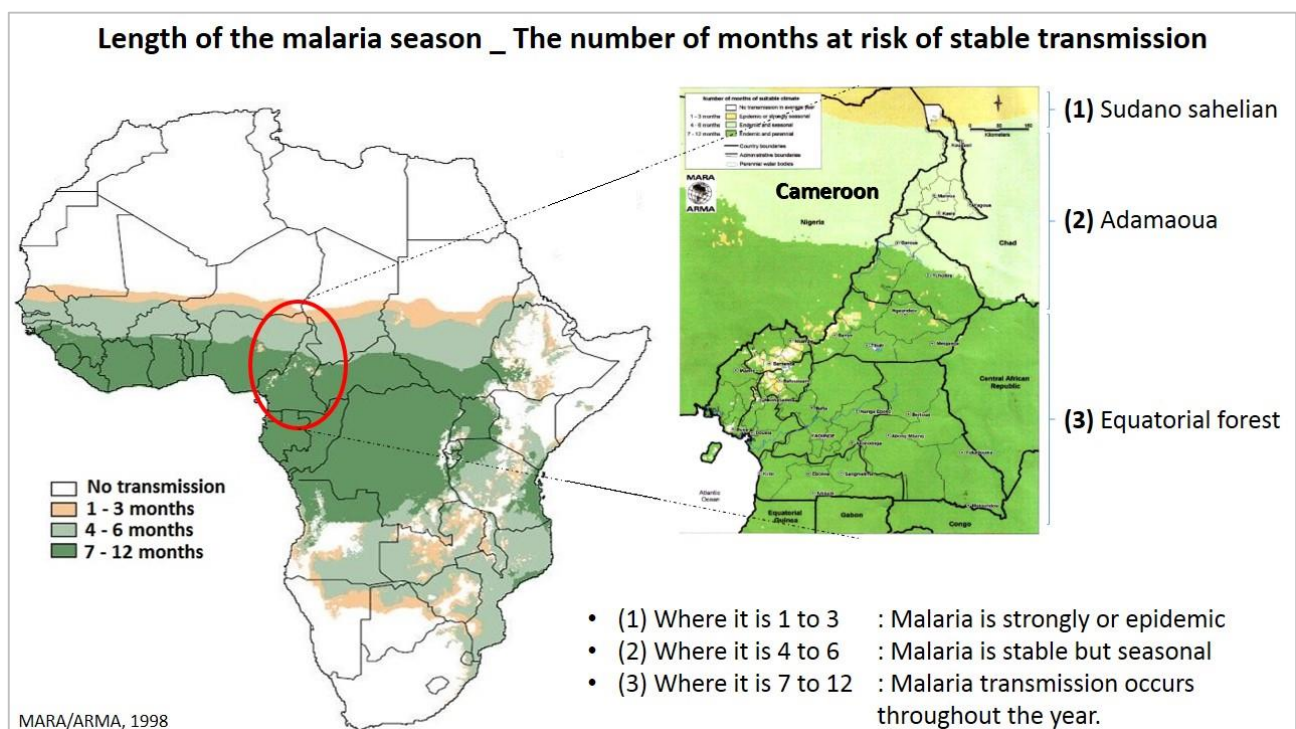


Figure 6 : Faciès épidémiologique du paludisme au Cameroun. (PNLP-Cameroun, 2007).

VI- Stratégies de contrôle du paludisme :

L'amélioration de la couverture sanitaire en matière de traitement et de prévention du paludisme à l'échelle mondiale, a permis une nette régression des taux d'incidence et de mortalité depuis 2010 (WHO, 2016). Les stratégies de contrôle reposent sur la prise en charge des cas (diagnostic et chimiothérapie) et la prévention (chimio prophylaxie, immunoprophylaxie et lutte antivectorielle).

VI-1- Traitement du paludisme :

Il repose sur la prise en charge clinique des cas de paludisme à l'aide de médicaments. Plusieurs molécules médicamenteuses sont disponibles, chacune caractérisée par ses propriétés biochimiques (pharmacocinétique, pharmacodynamique) et son principe actif. Suivant le stade de développement sur lequel elles sont actives, on distingue :

- Les schizonticides : Ce sont les antimalariques actifs sur les schizontes érythrocytaires (chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine, artémisinine et ses dérivés) ou hépatiques (doxycycline).
- Les gamétocytocides : Ce sont les antimalariques actifs sur les formes sexuées du parasite (primaquine).

L'OMS recommande pour la prise en charge des cas de paludisme simple le traitement à l'aide de combinaisons thérapeutiques à base des dérivés d'artémisinine (ACT), (WHO, 2016). De nos jours, de nombreuses molécules semi-synthétiques dérivées de l'artémisinine sont développées pour enrichir la gamme des combinaisons thérapeutiques. Les dérivés les plus connus sont l'artésunate, l'artémether et la dihydroartémisinine (Meshnick, 2002). Ces composés ont une activité antiparasitaire rapide, une demi-vie courte, et sont aussi bien tolérés.

Au Cameroun, les combinaisons thérapeutiques recommandées par le PNLP en première intention pour le traitement du paludisme simple sont : Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artémether-Luméfántrine (AL). Pour les accès palustres graves, chez l'enfant et l'adulte, l'Artésunate (AS) et l'Artémether injectables sont recommandés en première intention. Ce n'est qu'en cas d'échec que la quinine est utilisée en seconde intention (PNLP-Cameroun, 2016).

Le traitement du paludisme est quelquefois compromis sur le terrain par l'apparition des résistances aux antimalariques. La résistance aux antimalariques est associée à des mutations qui affectent différentes régions du génome du parasite. Les mutations conférant une résistance sont sélectionnées sous l'effet de la pression médicamenteuse. Depuis l'apparition et la diffusion de la résistance à la chloroquine dans les années 1960, *P. falciparum* est devenu résistant à tous les antimalariques mis sur le marché. L'OMS, depuis 2005, préconise pour le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum* l'usage d'associations thérapeutiques à base d'artémisinine afin de

prévenir l'apparition de résistances. Malgré cela, des parasites présentant une sensibilité diminuée à l'artémisinine sont apparus en Asie du Sud-Est (Dondorp, 2009 ; Ashley, 2014).

Actuellement, la résistance à l'artémisinine est largement étendue en Asie du sud-est (Cambodge, Thaïlande, Vietnam) et risque de se propager en Afrique du fait des flux migratoires entre les continents (Menard, 2016 ; Arieu, 2014 ; WHO, 2016).

VI-2- Chimio prophylaxie anti palustre :

La chimio prophylaxie est réservée essentiellement aux sujets à risque de développer des accès palustres graves. Ce sont entre autres : les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans, les sujets non immuns et immunodéprimés. Au Cameroun, la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) est recommandée chez les femmes enceintes pour le traitement préventif intermittent (TPI), et associée à l'Amodiaquine (SP-AQ), elle est utilisée pour la chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de moins de 5 ans en zone de transmission instable à l'instar des régions du Nord et de l'Extrême-nord (PNLP-Cameroun, 2016).

VI-3- Immunoprophylaxie anti palustre :

Actuellement, aucun vaccin antipaludique efficace n'est disponible. Mais plusieurs candidats font l'objet d'essais cliniques et pourraient voir le jour dans les prochaines années (Olotu et *al.*, 2013 ; Laurens, 2017 ; Gbédandé, 2017). Les vaccins ciblent des antigènes du parasite exprimés à différents stades du cycle de développement. Mais la diversité d'espèces de *Plasmodium* et le polymorphisme des différents stades de développement du parasite rendent difficiles les mises au point. On distingue différents vaccins, dirigés contre les stades pré-érythrocytaires, les stades sanguins ou les stades sexués chez le moustique.

Les vaccins dirigés contre les stades pré-érythrocytaires permettent de prévenir l'invasion du foie par les sporozoïtes, d'éviter le développement du parasite dans les hépatocytes et d'empêcher l'évasion des mérozoïtes vers les érythrocytes dans le sang circulant.

Les vaccins dirigés contre les stades sanguins sont développés suivants deux différentes approches : La première approche vaccinale cible des antigènes de surface des mérozoïtes tels que l'AMA (*Apical Membrane Antigen*) et la MSP (*Merozoïte Surface Protein*), afin de prévenir l'invasion des érythrocytes ; la deuxième approche vaccinale est orientée contre les antigènes exprimés chez le parasite à la surface des érythrocytes infectés comme PfEMP₁ (*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*).

Les vaccins bloquant la transmission (TBVs pour *Transmission Blocking Vaccines*) ont pour but d'induire chez l'homme la production d'anticorps dirigés contre les stades présents chez le

moustique (gamétocytes ou ookinètes) pour bloquer la transmission avant la formation des oocystes (Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao, 2010).

VI-4- Lutte antivectorielle :

La lutte antivectorielle est une stratégie qui vise à diminuer voire éliminer les populations de vecteurs, à réduire leur longévité limitant ainsi la probabilité qu'un anophèle infectée devienne potentiellement infectante, ou à empêcher le contact moustique-homme (Oliver & Brooke, 2016).

L'approche chimique :

L'approche de lutte adoptée par les pays endémiques, y compris le Cameroun, intègre l'utilisation de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) et les pulvérisations intradomiciliaires (PID) pour les préventions de masse et individuelle.

- Les MILDA constituent une barrière physique pour limiter le contact homme-vecteur (Darriet, 2000). Selon l'OMS, la couverture en MILDA des populations d'Afrique sub-Saharienne est passée de 30% à 53% entre 2010 et 2015, et a été associée à une réduction de 13% de l'incidence sur le continent.

Au Cameroun, la deuxième campagne de distribution des MILDA a démarré depuis 2015, pour venir en appui à la précédente campagne de 2011, avec pour objectif d'assurer une couverture d'au moins 80% de la population. Toutefois, seules quatre des dix régions que compte le pays ont été couvertes (Est, Sud, Nord-Ouest, Sud-Ouest). On note néanmoins une augmentation de la couverture des ménages en MILDA, qui est passée de 66% à 91% (pour les quatre régions sus-citées) entre 2011-2015. De nombreuses études ont montré qu'une utilisation massive des MILDA était associée (1) à une réduction de la morbi-mortalité et du risque d'anémie chez les enfants de moins de 5 ans (Ranson et *al.*, 2011 ; WHO, 2016), (2) à une modification du comportement des moustiques (Gatton et *al.*, 2013 ; Oliver & Brooke, 2016 ; Sougoufara et *al.*, 2017), (3) à une augmentation de la mortalité des vecteurs, même au sein des populations de moustiques résistantes aux pyréthrinoïdes (Etang et *al.*, 2016). Cependant l'efficacité des MILDA ne dépend pas seulement de la molécule insecticide utilisée pour l'imprégnation, mais aussi de sa bonne maintenance et de son utilisation par les communautés.

- Les PIDs consistent à asperger une dose d'insecticide à effet rémanent sur les surfaces intérieures des habitations, là où les vecteurs sont susceptibles de se poser (murs et plafonds). L'effet principal des insecticides est de tuer les moustiques quand ils pénètrent dans les maisons et se posent sur des surfaces traitées pendant un temps plus ou moins long. Cette méthode cible les moustiques endophages⁵ et endophiles⁶, cependant les PIDs ne sont pas efficaces contre les vecteurs exophiles⁷ (Djogbénu, 2009).

⁵ Moustiques endophages : Moustiques qui prennent leur repas de sang à l'intérieur des habitations.

⁶ Moustiques endophiles : Moustiques qui après leur repas de sang se reposent essentiellement dans les habitations.

⁷ Moustiques exophiles : Moustiques qui après leur repas de sang se reposent essentiellement hors des habitations.

Des phénomènes de résistance à différentes molécules d'insecticides sont observés au sein des populations de vecteurs (Antonio-Nkondjio et *al.*, 2017). Cette résistance est conférée par 3 mécanismes : (1) la résistance comportementale qui s'observe par la modification des heures et lieux de piqûres des moustiques, (2) la résistance métabolique qui se traduit par l'augmentation des réactions de détoxification de l'insecticide au moyen de différentes enzymes (estérases, oxydases, catalases) et (3) la résistance moléculaire qui se manifeste par l'apparition d'une mutation entraînant l'altération du site d'action ciblé par l'insecticide (Martinez-Torres et *al.* 1998 ; Ranson et *al.* 2000 ; Etang et *al.*, 2007 ; Nwane et *al.*, 2013 ; Müller et *al.*, 2008).

D'autres méthodes de lutte antivectorielle englobent l'aménagement de l'environnement en assurant le drainage des eaux stagnantes, l'assèchement des marais, l'hygiène péri-domestique, les pulvérisations d'insecticides dans les gîtes et l'utilisation de bactéries entomopathogènes comme *Bacillus thuringensis*. Toutefois, ces mesures ne pourront être applicables que si on a une bonne connaissance à la fois, de la localisation des vecteurs, de leur écologie et de l'accessibilité des gîtes larvaires (Dambach et *al.*, 2014 ; Dambach et *al.*, 2016a ; Dambach et *al.*, 2016b ; Ingabire et *al.*, 2017).

De nouvelles méthodes de contrôle des populations de moustiques vecteurs sont également en cours d'évaluation, notamment le *gene-drive* ou forçage génétique qui permettrait de répandre efficacement dans les populations naturelles de moustiques un facteur de résistance aux parasites (modification des populations), ou bien un facteur réduisant la fertilité des femelles et visant à réduire ou supprimer les populations ciblées (Gantz et *al.*, 2015 ; Hammond et *al.*, 2015).

Partie II : Réponse immunitaire et interactions *An. gambiae* - *P. falciparum* :

Au cours de son développement chez le moustique (Figure 7), le parasite subit de profondes modifications morphologiques au travers de différents stades. L'activation des gamètes, la fécondation et la formation du zygote sont des étapes de développement qui se produisent dans la lumière de l'intestin et peuvent être perturbés par des anticorps bloquants d'origine humaine spécifiques au parasite (Boussema et al., 2012). Certains parasites parviennent à se développer en ookinètes pour traverser plusieurs barrières anatomiques en faisant face à une réponse immunitaire innée élaborée par le moustique hôte. Elle se met en place environ 19 heures après la prise du repas de sang, lorsque les ookinètes entament la traversée de l'épithélium intestinal (Vlachou et al., 2004), sous la médiation des facteurs humoraux et cellulaires activés au travers de différentes voies de signalisation (Povelones et al., 2016 ; Smith et al., 2014).

La réponse antiparasitaire chez les moustiques est à l'origine d'une perte d'au moins 80% de parasites (Blandin et al., 2004 ; Smith et al., 2014), et limite la dispersion de certains haplotypes de *P. falciparum*, ce qui influence la structure génétique des populations de parasites ainsi que l'épidémiologie du paludisme dans le monde (Molina-cruz et al., 2015). Elle contribue à déterminer la compétence vectorielle des moustiques, c'est à dire leur capacité à supporter le développement du parasite et sa transmission à un nouvel hôte humain (Dye, 1992 ; Lord et al., 1996). La compétence vectorielle est un déterminant majeur de la transmission ; elle dépend des facteurs intrinsèques du système vecteur-pathogène et est sous dépendance d'un contrôle génétique (Collins et al., 1986). Les travaux sur la compétence vectorielle des anophèles ont permis de mettre en évidence le support génétique de la résistance des moustiques au développement du parasite (Blandin et al., 2004 ; Holm et al., 2012), de constituer en laboratoire les lignées de moustiques résistants (L3-5) et sensibles (G3, Ngouso-S1, Ndokayo-S1) (Collins et al., 1986 ; Notre travail), et de construire des modèles (*An. gambiae/P. berghei*) pour l'étude des interactions vecteur/parasite (Blandin et al., 2004 ; Osta et al., 2004). Elle a aussi permis de déterminer les vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun (Boissière et al., 2013 ; Ndo et al., 2016) tout en mettant en évidence les niveaux de co-adaptation vecteurs/parasite sympatriques et allopatriques (Cohuet et al., 2006 ; Harris et al., 2012). Par ailleurs, l'étude de la compétence vectorielle des anophèles a permis d'identifier des souches de parasite « virulents » et « avirulents », tout en mettant en évidence des mécanismes d'évasion élaborés par certains isolats pour échapper à la réponse immunitaire (Molina-cruz et al., 2012 ; Molina-cruz et al., 2013 ; Ramphul et al., 2014 ; Molina-cruz et al., 2015).

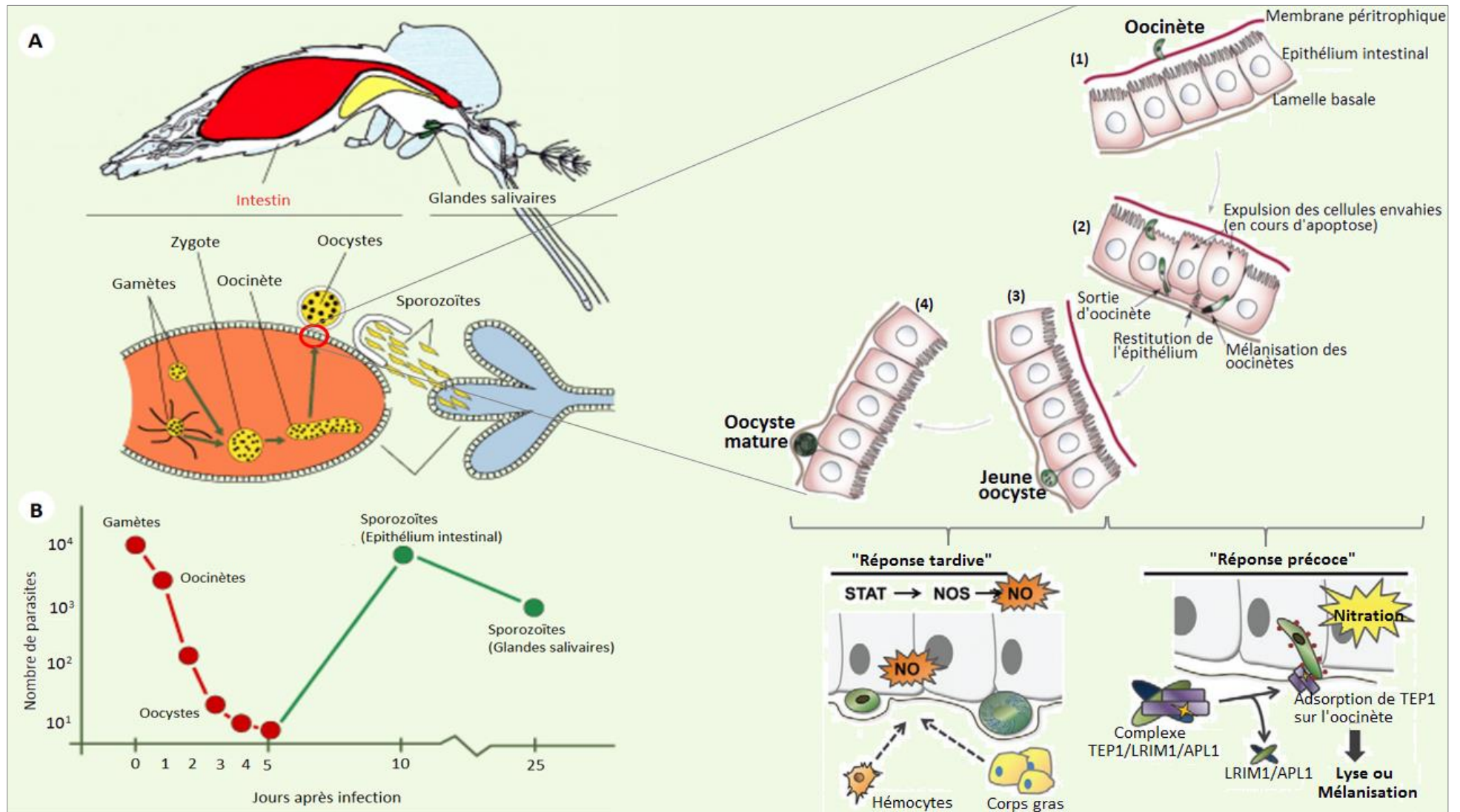


Figure 7 : Développement de *Plasmodium* chez le moustique et réponse antiparasitaire au niveau de l'intestin.
 (Blandin et Levashina, 2004 ; Vlachou et al., 2006 ; Smith et al., 2014)

I- Interactions moustique/parasite : Modèles d'interactions *Anopheles-Plasmodium*

Les mécanismes moléculaires de l'immunité dans le système *Anopheles-Plasmodium*, ont été largement étudiés dans des modèles d'interactions vecteur-parasite de laboratoire tels qu'*An. gambiae-P. berghei* mais aussi *An. gambiae-P. yoelii*, *An. stephensi-P. chabaudi*. La non-pathogénicité de *P. berghei* pour l'homme et la possibilité de transformer aisément son génome en font un modèle particulièrement intéressant (Margos et al., 2001).

En 1986, Collins et collaborateurs avaient montré, sur la base du modèle simien *An. gambiae-P. cynomolgi*, l'existence d'une compatibilité génétique entre le vecteur et le parasite. En effet, la souche L3-5 d'*An. gambiae* résistante à *P. cynomolgi* et capable d'encapsuler les parasites dans de la mélanine a été sélectionnée génétiquement (Collins et al., 1986). Les analyses génétiques de cartographie de *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) avaient révélé des zones du génome de moustique impliquées dans la résistance au *Plasmodium* (Zheng et al., 1997 ; Zheng et al., 2003). De même, Vernick et collaborateurs, avec le modèle aviaire *An. gambiae-P. gallinaceum*, ont mis en évidence le phénomène de lyse des parasites au niveau de la membrane basale de l'épithélium intestinal et sont parvenus à générer une autre souche de vecteur SUAF2 réfractaire au parasite (Vernick et al., 1995). L'étude des modèles d'interaction *Anopheles-Plasmodium*, et particulièrement du modèle *An. gambiae-P. berghei*, a permis d'identifier des gènes pro/antiparasitaires qui participent à la réponse immunitaire chez le moustique, et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont à l'origine de l'élimination des parasites et de la réparation de l'épithélium intestinal affecté par l'invasion des ookinètes (Blandin et al., 2004 ; Osta et al., 2004b Povelones et al., 2016 ; Smith et al., 2014 ; Han et al., 2000 ; Vlachou et al., 2006).

Ces travaux ont largement inspiré les études des interactions *Anopheles-Plasmodium* en condition de terrain avec le parasite humain *P. falciparum* et son vecteur naturel *An. gambiae* (Cohuet et al., 2006 ; Riehle et al., 2006 ; Obbard et al., 2008 ; Mitri et al., 2009 ; White et al., 2010).

II- Barrières anatomiques de l'immunité chez le moustique :

La membrane péritrophique et l'épithélium intestinal (Figure 7) sont les principales barrières anatomiques auxquelles font face les ookinètes lors de leur formation dans l'intestin du moustique. La membrane péritrophique représente la première barrière anatomique contre le parasite. Elle est d'aspect extensible, semi-perméable, contenue à l'intérieur de l'intestin du moustique. Elle est formée à chaque repas de sang et sert à contenir le bol alimentaire au cours de la digestion (Shao et al., 2001). La membrane péritrophique est composée de chitine, de glycoprotéines et de protéoglycanes (Peters, 1992 ; Wang & Granados, 2001). L'épithélium intestinal est un tissu constitué d'une simple assise de

cellules contigües polarisées, liées entre elles par des jonctions serrées, avec une activité endocrine (Hecker, 1997 ; Houk & Hardy, 1982). La face apicale est orientée vers la lumière de l'estomac et repliée en microvillosités. Les cellules sécrètent des enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, et l'amilopeptidase) dans la lumière du tube digestif lors de l'absorption des nutriments provenant du repas de sang (Billingsley & Hecker, 1991 ; Horler & Briegel, 1995). Ces enzymes sont impliquées dans la digestion du repas de sang ingéré au niveau de la région postérieure de l'estomac (Brown & Lea, 1989). L'épithélium intestinal est un tissu qui joue un rôle majeur dans la lutte contre le développement des parasites ; c'est au niveau des cellules épithéliales que la réponse immunitaire précoce contre les ookinètes de *Plasmodium* est initiée à la suite de l'activation de différentes voies de signalisation à l'origine de la synthèse de peptides antimicrobiens (Saraiva et al., 2016). Sur la face basale, l'épithélium intestinal est tapissé d'une membrane basale extensible qui baigne dans l'hémolymphe (Clayton et al., 2014).

III- Pénétration des ookinètes dans l'épithélium intestinal :

Pour traverser la membrane péritrophique les ookinètes sécrètent des chitinases à leur extrémité antérieure (Sinden et al., 2004). Une fois parvenus sur la surface apicale de l'épithélium intestinal ils se glissent dans les replis de membranes formés par des microvillosités, avant de pénétrer le cytoplasme des cellules. La mobilité des ookinètes est effectuée par trois différents mouvements (rotation stationnaire, mouvements segmentaires et mouvements en spirale) qui permettent la traversée rapide de l'épithélium du pôle apical vers la face basale (Vlachou et al., 2004), probablement par voie intracellulaire dans un premier temps, puis intercellulaire (Shiao et al., 2006). Une partie au moins des cellules affectées par cette traversée subissent une apoptose marquée par l'altération progressive de leur morphologie (condensation de la chromatine, perte des microvillosités) et une modification de leur métabolisme (sécrétion abondante d'oxydases : NOS et HPX2/NOX5) (Han et al., 2000 ; Kumar et al., 2004 ; Oliveira et al., 2012). Elles desquament progressivement et les cellules adjacentes non-affectées s'étendent latéralement à partir du pôle basal, au moyen des filaments d'actine, de façon à maintenir la barrière épithéliale (Figure 7).

IV- Reconnaissance des motifs du pathogène et immunité basale :

La réponse immunitaire chez le moustique est initiée à la suite de la reconnaissance des motifs du pathogène, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), par les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Les PAMPs sont des motifs conservés, exprimés par les microorganismes (virus, bactéries, champignons, parasites). Ce sont par exemple, les peptidoglycanes des bactéries et le β -1,3-glucane des champignons. Les PRRs sont des récepteurs membranaires à la surface des cellules épithéliales, des hémocytes et des cellules du corps gras, ou des protéines du complément en

suspension dans l'hémolymphe. Ils sont de nature protéique ou glycoprotéique (Osta et al., 2004a). Les PRRs regroupent plusieurs familles et présentent une diversité remarquable chez les moustiques. Parmi elles on peut citer les PGRPs (*Peptidoglycan Recognition Proteins*), les FREPs (*Fibrinogen-RElated Proteins*), les TEPs (*ThioEster-containing Proteins*), le β -1,3 *glucan recognition proteins* aussi connu sous l'appellation de *Gram negative binding proteins* (GNBP), les CTLs (*C-Type Lectins*) et les LRRs (*Leucine-Rich Repeat containing proteins*) (Das et al., 2009 ; Palmer and Jiggins, 2015 ; Zhang et al., 2015). Leur implication dans la réponse antiparasitaire peut être directe (Ex : TEP1 se lie aux parasites et déclenche leur élimination, voir plus loin) ou indirectement élicitée par les bactéries commensales de l'intestin qui peuvent provoquer un stress oxydatif néfaste pour les parasites, ou bien déclencher des cascades de signalisation contrôlant l'expression de gènes antiparasitaires (Beier et al., 1994 ; Cirimotich et al., 2011).

En effet les moustiques sont porteurs de bactéries commensales, dans le tube digestif, qui induisent la mise en place d'une réponse immunitaire basale ou primaire pouvant influencer la compétence vectorielle des anophèles dans les interactions avec *Plasmodium* (Boissière et al., 2012 ; Dennison et al., 2014). La plupart de ces bactéries sont ingérées au stade larvaire (Gimonneau et al., 2014) et les espèces subissent une variation temporelle en fonction de l'âge du moustique (Tchioffo et al., 2016). Le rôle protecteur de la flore bactérienne contre *Plasmodium* a été démontré par l'utilisation d'antibiotique (Gentamicine 0,05%) afin de réduire le nombre et la diversité des bactéries présents dans le tube digestif des moustiques adultes avant ingestion de gamétocytes de *P. falciparum* (Beier et al., 1994). Ces expériences ont montré une augmentation importante (prévalence et niveau d'infection respectivement 3,7 et 5,7 fois supérieures aux contrôles non traités) de la sensibilité des moustiques *An. gambiae* à l'infection par le parasite humain. Et plus tard il a été prouvé qu'en effet, la flore bactérienne du tube digestif des moustiques peut moduler la réponse antiparasitaire (Dong et al., 2009 ; Tchioffo et al., 2013). Les mécanismes de régulation ne sont pas encore tous clairement élucidés, mais on sait par exemple que des souches commensales d'*Enterobacter* produisent des ROS (*Reactive Oxygen Species*) qui sont néfastes aux ookinètes (Cirimotich et al., 2011). De même, l'activation de la voie de signalisation Imd (facteur de transcription NF- κ B : Rel2) par le microbiote intestinal via les récepteurs PGRP-LC et PGRP-LA limite le développement des parasites *P. berghei* et *P. falciparum* tandis que PGRP-LB, qui contrôle négativement la voie Imd, rend les moustiques plus permissifs à *P. falciparum* (Meister et al., 2006 ; Gendrin et al., 2017).

V- Voies de signalisation intracellulaire :

La reconnaissance des motifs du pathogène induit parfois une cascade de réactions enzymatiques à l'origine de l'activation des voies de signalisation et la transduction des signaux marquée par la synthèse et l'excrétion des peptides antimicrobiens au niveau des cellules épithéliales,

des cellules du corps gras et des hémocytes (Hillyer, 2010 ; Cirimotich et *al.*, 2010). Chez *An. gambiae*, 4 principales voies de signalisation (JNK, Toll, Imd et JAK/STAT) sont impliquées dans la réponse immunitaire (Severo and Levashina, 2014).

V-1- Voie de signalisation JNK :

Les gènes régulés par la voie JNK chez *An. gambiae* sont contrôlés par l'enzyme *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) qui est à l'origine de l'activation de la kinase Hep (*Hemipterous*). Celle-ci est à son tour à l'origine de l'activation des facteurs de transcription Jun et Fos, formant un dimère Jun/Fos sous l'appellation de Complexe AP-1 (*Activator Protein 1*) (Garver et *al.*, 2013). L'induction de la voie JNK en amont est dépendante de la kinase MAP3Ks (*Mitogene Activating Protein Kinase Kinase Kinase*) (Horton et *al.*, 2011). Le mécanisme d'activation de la kinase JNK (Figure 8) dans le cytoplasme s'effectue par phosphorylation. Il est régulé par la phosphatase Puc (*Puckered*) qui agit par rétrocontrôle négatif sur l'enzyme JNK (Garver et *al.*, 2013).

La voie JNK est impliquée dans la réponse contre les parasites murin *P. berghei* (Garver et *al.*, 2013) et humain *P. falciparum* (Nsango et *al.*, 2013 ; Ramphul et *al.*, 2014 ; Smith and Jacobs-Lorena, 2015) où elle contrôle l'expression des oxydases HPX2 (*Heme Peroxidase2*) et NOX5 (*NADPH Oxidase5*), qui participent au marquage de l'épithélium intestinal et des ookinètes par nitration (Oliveira et *al.*, 2012), et à l'expression d'autres protéines antiparasitaires impliquées dans la lyse du parasite, telles que TEP1 et FBN9 (Garver et *al.*, 2013). Par ailleurs la voie JNK participe aussi à la réponse au stress car les cellules épithéliales affectées par la traversée des ookinètes expriment, sous l'induction du facteur Fos, des protéines enzymatiques régulatrices de lésions cellulaires à l'instar de la transglutaminase 2 (TGase2) qui est associée aux phénomènes de cicatrisation et coagulation ainsi qu'à la mort de *P. falciparum* chez *An. gambiae* (Nsango et *al.*, 2013).

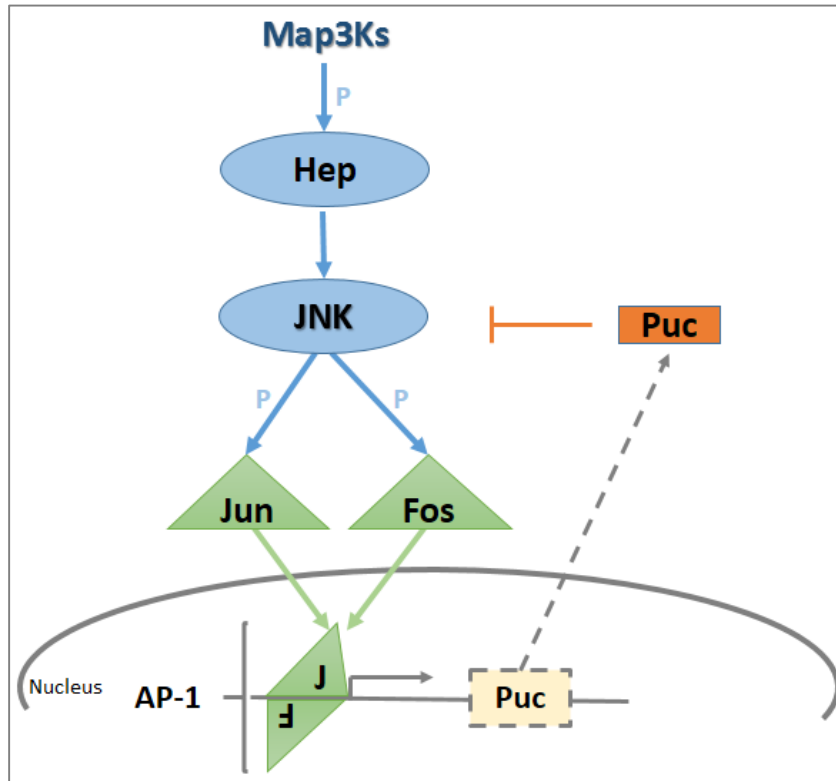


Figure 8 : Schéma d'activation et régulation de la voie JNK chez *An. gambiae* (Ramphul et al., 2014)

Après induction de la voie JNK, par phosphorylation de l'enzyme *c-Jun N-terminal Kinase* par le complexe enzymatique Map3Ks, La cascade de réaction qui s'en suit conduit à l'activation des facteurs de transcription Jun et Fos qui migrent dans le noyau s'hybridant en un hétérodimère à l'origine de l'activation des gènes effecteurs.

V-2- Voie de signalisation Toll :

Chez les moustiques, la voie Toll (Figure 9) est contrôlée par le facteur de transcription Rel1, aussi appelé Gambif1 chez *An. gambiae*, homologue de Dorsal et Dif chez *D. melanogaster* (Barillas-Mury et al., 1996 ; Sang Woon Shin et al., 2005). Cactus est ainsi le régulateur négatif de la voie Toll chez les moustiques ; il séquestre Rel1, empêchant sa translocation dans le noyau pour activer les gènes effecteurs. En 2006, Frolet et collaborateurs ont démontré que l'induction de la voie Toll par invalidation du gène Cactus, induit l'expression de gènes antiparasitaires chez *An. gambiae*, ce qui rend le moustique réfractaire au parasite murin (Frolet et al., 2006) mais pas au parasite humain *P. falciparum* (Nsango et al., données non publiées). De même, Garver et collaborateurs (2009) ont démontré que l'invasion de l'épithélium intestinal d'*An. gambiae* par les ookinètes du parasite humain est indépendante de la déplétion de Cactus (Garver et al., 2009).

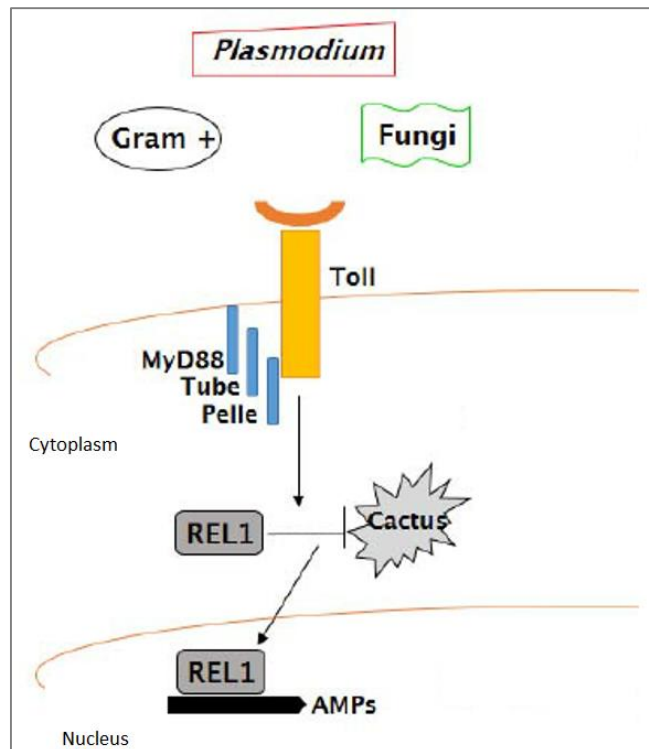


Figure 9 : Schéma d'activation et régulation de la voie Toll chez *An. gambiae*.

(Simoes and Chandrasekar, 2014)

La voie Toll est induite par un complexe sous membranaire lié à la protéine transmembranaire Toll. L'activation de cette voie conduit à la libération de Rel1 qui est le facteur de transcription séquestré par Cactus. Une fois libéré Rel1 migre dans le noyau pour activer les gènes effecteurs.

V-3- Voie de signalisation Imd :

Les travaux sur *D. melanogaster* ont permis de comprendre l'implication de la voie Imd sur le contrôle de l'expression des gènes antiparasitaires chez *An. gambiae* (Figure 10). En effet les récepteurs PGRPs (*Peptidoglycan Recognition Proteins*) se lient aux molécules dérivées des pathogènes (PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Le PGRP-LC transmembranaire, est le principal récepteur lié à l'activation de la voie Imd (Choe et al., 2002 ; Gottar et al., 2002). Cette activité est renforcée dans l'hémolymphe par PGRP-SD (Takehana et al., 2002) qui peut se lier directement aux PAMPs. L'activation de PGRP-LC induit un changement conformationnel qui favorise le recrutement du complexe IMD/FADD/DREDD vers la membrane cytoplasmique. Et il s'en suit une polyubiquitination du DREDD par la ligase IAP₂. L'activation, par clivage, de IMD est assurée par DREDD ; elle donne suite à l'exposition du site K63 de IMD pour la polyubiquitination, par les enzymes IAP2 et Bendless/Effete/Uev 1a (Paquette et al., 2010 ; Meinander et al., 2012). Les chaînes K63-polyubiquitine, peuvent semblablement servir d'activateurs de TAK1 kinase (Paquette et al., 2010). La TAK1 active par phosphorylation le complexe IKK constitué de 2 sous-unités β et γ

V-4- Voie de signalisation JAK/STAT :

Le principe d'induction de la voie JAK/STAT (Figure 11) repose sur l'activation, au niveau de la membrane cellulaire, des protéines STATs cytoplasmiques. Cette action est induite par la kinase JAK (*Janus Kinase*) à la suite de la fixation du ligand extracellulaire sur le récepteur transmembranaire ; elle permet aux protéines STATs de s'apparier en formant des dimères STAT-STAT. Ceux-ci migrent dans le noyau où ils jouent le rôle de facteur de transcription. La double aptitude des protéines STATs à répondre au signal extracellulaire et à induire la transcription est à l'origine de son nom : *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). Le mécanisme d'activation des protéines STATs dans le cytoplasme s'effectue par phosphorylation des résidus de tyrosine lors de l'interaction avec JAK. La kinase JAK est constituée de 2 domaines presque identiques : un domaine catalytique (Domaine kinase) et un domaine pseudo-kinase, régulateur du premier (Arbouzova and Zeidler, 2006). L'interaction JAK-STAT peut être inhibée chez *An. gambiae* par des protéines suppresseurs de la transduction ; ce sont les protéines SOCS (*Suppressor of cytokine signaling proteins*). Elles jouent un rôle de rétrocontrôle négatif sous l'activation de la voie JAK/STAT (Gupta et al., 2009).

Chez *An. gambiae*, 2 différentes protéines STATs ont été identifiées : AgSTAT-A et AgSTAT-B (Barillas-Mury et al., 1999 ; Christophides et al., 2002). Elles participent à la régulation de la réponse anti-infectieuse chez le moustique. AgSTAT-B est impliqué en amont dans la régulation post-transcriptionnelle d'AgSTAT-A. Et ce dernier est à l'origine de l'activation transcriptionnelle du gène NOS (*Nitric Oxide Synthase*) qui catalyse la synthèse du monoxyde d'azote (NO) à partir des résidus d'Arginine dérivés du repas de sang ; le NO et les espèces oxydantes dérivées (ROS/RNS) peuvent provoquer la mort du parasite dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'intestin (Han et al., 2000). L'induction de NOS, ainsi que celle de HPX2/NOX5 dont l'expression est contrôlée par la voie JNK (Garver et al., 2013) induit également la nitration de l'épithélium intestinal au niveau du site d'infection, et probablement aussi celle des parasites, menant au recrutement des hémocytes au niveau du site d'infection, et au relargage de microvésicules qui sont nécessaires à l'activation du système du complément du moustique et au marquage des parasites par TEP1 (Castillo et al., 2017).

Par ailleurs AgSTAT-A est associé à un autre facteur de transcription LL3 (*LITAF-Like transcription factor 3*) qui induit la prolifération, la différenciation et l'activation des hémocytes à l'origine de la réponse antiparasitaire tardive qui s'observe 7 à 9 jours après la prise du repas de sang (Smith et al., 2015 ; Kwon et al., 2017).

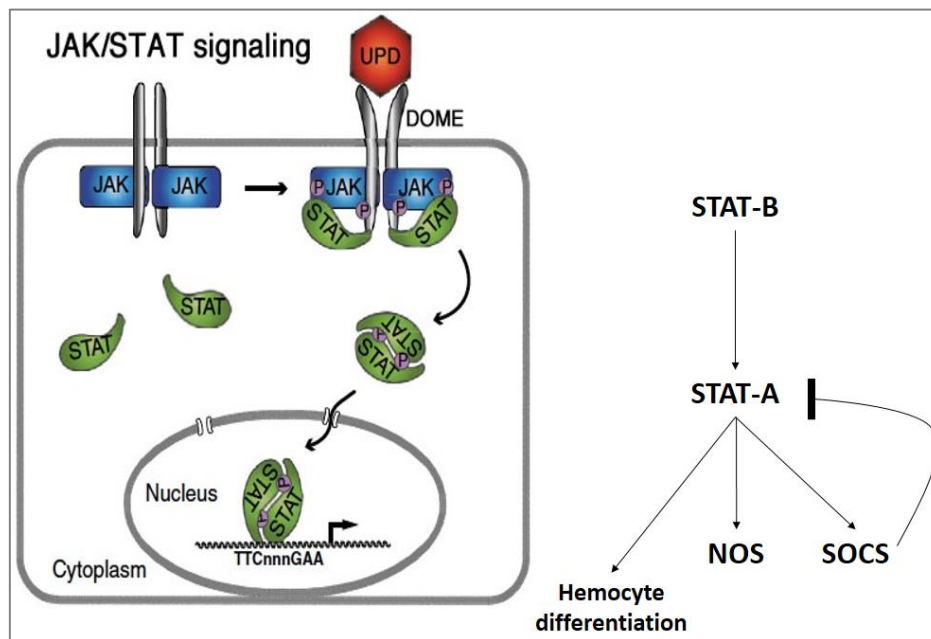


Figure 11 : Schéma d'activation et régulation des voies de signalisation JAK/STAT. A gauche : Chez *D. melanogaster* (Arbouzova and Zeidler, 2006). A droite : Chez *An. gambiae* (Gupta et al., 2009 ; Smith et al., 2015) ; il existe STAT B (STAT 1) et STAT A (STAT 2).

VI- Système du complément et réponse immunitaire à médiation humorale contre le parasite :

VI-1- Système du complément chez le moustique *An. gambiae* :

La protéine TEP1 (*ThioEster-containing Protein 1*) est une composante majeure de la réponse immunitaire chez le moustique, homologue du facteur C3 du complément chez les vertébrés. C'est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 160 kDa sécrétée par le corps gras (Volohonsky et al., 2017) et dans une certaine mesure par les hémocytes (Levashina et al., 2001). Elle est présente dans l'hémolymphe sous deux formes : une forme entière longue, TEP1-F et une forme mature clivée, TEP1cut, possiblement générée par diverses protéases dont l'identité n'est pas connue (Levashina et al., 2001). TEP1 est sécrétée dans l'hémolymphe sous sa forme longue TEP1-F (*TEP1 full-length form*) composé de 8 motifs macroglobuline (MG), d'un domaine en feuillet β (CUB) et d'un domaine thioester en hélice α (TED : *ThioEster binding Domain*). Le *TED domain* contient une boucle de 5 résidus d'acides aminés (GCGEQ) qui porte une liaison covalente thioester entre le groupement thiol (-SH₂) de la cystéine et le groupement acide (-COOH) de la glutamine (β -cystéinyl- γ -glutamyl). Sa structure tridimensionnelle est très proche de celle du facteur du complément C3, à la différence que

la protéine TEP1 ne contient pas de domaines anaphylatoxine et C345C (Baxter et *al.*, 2007). Elle a également une boucle flexible en amont du TED qui doit être accessible aux protéases, générant la forme TEP1cut. La forme mature TEP1cut est prise en charge par un complexe de 2 protéines à domaines riches en leucines, LRIM1 et APL1C qui permettent de maintenir TEP1cut en circulation dans l'hémolymphe et de prévenir son activation précoce et sa réaction avec les tissus du moustique (Fraiture et *al.*, 2009 ; Povelones et *al.*, 2009). Le complexe TEP1cut/LRIM1/APL1C comprend aussi d'autres protéines, dont trois autres membres de la famille des TEPs : TEP3, TEP4 et TEP9 (Povelones et *al.*, 2011).

Comme le facteur C3, TEP1 joue un rôle important dans l'opsonisation et la phagocytose des bactéries chez *An. gambiae* (Levashina et *al.*, 2001 ; Moita et *al.*, 2005 ; Blandin & Levashina, 2007) et possède une activité antiparasitaire centrale. L'invasion de l'épithélium intestinal par le parasite déclenche la production des enzymes NOS, HPX2/NOX5 qui entraînent la nitration des cellules infectées et probablement de la surface des parasites. Cette nitration est reconnue comme un signal par les hémocytes qui libèrent des microvésicules au niveau du site d'infection, probablement remplies des molécules antiparasitaires telles que TEP1, PPOs (Castillo et *al.*, 2017). Le phénomène de nitration est essentiel pour permettre à TEP1 de se lier à la surface des ookinètes de *Plasmodium* sur la face basale de l'épithélium intestinal du moustique (Oliveira et *al.*, 2012). Cette observation a été faite sur les lignées L3-5 et G3 d'*An. gambiae*, respectivement résistante et sensible au parasite murin (Collins et *al.*, 1986). L'invalidation post-transcriptionnelle de TEP1 par ARN interférence rend les moustiques résistants L3-5 sensibles au parasite, et augmente par 5 le nombre d'oocystes chez les G3 (Blandin et *al.*, 2004). L'inactivation de TEP3 mène à des phénotypes similaires mais plus modérés que celle de TEP1 (diminution de la phagocytose de *E. coli* et augmentation du nombre de parasites se développant dans les moustiques G3), suggérant que ces deux TEPs fonctionnent dans la même cascade.

Le mécanisme d'activation de TEP1 n'est pas complètement élucidé mais plusieurs éléments régulant le dépôt de TEP1 ont été identifiés. Le modèle actuel présente des similitudes avec la voie alternative du complément chez les mammifères (Severo et *al.*, 2014 ; Povelones et *al.*, 2016). En effet, le dépôt initial de TEP1 à la surface des pathogènes entrainerait le recrutement de SPCLIP1 (un homologue aux protéines à sérine [SPH] sans activité catalytique connue) et d'une enzyme catalytique putative formant une convertase. Cette dernière catalyserait l'activation par clivage de TEP1-F circulant en TEP1cut et sa liaison à la surface du pathogène. CLIPA2, un autre SPH, a une fonction contraire et limite le clivage de TEP1-F (Yassine et *al.*, 2014), afin probablement de prévenir l'emballement de la cascade. A noter, la déplétion de LRIM1 par ARN interférence entraîne la disparition des formes circulantes de TEP1cut, SPCLIP1 et CLIPA2, suggérant qu'ils font partie du

même complexe (Povelones et *al.*, 2013). D'autres sérines protéases (CLIPA7, CLIPA14, CLIPB4, CLIPB8, CLIPB14, CLIPB15, CLIPB17) sont impliquées dans l'activation du système du complément chez le moustique, même si leur lien précis avec TEP1 n'a pas encore été caractérisé (Volz et *al.*, 2006 ; Nakhleh et *al.*, 2017).

L'activation du système du complément chez le moustique est régulée par d'autres protéines, notamment par les C-type lectines CTL4/CTLMA2 dont la déplétion par ANR interférence entraîne une mélanisation massive des ookinètes de *P. berghei* de façon TEP1-dépendente chez des moustiques sensibles (Osta et *al.*, 2004 ; Povelones et *al.*, 2011), mais elle n'a pas d'effet sur *P. falciparum* (Cohuet et *al.*, 2006). De même, la déplétion de la lipophorine ApoII/I qui participe au transport des lipides dans l'hémolymphe, entraîne une surexpression de TEP1 (Kamareddine et *al.*, 2016) et une réduction de l'infection des moustiques par *P. berghei* et *P. falciparum* (Mendes et *al.*, 2008 ; Rono et *al.*, 2010).

La liaison de TEP1 à la surface des parasites entraîne leur mort et leur élimination par deux processus : (1) la lyse et (2) la mélanisation qui isole les corps morts des tissus vivants environnants (Blandin et *al.*, 2004). L'activation de la cascade des prophénoloxidases (PPO) par clivage protéolytique sous la médiation des protéases à CLIP, entraîne le dépôt de mélanine sur les surfaces cibles. Chez les moustiques résistants L3-5, la mélanisation est médiée par la liaison de TEP1 sur le parasite et requière la présence de CLIPA8 qui n'est par contre pas nécessaire à la mort du parasite (Volz et *al.*, 2006). SRPN2, un inhibiteur de protéases à sérine, et les C-type lectines CTL4 et CTLMA2 sont des inhibiteurs de la cascade des PPO. Leur déplétion dans des moustiques sensibles entraîne la mort et la mélanisation massive des parasites murins (Michel et *al.*, 2005 ; Osta et *al.*, 2004).

VI-2-Autres effecteurs de la voie humorale :

L'analyse fonctionnelle des gènes de la famille GNBP (*Gram Negative Binding Protein*) chez *An. gambiae* a permis d'identifier 3 protéines majeures (GNBPA2, GNBPB3 et GNBPB4) impliquées dans la réponse antiparasitaire. Seulement, GNBPA2 est identifiée dans la réponse contre *P. falciparum* alors que GNBPB3 et GNBPB4 sont impliquées dans la défense contre *P. berghei* (Dong et *al.*, 2006a). D'autres protéines du système de compléments, notamment les FREPs (FBN8, FBN9 et FBN39) présentent aussi une activité antiparasitaire avec une spécificité vis à vis de l'espèce de parasite ; FBN39 participe à la réponse contre *P. falciparum*, alors que FBN8 et FBN9 assurent la résistance contre *P. falciparum* et *P. berghei* (Dong et *al.*, 2006a). Un autre récepteur AgDscam (*Down syndrome cell adhesion molecule*) pourvu d'un domaine immunoglobuline est associé à la résistance contre *P. berghei* (Dong et *al.*, 2006b) et *P. falciparum* (Smith et *al.*, 2011 ; Dong et *al.*,

2012). L'expression d'AgDscam est sous la régulation des voies de signalisation Toll et Imd (Dong et *al.*, 2012).

VII- Réponse immunitaire à médiation cellulaire :

Les cellules effectrices qui participent à la réponse immunitaire sont les hémocytes qui baignent dans l'hémolymphe et circulent par l'effet des pulsations d'un cœur primitif situé dans la région abdominale (Hillyer and Strand, 2014). Chez les moustiques adultes 75% des hémocytes circulent dans l'hémolymphe alors que 25% sont rattachés aux organes et tissus, ce sont les hémocytes sessiles (King & Hillyer, 2013). Parmi eux, ceux qui sont localisés au niveau de l'estomac sont impliqués dans l'immunité bloquant l'invasion de la face basale de l'épithélium intestinal par l'ookinète mobile (Smith et *al.*, 2014).

Chez les moustiques adultes, 3 populations morphologiquement distinctes d'hémocytes existent (Figure 12) : les granulocytes, les œnocytoïdes et les prohémocytes (Castillo, Robertson, Strand, 2006). Les granulocytes sont les plus abondants, compris entre 80-95% d'hémocytes circulants. Leur cytoplasme contient des quantités variables de granulomes ; ce sont des lysosomes riches en enzymes digestives (Hillyer and Strand, 2014). Les granulocytes circulants mesurent en moyenne 9µm de diamètre. Ils sont spécialisés dans la phagocytose, la digestion intracellulaire des pathogènes et la lyse des parasites. Les œnocytoïdes sont impliqués dans le processus de mélanisation des parasites et autres microorganismes, alors que les prohémocytes peuvent se différencier et former les autres types, participant à la lyse extracellulaire et à la phagocytose.

Le nombre d'hémocytes circulants chez les moustiques adultes varie entre 500 et 4000 (Hillyer and Strand, 2014). Il décroît avec l'âge (Castillo, Robertson, Strand, 2006 ; Hillyer et *al.*, 2005), augmente après le repas de sang (Castillo, Robertson, Strand, 2011 ; Bryant & Michel, 2014), et en réponse à une infection. Cette augmentation est due à la mitose qu'effectuent les hémocytes circulants en réponse à l'invasion d'un pathogène, et non à la libération des hémocytes sessiles (King & Hillyer, 2013). Deux voies de signalisation sont identifiées comme conduisant à la réplication d'hémocytes : *Insulin-like signaling* et *Ras-MAPK signaling* (Castillo, Robertson, Strand, 2011 ; Bryant & Michel, 2014).

La contribution des hémocytes à la réponse antiparasitaire chez le moustique se démontre par la lyse et la mélanisation élaborées respectivement par les prohémocytes et les œnocytoïdes. D'autre part, les granulocytes contribuent à la synthèse et la sécrétion de protéines antiparasitaires en circulation dans l'hémolymphe ; la nitration des parasites lors de la traversée des cellules épithéliales active les granulocytes, qui relâchent des microvésicules au niveau du site d'infection. Ces microvésicules sont chargées de protéines dont les rôles sont associés à la réponse antiparasitaire (TEPs, LRRs, FBNs, Dscam, PGRPs). Les protéines contenues dans les microvésicules sont

déversées sur le site d'infection pour contribuer à la réponse humorale (Castillo et *al.*, 2017). Il a de plus été démontré que l'invasion de l'épithélium intestinal du moustique par les parasites provoque la multiplication des granulocytes qui confère une protection contre l'infection (Rodrigues et *al.*, 2010). En réponse à l'infection à *Plasmodium*, le facteur de transcription LL3 (LITAF-like 3) et la voie JAK/STAT contrôlent la différenciation des prohématocytes en granulocytes et œnocytoïdes, et limitent le développement des oocystes de façon indépendante de TEP1 (Smith et *al.*, 2015 ; Kwon et *al.*, 2017).

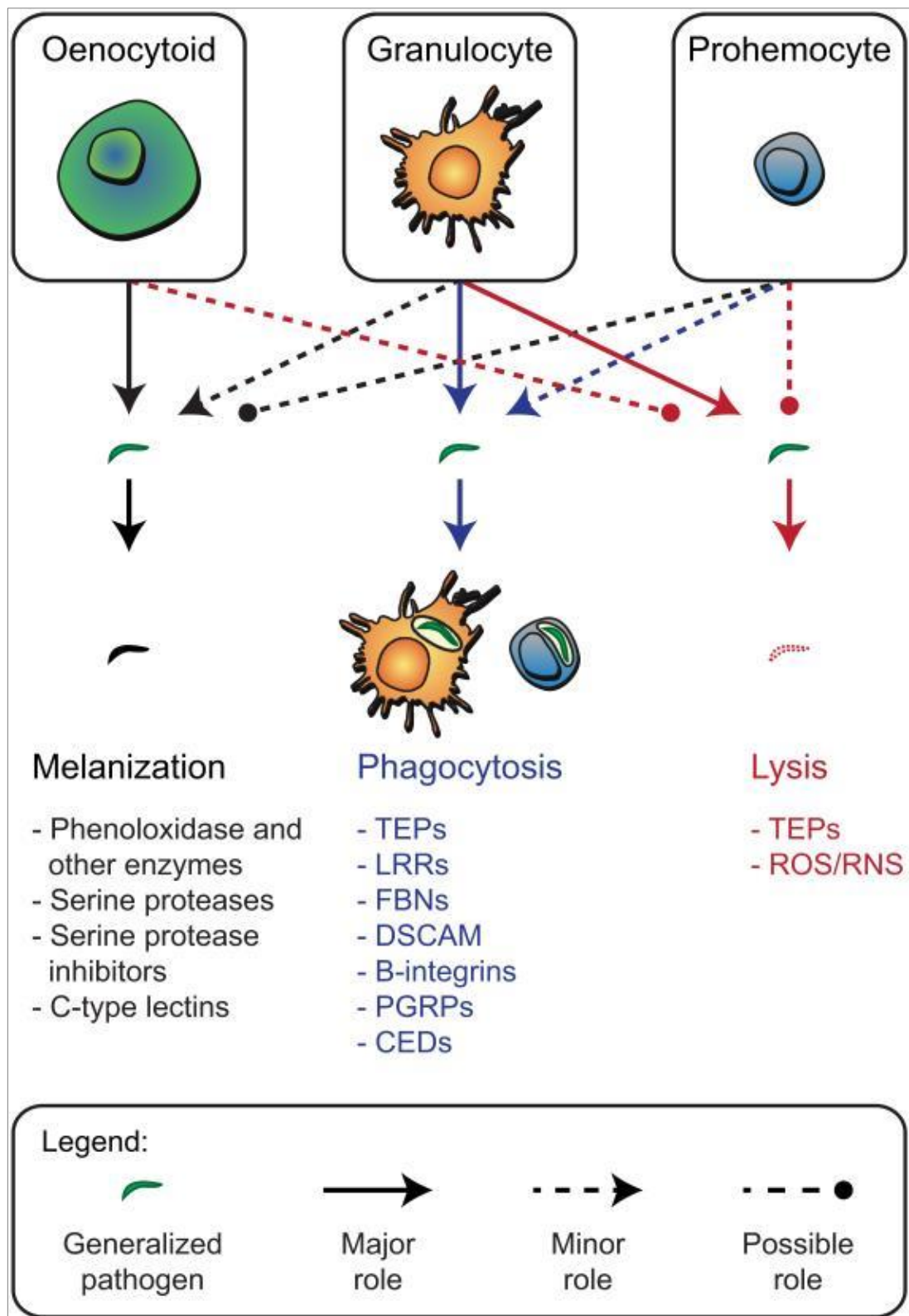


Figure 12 : Structure et fonction des hémocytes chez le moustique.
(Hillyer and Strand, 2014)

VIII- Facteurs génétiques contrôlant la compétence vectorielle chez *An. gambiae* et la virulence chez *P. falciparum* :

L'identification et la cartographie des loci porteurs de gènes impliqués dans l'efficacité de la réponse antiparasitaire chez les moustiques *An. coluzzii* et *An. gambiae* a été réalisée par *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) *mapping* et par des études d'association (Vernick et al., 1989 ; Zheng et al., 1997, 2003 ; Niaré et al., 2002 ; Menge et al., 2006 ; Riehle et al., 2006 ; Blandin et al., 2009, Redmond et al., 2015). Ces analyses ont été réalisées dans des souches de moustiques sélectionnées pour leur résistance et leur capacité à mélaniser les parasites (L3-5) ou leur sensibilité (G3, 4Arr, PEST) aux parasites simien (*P. cynomolgi*) et/ou murin (*P. berghei*), ou en utilisant des lignées de moustiques de terrain infectées avec le parasite humain *P. falciparum*. Elles ont permis de mettre en évidence des loci génomiques associés à deux mécanismes effecteurs distincts qui participent au contrôle du développement et à l'élimination des parasites dans l'intestin du moustique (Figure 13), et dans certains cas, à identifier les gènes sous-jacents dont le polymorphisme détermine le trait analysé.

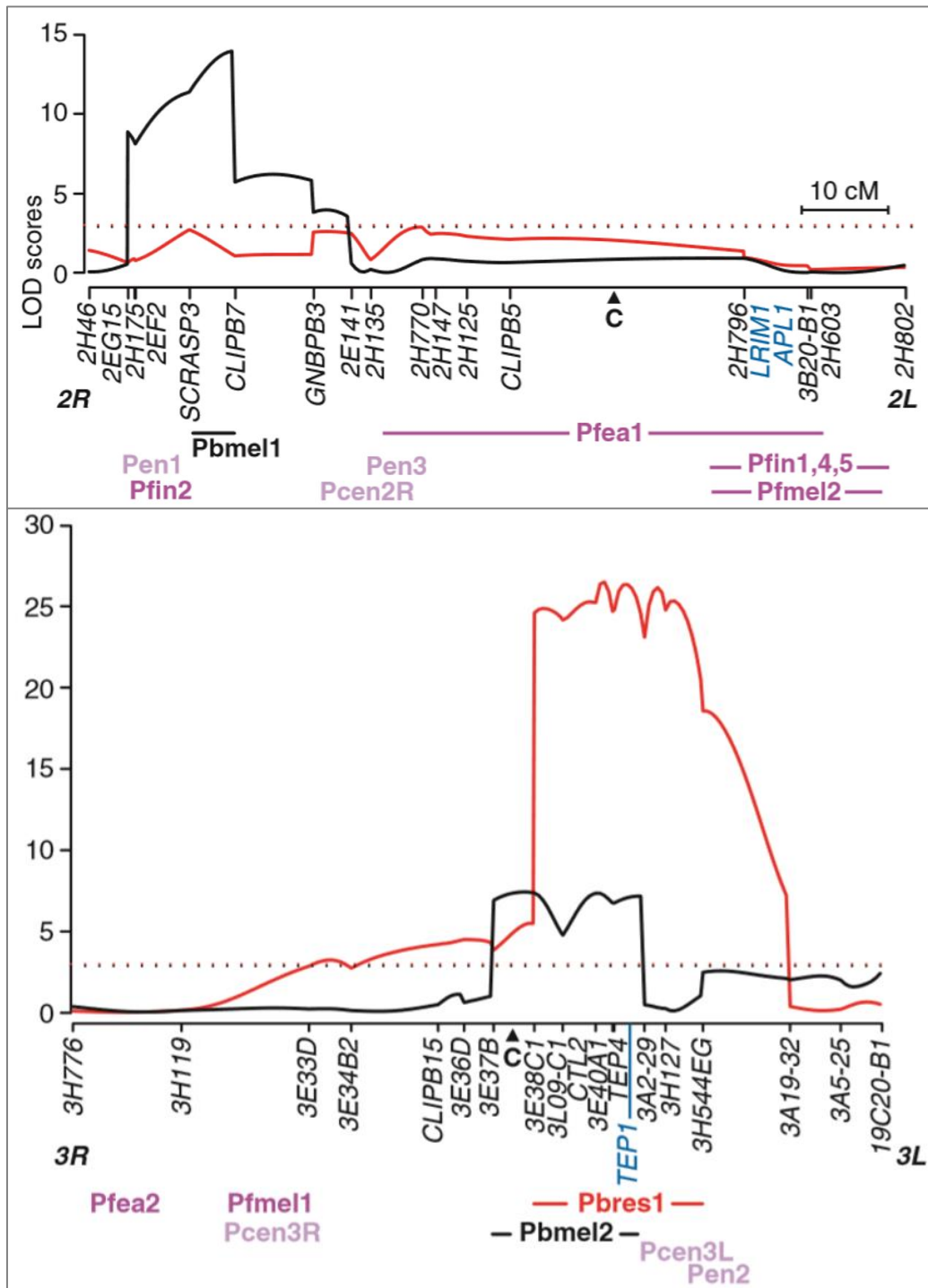


Figure 13 : Loci associés à la résistance des moustiques contre *Plasmodium*. (Blandin et al., 2009)

VIII-1- Encapsulation des parasites par mélanisation :

Pendant longtemps, la mélanisation des parasites était considérée comme le mécanisme responsable de la mort des parasites. Zheng et collaborateurs (1997 et 2003) se sont donc attachés à chercher les loci responsables de la mélanisation des parasites *P. cynomolgi* B et *P. cynomolgi* Ceylon par cartographie de QTL dans un croisement L3-5 x 4Arr. Ils ont identifié les loci Pen (*Plasmodium encapsulation* : Pen1, Pen2 et Pen3) et Pcen (*Plasmodium cynomolgi encapsulation* : Pcen2R, Pcen3L et Pcen3R) associés à la mélanisation, sans pour autant mettre en évidence les gènes afférents (Zheng et al., 1997, 2003). Ces travaux ont toutefois démontré que la mélanisation est un caractère autosomal déterminé par plusieurs gènes indépendants. Ceci a été confirmé par Blandin et collaborateurs qui ont identifié 2 loci Pbmel (*Plasmodium berghei melanisation* : Pbmel1 et Pbmel2) liés à la mélanisation de *P. berghei* dans les mêmes régions génomiques que les principaux loci Pen et Pcen, et qui ont d'autre part démontré que le polymorphisme du gène TEPI, situé dans le locus Pbmel2, était essentiel pour déterminer le mode d'élimination du parasite *P. berghei* (lyse vs mélanisation). *P. falciparum* est rarement éliminé par mélanisation chez *An. gambiae*. Cependant les travaux de Riehle et collaborateurs ont également identifié 2 loci liés à ce trait : Pfmel1 et Pfmel2 (*Plasmodium falciparum melanisation*) (Riehle et al., 2006).

VIII-2- Contrôle de la compétence vectorielle :

VIII-2-1- Résistance au parasite murin *P. berghei* :

Des études ont montré que la mélanisation survenait après la mort du parasite, probablement pour isoler le parasite mort des tissus vivants environnants. En effet, les moustiques L3-5 mélanisent les parasites, alors que chez la souche G3, 80% de parasites sont éliminés sans être mélanisés (Blandin et al., 2004). De même, avec les isolats africains de *P. falciparum* la mélanisation est peu ou pas observée chez L3-5 (Collins et al., 1987 ; Molina-cruz et al., 2012). Aussi, contrairement aux expériences de Zheng et collaborateurs (1997 et 2003) (croisement L3-5 x 4Arr), plutôt que d'utiliser le pourcentage de parasites mélanisés, Blandin et collaborateurs ont utilisé comme traits quantitatifs la capacité de porter des parasites vivants et leurs nombres (prévalences et niveau d'infections) et ont identifié un locus majeur, *Pbres1* (*Plasmodium berghei resistance* 1) sur le chromosome 3L, déterminant la résistance des moustiques au parasite murin *P. berghei* (Blandin et al., 2009). Au sein de ce locus, ils ont de plus montré que le polymorphisme du gène antiparasitaire *TEPI* contribue à déterminer la compétence vectorielle des moustiques. En effet, les lignées résistante (L3-5) et sensibles (4Arr et G3) portent des allèles différents de ce gène et l'inactivation spécifique de l'un ou l'autre des allèles dans la progéniture du croisement L3-5 x G3 a permis de montrer que l'allèle de la lignée sensible est moins efficace à tuer les parasites que celui de la lignée résistante. *TEPI* code pour

un ARNm de 4,2 kb. C'est un gène particulièrement polymorphique, notamment sur sa moitié 3', permettant de séparer les allèles de *TEP1* en 2 groupes majeurs, *TEP1***R*, dont l'archétype est l'allèle présent dans la lignée L3-5, et *TEP1***S*, dont l'archétype est l'allèle séquencé dans la lignée PEST (Blandin et al., 2009). De façon intéressante, des chimères entre ces 2 groupes d'allèles existent et ont conduit à les séparer plus finement en sous-groupes (figure 14), avec les allèles types *TEP1***R1* et *TEP1***S1*, et les chimères *TEP1***R2* et *TEP1***S2*. Ces différents types d'allèles ne sont pas des artefacts des lignées de laboratoires et ont été séquencés dans les moustiques de terrain. Notons également que de nombreux autres polymorphismes (SNPs) ont été identifiés pour ce gène (Boissière, Levashina et Morlais, données non publiées).

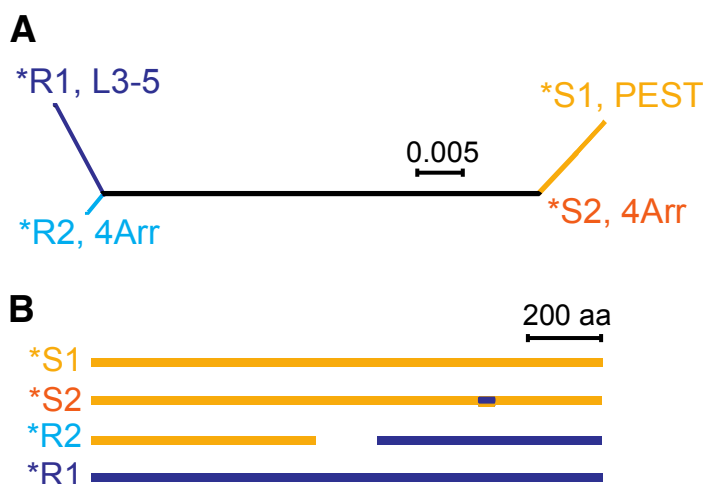


Figure 14 : Les allèles de *TEP1* forment deux groupes majeurs, *TEP1***R* et *TEP1***S*.

A : Arbre phylogénétique des allèles de trois lignées de moustiques (L3-5, 4aRR et PEST).

B : Illustration schématique des différents groupes et sous-groupes d'allèles.

Les allèles *TEP1***S2* et *TEP1***R2* sont des chimères des allèles types *TEP1***S1* (orange) et *TEP1***R1* (bleu).

(Blandin et al., 2009)

Les différences majeures entre les allèles *TEP1***R* et *TEP1***S* sont localisées dans le *TED domain* où se trouve la liaison intramoléculaire thioester (Baxter et al., 2007). Le *TED domain* protège le groupement thioester de l'hydrolyse, qui entraîne un changement conformationnel de la protéine. L'activation de *TEP1***S* donne à la protéine une conformation qui rend la liaison thioester plus susceptible à l'hydrolyse que chez *TEP1***R* (Le et al., 2012). Ceci pourrait expliquer la capacité qu'a la protéine *TEP1***R* à se fixer plus rapidement et plus efficacement sur le parasite pour l'éliminer (Blandin et al., 2004 ; Blandin et al., 2009).

VIII-2-2- Résistance au parasite humain *P. falciparum* :

De même, lors des infections *An. gambiae/P. falciparum*, White et collègues ont montré une corrélation entre le génotype de *TEP1* et la charge parasitaire des moustiques, après un croisement entre une lignée *TEP1rB* (type *TEP1*R1*) et une lignée *TEP1s* (type *TEP1*S1*) ; les moustiques homozygotes pour *TEP1s* portaient plus de parasites que les moustiques *TEP1s/rB*, suggérant que *TEP1*, contrôle l'efficacité de la réponse contre *P. falciparum*.

Les autres loci liés à la compétence vectorielle des moustiques *A. gambiae/A. coluzzii* par rapport au parasite *P. falciparum* ont été identifiés par des études d'association au sein de familles de moustiques isofemelles ou récemment colonisées au laboratoire. Le laboratoire de K. Vernick a identifié plusieurs loci *Pfin* (*Plasmodium falciparum infection intensity*) et *Pfea* (*Plasmodium falciparum East Africa*) dans une même région du chromosome 2L qu'ils ont nommée *PRI* (*Plasmodium resistance island*) (Niaré et al., 2002 ; Riehle et al., 2006). Leurs résultats suggèrent que le polymorphisme du gène *APL1A*, en codant une protéine à domaines riches en leucine, contribue à expliquer la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis de *P. falciparum* (Riehle et al., 2008 ; Holm et al., 2012). A noter, le locus *PRI* comprend aussi d'autres gènes candidats tels que *AgADA* (*An. gambiae adenosine deaminase*), *FREP1* (*Fibrinogen-related protein1*) et *FBN30* (*Fibrinogen-related protein 30*), dont l'activité antiparasitaire contre *P. falciparum* a été rapportée dans les travaux de Li et al., 2013 mais dont le polymorphisme n'a pas été étudié ou corrélé avec l'intensité des infections chez les moustiques. Enfin une autre étude d'association utilisant des lignées de moustiques récemment isolées au Burkina-Faso et au Mali, et mettant en œuvre le séquençage à haut débit de pools de moustiques résistants ou sensibles à *P. falciparum*, a identifié le gène *Toll 11* comme potentiel facteur de résistance. Cependant, les différences phénotypiques entre les moustiques porteurs des différents allèles sont faibles (Redmond et al., 2015).

En fonction de l'espèce ou de la souche de parasite et/ou de moustiques, différents loci sont cartographiés sur la figure 13 (Blandin et al., 2009). Ils se chevauchent à plusieurs endroits, notamment sur le chromosome 3L où sont regroupés les loci *Pbres1*, *Pen2*, *Pcen3L* et *Pbmel2*. Ce qui suggère que : (1) certains mécanismes effecteurs qui participent à la résistance des moustiques au *Plasmodium* sont conservés indépendamment de l'espèce de parasite, et (2) certains gènes participent à la fois à la mélanisation et la lyse des parasites. Le gène *TEP1* par exemple, retrouvé au niveau des loci *Pbres1* et *Pbmel1*, est un facteur antiparasitaire majeur qui participe à la lyse et la mélanisation des *P. berghei* (Blandin et al., 2004, 2009). Contre *P. falciparum*, l'activité de *TEP1* chez les moustiques L3-5 est marquée par la lyse des parasites. Cependant certains isolats de *P. falciparum* sont virulents dans les L3-5, et cette virulence est en partie, mais pas seulement, expliquée par le

polymorphisme du gène Pfs47 exprimé à la surface du parasite (Molina-cruz et *al.*, 2013 ; Garver et *al.*, 2013 ; Ramphul et *al.*, 2014 ; Molina-cruz et *al.*, 2015 ; Eldering et *al.*, 2016).

VIII-3- Pfs47, un facteur clé de la virulence chez *P. falciparum* :

En effet, le laboratoire de C. Barillas-Mury, a cartographié dans le génome de *P. falciparum* les loci de virulence du parasite à partir d'un croisement entre une souche de parasite virulent GB4 (d'origine africaine) et une souche avirulente 7G8 (d'Amérique du Sud) dans les moustiques L3-5. Ils ont montré que la protéine Pfs47 est impliquée dans l'évasion du parasite au cours de la réponse immunitaire chez le moustique (Molina-cruz et *al.*, 2013). En effet, les parasites Pfs47-KO perdent une grande partie de leur capacité à infecter les moustiques, et le même phénotype est observé chez *P. berghei* quand le gène Pbs47, homologue de Pfs47, est invalidé (Van Dijk et *al.*, 2010 ; Ukegbu et *al.*, 2017). De plus, les 2 souches de parasites GB4 et 7G8 portent un allèle différent de Pfs47 et l'expression de l'un ou l'autre des allèles dans la souche Pfs47-KO a permis de démontrer que le polymorphisme de ce gène détermine la virulence du parasite vis-à-vis des moustiques L3-5. Seuls 4 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) séparent les 2 allèles, mais ils sont tous non-synonymes. Plus intéressant, le remplacement d'un allèle de Pfs47 par un autre typique des isolats d'Afrique, d'Asie ou d'Amérique, rend ces parasites virulents dans les espèces de moustiques qui se trouvent dans ces régions (Molina-Cruz et *al.*, 2015). Les auteurs ont donc proposé un modèle clé-serrure (*lock-and-key theory*), dans lequel l'allèle de Pfs47 constitue la clé qui permet l'entrée du parasite chez le moustique (serrure). Mais d'autres études montrent que le polymorphisme du Pfs47 n'est pas le seul médiateur de l'évasion de certains clones de parasites virulents (Eldering et *al.*, 2016).

Pfs47 est une protéine exprimée à la surface des gamétocytes de *P. falciparum* ; elle est conservée chez tous les stades sexués jusqu'aux ookinètes (Khan et *al.*, 2005 ; Van Schaijk et *al.*, 2006 ; Molina-cruz et *al.*, 2013), mais ne semble pas essentielle pour la fécondation (Van Schaijk et *al.*, 2006), bien que l'invalidation de Pbs47 (homologue de Pfs47) chez *P. berghei* affecte significativement la fécondation du parasite (Van Dijk et *al.*, 2010 ; Ukegbu et *al.*, 2017). Sur le plan génétique, *Pfs47* est localisée au niveau du chromosome 13, à proximité de *Pfs48/45* avec qui il partage une homologie d'organisation et de séquence ; les deux gènes sont dépourvus d'introns et porteurs chacun de trois domaines 6-Cystéine avec 26% d'acides aminés identiques au niveau des protéines (Templeton and Kaslow, 1999). Pfs47 affecte l'activation de la voie JNK entraînant une réduction de l'expression des enzymes HPX2 et NOX5 à l'origine de la nitration des ookinètes lors de la traversée de l'épithélium intestinal (Ramphul et *al.*, 2014). L'interruption de la nitration des ookinètes au niveau de l'épithélium intestinal, lors de l'évasion, empêche l'activation des hémocytes et la liaison des protéines du système de complément, telles que TEP1, qui participent à la lyse et la mélanisation du parasite (Castillo et *al.*, 2017). En présence de Pfs47 (de l'allèle virulent), le parasite

ne serait pas détecté par le système du complément (Garver et *al.*, 2013 ; Ramphul et *al.*, 2014 ; Molina-cruz et *al.*, 2015).

Notons enfin que les expériences d'infection réalisées sur le terrain avec des isolats naturels de *P. falciparum* montrent que l'infectivité des parasites ingérés et la capacité qu'a le système immunitaire du moustique à éliminer le parasite sont dépendantes de plusieurs autres facteurs dont : le nombre de gamétocytes (Da et *al.*, 2015 ; Morlais et *al.*, 2015), la MOI (Nsango et *al.*, 2012 ; Morlais et *al.*, 2015). Par exemple, TEP1 n'a d'effet sur les parasites seulement lorsque la densité des gamétocytes est élevée et la complexité génétique de l'isolat de parasites minimales (MOI=1) (Nsango et *al.*, 2012 ; Da et *al.*, 2015 ; Morlais et *al.*, 2015).

Partie III : Objectifs de la thèse

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à identifier les facteurs qui déterminent la compétence vectorielle des moustiques et la virulence des parasites dans un contexte naturel de transmission. Des expériences ont été réalisées en alternance entre le Cameroun et la France. A l'IBMC à Strasbourg, des lignées de moustiques ont été sélectionnées sur la base du génotype de gènes pro/antiparasitaires et des phénotypes résistant/sensible obtenus après infection avec le parasite murin *P. berghei* (L3-5/G3L, S1low/S1high). Les lignées ont ensuite été infectées à partir du sang veineux prélevé sur des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* à l'OCEAC à Yaoundé. Les phénotypes ont été comparés à ceux obtenus avec deux souches locales Ngouso (NG) et Ndokayo (Nd), respectivement *An. coluzzii* et *An. gambiae*, maintenues en insectarium depuis quelques années, ainsi que pour des moustiques sauvages de terrain, collectés dans différents gîtes larvaires de la ville de Yaoundé.

Au préalable nous avons comparé les parasitemies sexuées et asexuées dans le sang veineux et le sang capillaire des porteurs de gamétocytes, afin de rechercher leur effet sur la transmission du paludisme chez le moustique suivant la méthode DMFA (*Direct Membrane Feeding Assay*).

Les objectifs de ce projet de thèse s'articulent ainsi autour de plusieurs questions :

- Le sang veineux utilisé pour les infections avec *P. falciparum* sur le terrain a-t-il des propriétés similaires au sang capillaire en termes de parasitémie et de gamétocythémie ? En effet, les moustiques prennent naturellement leur repas sanguin au niveau des capillaires de la peau tandis que les infections expérimentales au laboratoire sont faites à partir de sang prélevé sur une veine du bras.
- Est-il possible d'isoler des lignées de moustiques invariantes pour *TEPI* et qui aient des phénotypes opposés lors d'une infection ? Dans ce but, nous avons effectué des sélections phénotypiques successives sur une lignée de moustiques Ngouso portant l'allèle « sensible » *TEPI*SI*.
- Les facteurs génétiques qui contrôlent la compétence vectorielle des moustiques sont-ils les mêmes pour les différentes espèces de parasites ? Pour ce faire, nous avons comparé le phénotype des lignées de moustiques sélectionnées avec *P. berghei* à l'IBMC (Ngouso vs L3-5 ; S1 high vs S1 low) avec des isolats naturels de *P. falciparum*.
- Quels sont les facteurs génétiques qui contrôlent la résistance des moustiques à *P. falciparum* ? Pour ce faire nous avons réalisé des études d'association à partir des moustiques sauvages collectés dans différents gîtes larvaires et les lignées de laboratoire utilisées pour les infections expérimentales, afin d'analyser la corrélation entre les génotypes des moustiques et le niveau d'infection.
- Quels sont les facteurs de virulence associés à *P. falciparum* ? Nous avons comparé les génotypes des parasites développés dans les lignées résistantes de moustiques à ceux des parasites

avirulents ; nous avons également évalué la corrélation entre les génotypes des isolats naturels pour certains gènes de virulence identifiés et les niveaux d'infection.

La suite de ce mémoire de thèse est structurée en 3 parties :

- 1) La première partie détaille la méthodologie utilisée dans le travail de thèse.
- 2) La deuxième partie présente les résultats observés en fonction des objectifs ci-dessus.
- 3) La troisième partie présente la discussion générale et la conclusion.

Matériel et méthodes

I- Sites d'étude :

Notre étude a été menée dans deux sites à savoir : Mfou pour le dépistage des porteurs de gamétocytes utilisés pour les infections expérimentales, Yaoundé pour les collectes de moustiques de terrain utilisés pour le géotypage de *TEPI*, et l'étude de la compétence vectorielle.

I-1- Mfou :

Mfou (Figure 15), chef-lieu du département de la Mefou et Afamba dans la région du Centre Cameroun, est un arrondissement situé à environ 25 km de Yaoundé la capitale. Sur le plan géographique il est situé dans les domaines de coordonnées 11°35' et 11°40' de longitude Est, 3°40' et 3°45' de latitude Nord avec une superficie d'environ 3338 km² et une population estimée à 35209 habitants (hbts) en 2005 (Recensement-Cameroun, 2005). Le climat est de type équatorial guinéen avec 4 saisons (2 saisons sèches et 2 de pluies), caractérisées par une pluviométrie abondante (plus de 1500 mm³/an), des températures mensuelles variant entre 19° et 29°C et une hygrométrie annuelle comprise entre 66 et 80% (Ngantchou, 2006). En saison pluvieuse, l'intensité de la transmission est plus élevée qu'en saison sèche (Van der kolk et *al.*, 2003). Cette transmission est entretenue par la présence de différentes espèces de vecteurs (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. funestus*) (Morlais et Nsango, communication personnelle). L'hydrographie est dominée par la présence du fleuve Mefou et ses affluents. Mais on y retrouve aussi plusieurs autres milieux aquatiques liés ou non aux activités anthropiques où se développent les gîtes larvaires de moustiques vecteurs du paludisme (lacs, étangs, marécages, eaux de latrines, mares d'eau quasiment permanentes dans les zones de fortes activités agro-pastorales).

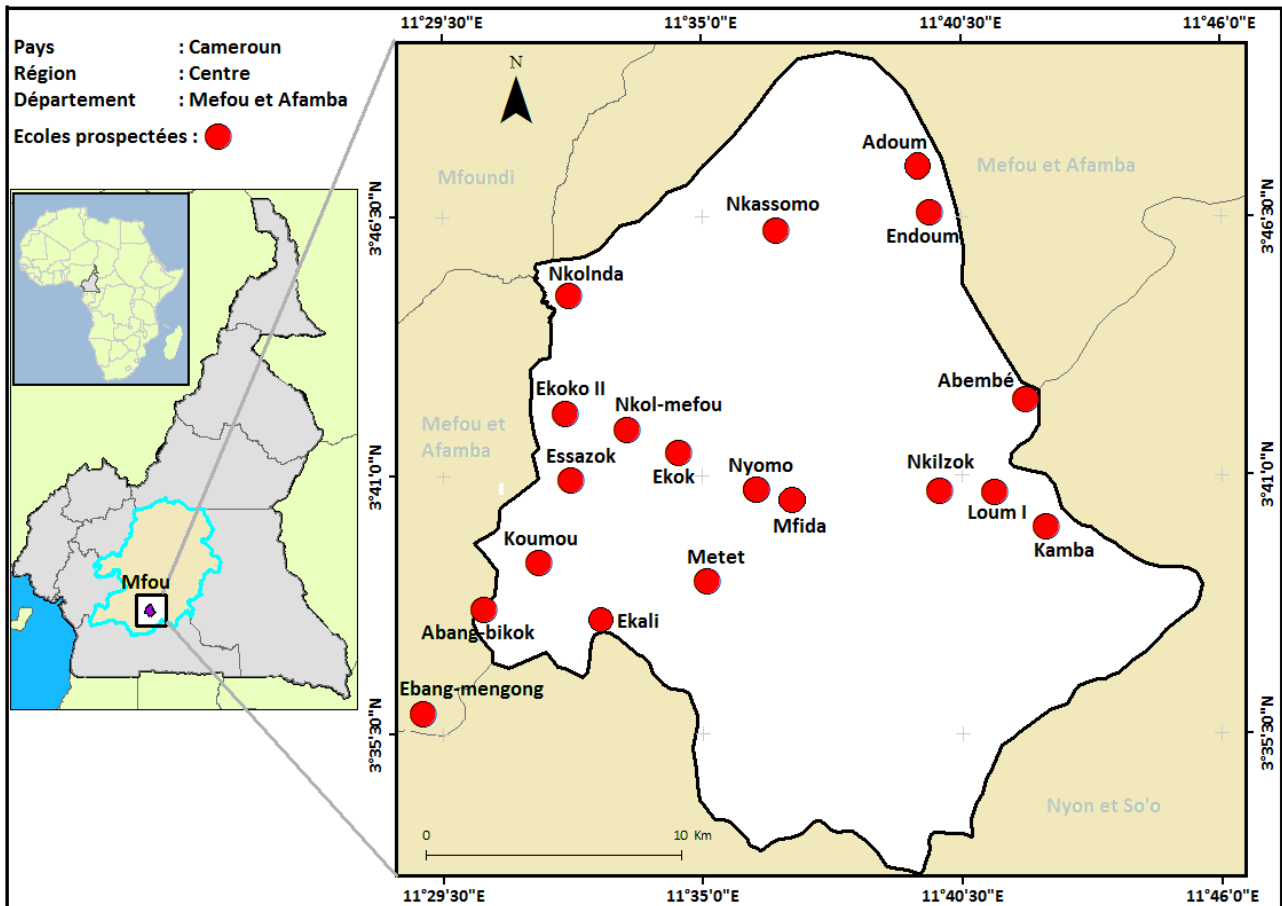


Figure 15 : Carte de l'arrondissement de Mfou et localisation des écoles prospectées pour les enquêtes parasitologiques.

I-2-Yaoundé :

Yaoundé (3°5' N, 11°31' E) (Figure 16) est le chef-lieu de la Région du Centre, situé à environ 300 Km de la côte atlantique. La ville est sur un réseau de collines dominées par les monts Mbam Minkom (1 295 m) et Nkolodom (1 221 m) au nord-ouest, et le mont Elounden (1 159 m) au sud-ouest. C'est la deuxième ville la plus peuplée du Cameroun après Douala, avec une population estimée à 2 440 462 hbts en 2011, soit 13 558 hbts/km². Elle est constituée d'une centaine de quartiers encore en expansion, regroupés en 7 arrondissements. Les activités humaines sont principalement d'ordres administratif (ministères, délégations, communes d'arrondissement), économique (industries et commerce), agro-pastorale (agriculture et élevage), sanitaire et académique (hôpital, écoles et universités). Elle est traversée par des cours d'eau à courant plus ou moins rapide représentés, principalement par le fleuve Mfoundi et ses affluents, et présente des retenues d'eau qui favorisent l'expansion des gîtes larvaires et le développement des anophèles (lacs et étangs de pisciculture, marécages, mares d'eau quasiment permanentes dans les zones de fortes activités agro-

pastorales). Le climat qui y règne est semblable à celui de Mfou, ainsi que le faciès épidémiologique de transmission du paludisme.

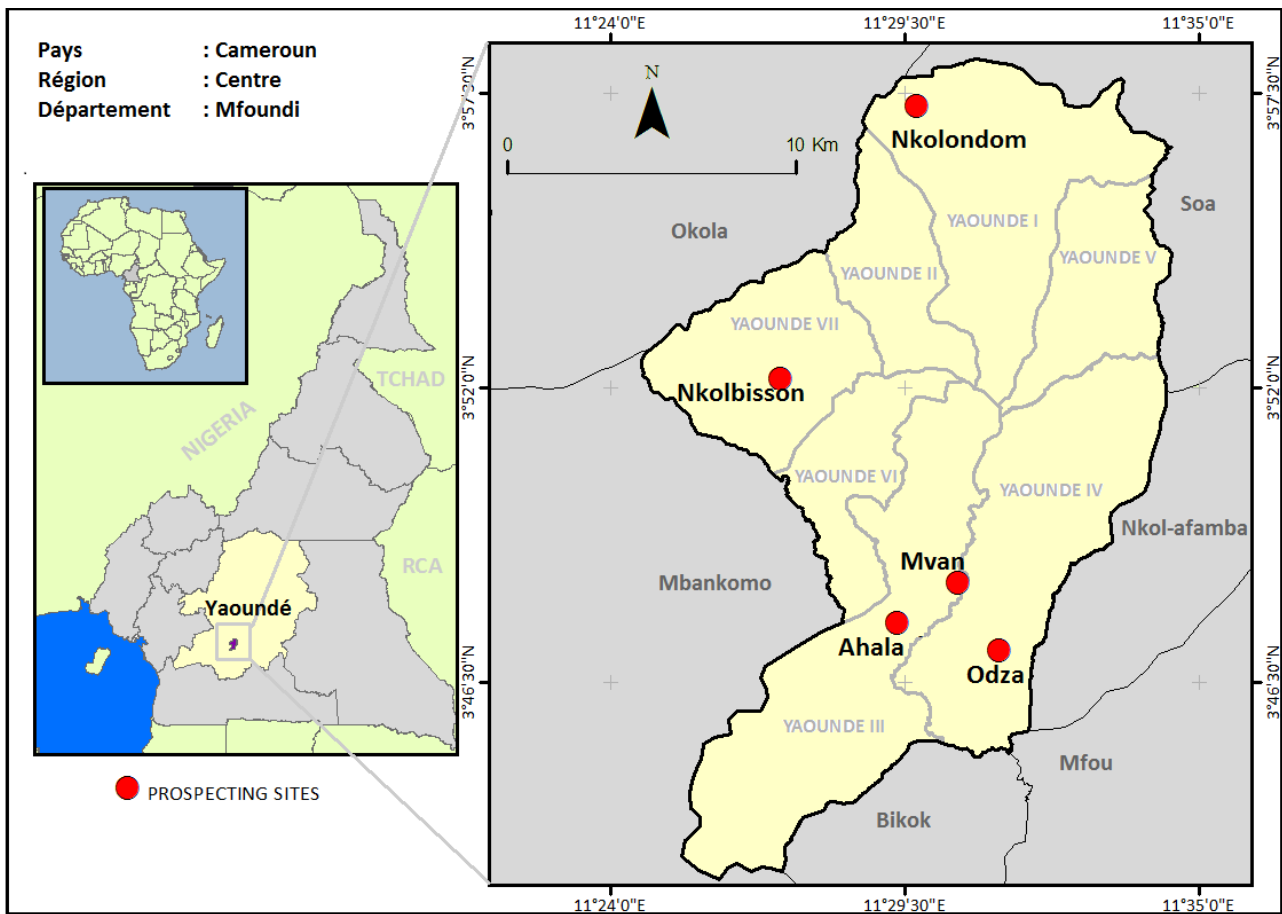


Figure 16 : Carte de la ville de Yaoundé et localisation des différents quartiers prospectés pour les collectes larvaires.

II- Procédures éthiques et population d'étude :

L'enquête parasitologique a nécessité au préalable l'accord du Comité national d'éthique de la recherche pour la santé humaine (N°: 2013/11/365/L/CNERSH/SP) (Annexe 1). Les autorisations administratives ont été obtenues auprès du médecin-chef de l'hôpital de district de Mfou. Les procédures ont d'autre part été validées par le Comité d'évaluation éthique de l'Inserm (Comité de qualification de l'Inserm - IRB00003888, FWA00005831, opinion numéro 01-041).

Notre population cible est constituée d'enfants inscrits entre la SIL et le CM2 dans les écoles primaires des localités prospectées de l'Arrondissement de Mfou (Figure 15) : Ekali, Koumou, Nkolinda, Nkilzok, Essazok, Nkol-mefou, Kamba, Ebang-mengong, Abang-bikok, Adoum, Endoum, Nkassomo, Ekok, Ekoko II, Nyomo, Mfida, Abembé, Metet, Loum I. Elle regroupe ainsi les enfants âgés de 5 à 14 ans, représentant la tranche d'âge la plus exposée au risque d'infection palustre (Rogier,

2003 ; Van der kolk et *al.*, 2003). Seuls les enfants pour lesquels nous avons reçu l'accord du parent ou du tuteur légal (Annexe 2) ont été inclus dans l'étude. L'anonymat des participants a été respecté en codifiant les échantillons de sang. Et ceux-ci ont été strictement utilisés pour répondre aux objectifs définis dans le cadre de ce projet de thèse. Avant le début de l'enquête, une note de sensibilisation a été transmise aux parents d'élèves et aux directeurs d'écoles, afin de leur expliquer les objectifs et le protocole relatif à l'étude. Les enquêtes parasitologiques ont été effectuées en collaboration avec l'hôpital de district de Mfou. En effet, un infirmier et un technicien de laboratoire de cette structure sanitaire ont participé à la confection des gouttes épaisses et le médecin-chef a assuré le traitement et le suivi thérapeutique des patients. Le consentement des parents a été obtenu avant l'inclusion des enfants pour les infections à Yaoundé.

A l'IBMC, les moustiques sont maintenus et infectés sur des souris anesthésiées. Les locaux, les protocoles utilisés pour ces expérimentations et le personnel les conduisant ont reçu les autorisations nécessaires :

- Locaux : Autorisations F67-482-2 et G67-482-2 délivrées par la préfecture pour l'animalerie centrale de l'IBMC.
- Procédures et nombre d'animaux : Autorisation N° 00555.01 du ministère de l'éducation supérieure et de la recherche.
- Personnel : Autorisations individuelles délivrées à chaque personne qui supervise ou met en œuvre les procédures nécessaires.

III- Elevage de moustiques à l'OCEAC (Yaoundé) et à l'IBMC (Strasbourg) :

Les souches de laboratoire utilisées, L3-5, G3, Ngouso (NG), S1high et S1low et Ndokayo (ND) sont adaptées à vivre à l'insectarium. Les souches locales, Ngouso et Ndokayo, (respectivement *An. coluzzii* et *An. gambiae*) sont maintenues au laboratoire depuis plusieurs années (respectivement 2006 et 2010). Leur nom est fonction de leur localité d'origine : « Ngouso » un quartier de la ville de Yaoundé et « Ndokayo » une petite localité entre les régions de l'Est et Adamoua au Cameroun. Des lignées isofemelles S1high et S1low ont été sélectionnées par leur phénotype à partir de la souche NG (voir paragraphe ci-dessous). Les phénotypes et génotypes des lignées utilisées sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Caractères génétiques et phénotypiques des lignées de moustiques utilisées pour les infections expérimentales.

	L3-5	G3	S1low	S1high	Ngouso	Ndokayo
Phénotypes avec <i>P. berghei</i>	Résistant Mélanisation/Lyse	Sensible Lyse	Résistant Lyse	Sensible Lyse	Sensible Lyse	Non encore testé
Allèles <i>TEP1</i>	<i>TEP1*R1</i>	<i>TEP1*S1</i>	<i>TEP1*S1</i>	<i>TEP1*S1</i>	<i>TEP1*S2</i> <i>TEP1*S1</i>	<i>TEP1*S2</i> <i>TEP1*S1</i> <i>TEP1*R2</i>
Espèces	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>
Lignées parentales	G3	G3	Ngouso	Ngouso	Ngouso	Ndokayo
Origine	Gambie	Gambie	Cameroun	Cameroun	Cameroun	Cameroun

Leur élevage à l'OCEAC est fait au quotidien dans des cages (pour les adultes) et des bacs en plastique (pour les larves), à l'aide d'une eau minérale sortie de roche dans une source aménagée au quartier Simbock à Yaoundé. La température d'élevage est assurée par un radiateur connecté à un thermostat qui permet de maintenir la salle à 28°C, avec une humidité relative de 70-80%. L'éclairage électrique est apporté par une lampe HPS (*High pressure sodium*) connectées à un programmateur (*Legrand Omnirex - Encoches 15Min-16A*) qui permet de simuler les cycles diurnes (12 heures du jour) et nocturnes (12 heures de nuit). Les larves sont nourries au quotidien à l'aide de *TetraMin* qui est une poudre alimentaire composée de protéines (46%), matières grasses (11%), cellulose (2%), vitamine et sels minéraux. Les adultes quant à eux sont nourris de jus sucré (saccharose 5%).

Leur élevage à Strasbourg se fait dans des conditions de température (28°C), d'humidité (80%) et d'éclairage (cycle jour/nuit de 12h/12h) similaires. L'eau utilisée pour l'élevage des larves est déminéralisée et supplémentée de nourriture à poisson *TetraMin*. Les adultes sont maintenus dans des cages avec moustiquaires et nourris avec de l'eau sucrée (10% saccharose). Un repas sanguin est proposé aux moustiques pour permettre la ponte des œufs et le maintien des lignées. Pour ce faire, les souris sont anesthésiées avec un mélange de solution de Xylazine (5mg/mL) et Kétamine (10mg/mL) dans du PBS à raison de 10 µL/g de poids corporel. Une fois la souris endormie, elle est déposée sur la cage de moustiques pendant ~30 min. Un pondeur est placé dans la cage 2 ou 3 jours après le repas sanguin et les larves écloses sont placées dans les bacs d'élevage 2 jours plus tard.

IV- Sélection de lignées de moustiques résistantes et sensibles à *P. berghei* (S1low et S1high) à partir de la lignée Ngouso :

Les lignées S1high et S1low ont été sélectionnées à Strasbourg pour leur sensibilité/résistance au parasite murin *P. berghei* à partir de la souche parentale NG-S1, elle-même précédemment

sélectionnée à Strasbourg pour être homozygote pour l'allèle *TEPI*SI*. Afin de sélectionner les lignées S1high et S1low, les femelles de la souche NG-S1 ont été infectées avec *P. berghei*, les femelles isolées pour pondre leurs œufs et les progénitures des moustiques les plus infectés (S1high) ou les plus résistants (S1low) ont été conservées. Lors des deux premières sélections, les progénitures de 3-4 femelles ont été mélangées pour produire chaque lignée. Pour toutes les sélections suivantes, les progénitures de chaque femelle ont été gardées isolées et leur phénotype comparé pour sélectionner la lignée la plus sensible (S1high) et la plus résistante (S1low). Le nom de la lignée (iso1, iso2, iso3...) indique le nombre de sélections opérées (1, 2, 3...). Au Cameroun, nous avons infecté des moustiques des sélections iso3, iso5 et iso6.

V- Collecte et élevage de moustiques :

Les larves de moustiques sauvages ont été collectées dans différents quartiers des villes de Yaoundé (Odza, Mvan, Nkolondom et Nkolbisson) (Figure 16). Les adultes émergents ont été utilisés pour : 1) étudier la répartition géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*, et l'identification des zones d'allopatric et de sympatric, 2) obtenir des anophèles femelles adultes pour les infections expérimentales au laboratoire.

Les larves de stades 3 et 4 (L3 et L4) et les nymphes ont été prélevées à la surface de l'eau dans les différents gîtes larvaires à l'aide de louches creuses et de petites cuvettes. Ces dernières ont été transférées dans les bouteilles en plastique contenant l'eau du gîte et dûment étiquetées avant d'être acheminées et maintenues au laboratoire dans les conditions standard de température (28°C) et d'humidité relative (70-80%). Les coordonnées géographiques (latitude et longitude) des différents points de collecte ont été relevés à l'aide d'un GPS (*GARMIN : GPS_{map} 62_{st}*), pour la localisation des sites de collecte et la confection des cartes. Au laboratoire (insectarium-OCEAC), les larves et nymphes ont été triées séparément à l'aide d'une pipette compte-goutte. Les larves ont été conservées dans des bacs en plastique contenant l'eau du gîte et étiquetés (date et lieu de collecte, nom de la localité et numéro du gîte larvaire) puis recouverts de tulle moustiquaire. Les nymphes quant à elles ont été transférées dans des boîtes de 50 mL contenant 30 à 40 mL d'eau du gîte, et placées dans des cages de 30 cm d'arêtes, recouvertes de tulle moustiquaire et contenant du jus sucré (Solution de saccharose 5%) pour l'émergence des adultes. Chaque matin, les nymphes néoformées dans les bacs de larves sont triées et traitées dans les mêmes conditions que précédemment.

VI- Infections expérimentales :

VI-1- Diagnostic et sélection des porteurs humains de gamétoocytes de *P. falciparum*:

La technique de goutte épaisse (GE) est utilisée pour le diagnostic microscopique de l'infection palustre. Pour cela, une goutte de sang capillaire (5 à 10µL) a été prélevée au bout du doigt de chaque patient à l'aide d'un vaccinostyle. Le sang prélevé est étalé à l'aide de mouvements concentriques sur une lame porte-objet et séché à température ambiante avant d'être colorée au Giemsa 10%. La préparation du Giemsa 10% se fait avec le tampon $\text{HPO}_4^{2-}/\text{HPO}_4^-$. La lecture semi-quantitative (Chouvalova, 1984) au microscope optique (x1000) nous a permis de poser un diagnostic immédiat afin d'assurer une prise en charge rapide des individus positifs, et les résultats ont été reportés comme suit :

- 0 : Absence de trophozoïtes/traversée (0 trophozoïtes /µL de sang)
- + : 1 – 10 trophozoïtes/traversée (1 – 50 trophozoïtes /µL de sang)
- ++ : 10 – 20 trophozoïtes/traversée (51 – 500 trophozoïtes /µL de sang)
- +++ : 1 – 20 trophozoïtes/champ (501 – 5000 trophozoïtes /µL de sang)
- ++++ : 11 – 100 trophozoïtes/champ (5001 – 50 000 trophozoïtes /µL de sang)
- +++++ : > 100 trophozoïtes/champ (> 50 000 trophozoïtes /µL de sang).

Tous les individus porteurs de trophozoïtes ont été pris en charge par un personnel qualifié de l'hôpital de district de Mfou. Ils ont reçu un traitement antimalarique de 3 jours (Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine : Dihydroartémisinine-Piperaquine_phosphate) et du Paracétamol.

La lecture quantitative a été effectuée sur 1000 globules blancs (GB), pour la détermination des charges parasitaires (trophozoïtes et gamétoocytes). En admettant que la leucocytémie moyenne chez un individu est de 8000/µL de sang, nous avons pu estimer la densité parasitaire par µL de sang d'après la formule ci-dessous:

$$\text{Densité parasitaire (par } \mu\text{L)} = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000}{1000 \text{ GB}}$$

Seuls les enfants infectés uniquement à *P. falciparum* et ne présentant pas de signe clinique (Fièvre : $T > 40^\circ\text{C}$; Anémie : Hémoglobine $< 8 \text{ g/dL}$) avec une charge gamétoocytaire $> 30 \text{ Gpf}/\mu\text{L}$ de sang ont été enrôlés pour les infections expérimentales après la signature du consentement éclairé par un parent ou le tuteur légal.

VI-2- Infections expérimentales de moustiques avec *P. falciparum* :

Le dispositif d'infections est constitué de cellules de gorgement en verre de silice montées en série sur une barre qui sert de support. Chaque cellule comprend un circuit périphérique au travers duquel circule l'eau qui enrobe le circuit central dans lequel se fait le transfert de sang. Le système est maintenu à 37°C grâce à un bain marie. La surface basale de chaque cellule est recouverte d'une membrane de parafilm au travers de laquelle les moustiques se gorgent (Rutledge et *al.*, 1964). Le dispositif est mis en marche 1h avant le début du gorgement.

Le sang veineux est prélevé dans un tube hépariné de 5 mL (Figure 17), puis centrifugé à 2000 tr/min pendant 5 min. Le plasma du patient est remplacé par une quantité équivalente de plasma AB non immun. Cette précaution permet de limiter l'effet des facteurs immuns pouvant bloquer le développement du parasite chez le moustique (Boudin et *al.*, 2005 ; Boussema et *al.*, 2012).

Un volume de 500 µL de sang reconstitué est distribué dans les cellules de gorgement à l'aide de micropipettes. Les moustiques femelles préalablement affamés pendant 24h peuvent se gorgent au travers de la membrane de parafilm pendant environ 30 min comme le montre la figure 5. Après la prise du repas de sang, les moustiques non gorgés et ceux partiellement gorgés sont éliminés, tandis que les moustiques gorgés sont transférés dans de nouvelles boîtes, maintenues pendant 7 jours à l'insectarium dans les mêmes conditions de température et d'humidité que les adultes d'élevage. Ils sont nourris quotidiennement de jus sucré (solution de glucose 5%).

Sept jours après le repas de sang, les femelles survivantes sont disséquées. Pour ce faire, elles sont anesthésiées au chloroforme pendant quelques secondes, puis disséquées sur lame porte-objet à l'aide de pinces. La dissection des moustiques est faite sous une loupe binoculaire, dans une goutte de mercurochrome 0,4 % préparée avec du tampon PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*). Elle permet d'extraire l'estomac du moustique afin de rechercher les oocystes du parasite ; la présence d'oocystes signe l'infection du moustique (Figure 18). L'estomac une fois extrait est recouvert d'une lamelle et l'analyse microscopique subséquente permet de déterminer, par expérience, la prévalence (Pourcentage de moustiques infectés sur le total de moustiques ayant reçus le repas de sang dans une boîte) et l'intensité d'infection ou la charge oocystique moyenne (Nombre moyen de parasites par moustique infecté).

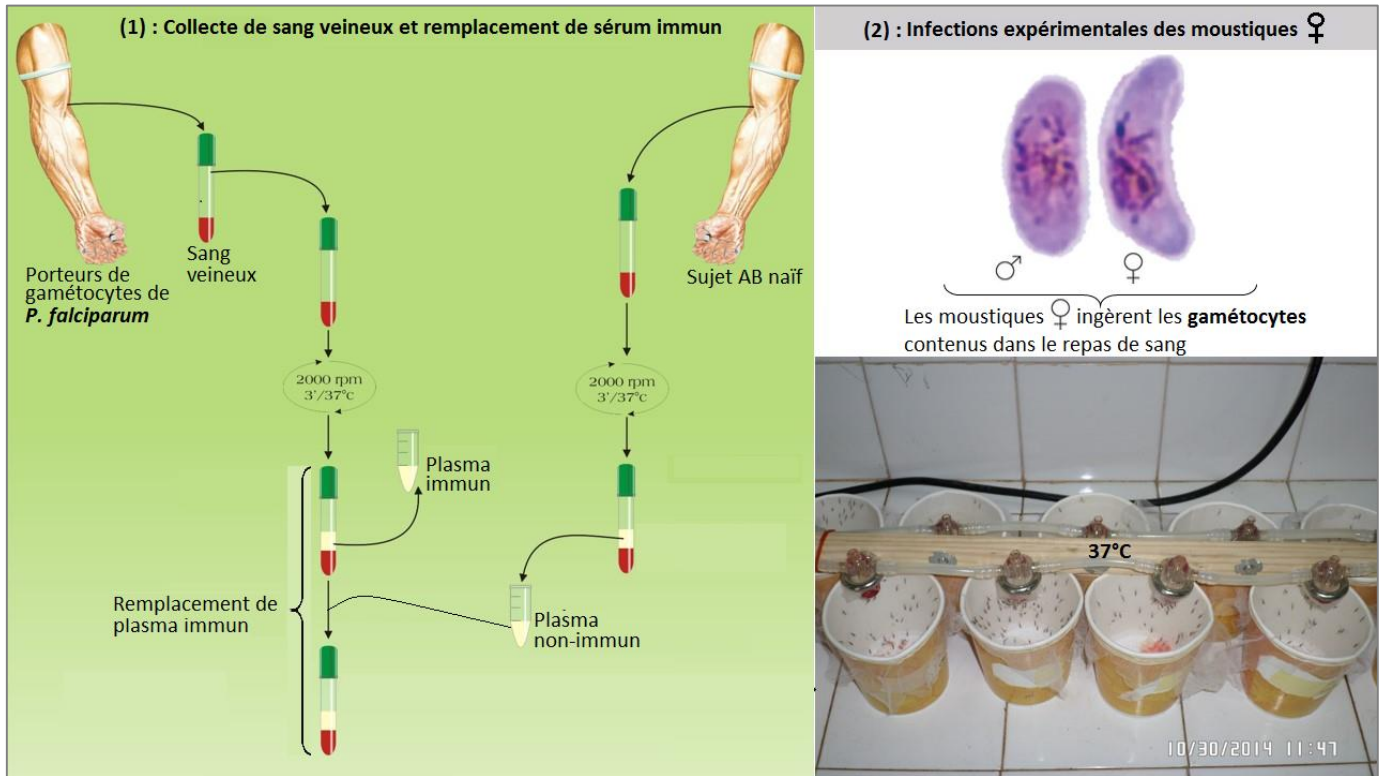


Figure 17 : Infections expérimentales des moustiques femelles sur membrane de parafilm à partir du sang de porteurs de gamétocytes (OCEAC)

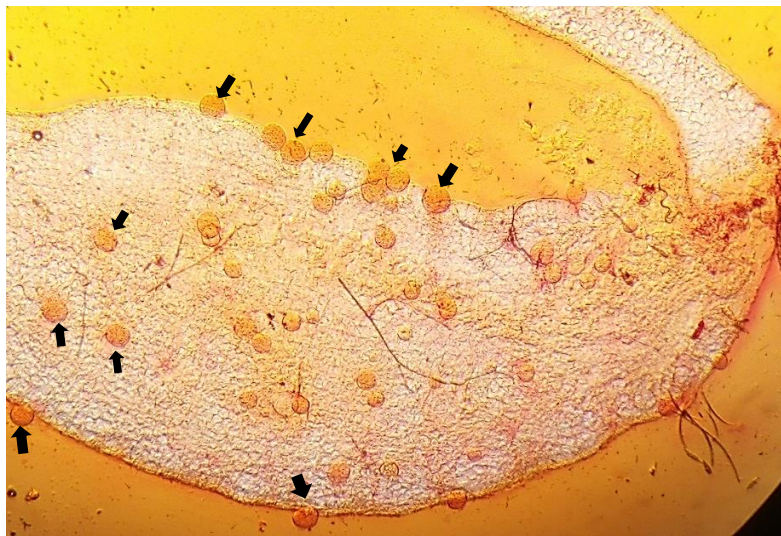


Figure 18: Intestin de moustiques 7 jours après infection avec *P. falciparum* (x20) (OCEAC). Les flèches indiquent la position d'ooKystes colorés au mercurochrome.

VI-3- Collecte d'échantillons de moustiques après infections expérimentales :

La phase de collecte d'échantillons (Carcasses, intestins de moustiques infectés et moustiques entiers) est récapitulée dans le tableau 2 ci-dessous suivant les objectifs définis.

- Pour les moustiques de terrain les mâles obtenus après émergence et les carcasses des femelles gorgées (infectées et non-infectées) ont été collectées individuellement dans des tubes *Eppendorf* contenant 50µL d'éthanol pour rechercher les génotypes de gènes pro/antiparasitaires.
- Pour les lignées L3-5 vs Ng et S1high vs S1low, les carcasses de moustiques gorgées (infectées et non-infectées) et intestins de moustiques infectés ont été collectées individuellement dans des tubes *Eppendorf* contenant 50µL d'éthanol afin de séquencer les génomes de moustiques et de parasites au stade oocyste. Le séquençage des ARNm exprimés au cours de la réponse antiparasitaire (analyse transcriptomique) a requis la collecte de 20 moustiques entiers par gobelet pour chaque lignée à différents temps après la prise du repas de sang (0, 24 et 48 heures après le repas de sang, et 7 jours après le repas de sang). Deux gobelets de moustiques femelles correspondant à chaque lignée ont été utilisés pour le repas de sang (A : Parasite non-inactivé et B : Parasite inactivé). Les gobelets A et B correspondent respectivement aux moustiques « essai » et « témoin ». L'inactivation des parasites pour le gorgement des moustiques contenus dans les gobelets B est faite à 42°C dans un bain à sec à l'aide d'un incubateur *Eppendorf* pendant 15 min. La collecte des différentes lignées de moustiques aux différents temps est faite dans des cryotubes contenant 200µL de tampon *RNAprotected-Qiagen*.

Tableau 2 : Plan de collecte d'échantillons après infections expérimentales.

Lignées de moustiques	Expériences	Collectes			
		0 Hpi	24 Hpi	48 Hpi	7 Jpi
Moustiques terrain	Diagnostic d'espèces et Génotypage de gènes pro/antiparasitaires	Moustiques entiers mâles	/	/	- Carcasses*
	Séquençage de génomes de moustiques et parasites	/	/	/	- Carcasses * - Intestins infectés*
L3-5 vs NG	Analyses transcriptomiques**	20 L3-5 20 NG	20 L3-5 20 NG	20 L3-5 20 NG	20 L3-5 20 NG
	Séquençage de génomes de moustiques et parasites	/	/	/	- Carcasses* - Intestins infectés*
S1high vs S1low	Analyses transcriptomiques**	20 S1high 20 S1low	20 S1high 20 S1low	20 S1high 20 S1low	20 S1high 20 S1low

* : Echantillons collectés individuellement dans tubes *Eppendorf* contenant 50µL d'éthanol.

** : Echantillons collectés dans cryotubes contenant 200µL de *RNAprotect*.

Hpi : Heure post-infection, Jpi : Jour post-infection.

VI-4- Purification des gamétocytes de *P. falciparum* :

Dans le sang total des porteurs de gamétocytes on retrouve souvent deux différents stades de développement du parasite : Les stades asexués constitués de trophozoïtes et schizontes, et le stade sexué constitué de gamétocytes. La purification des parasites consiste dans ce cas à collecter séparément les stades asexués d'une part et les gamétocytes d'autre part. Cette opération est basée sur le métabolisme engendré par le parasite dans la cellule hôte (érythrocyte). En effet lors de la gamétocytogenèse dans les érythrocytes infectés, le métabolisme du parasite est à l'origine de la dégradation de l'hémoglobine (pigment respiratoire) en hémozoïne (pigment malarique), ce qui entraîne l'oxydation du fer ferreux (complexe diamagnétique Fe^{2+}) en fer ferrique (complexe paramagnétique Fe^{3+}). Cette propriété du parasite rend possible la purification magnétique des gamétocytes contenus dans les érythrocytes (Ribaut et *al.*, 2008).

Au laboratoire, le procédé de purification se déroule en 2 étapes successives dans un système MACS (*magnetic columns*) : 1) la préparation de la colonne LD et 2) la filtration ou purification des gamétocytes. La colonne LD est un instrument en forme d'entonnoir, composé de billes ferromagnétiques qui permettent l'adsorption des gamétocytes dans un champ magnétique (Figure 19). Les stades asexués sont collectés en premier et les gamétocytes sont élués plus tard dans un autre tube *Eppendorf* lorsque la colonne MACS est enlevée du support aimanté à l'origine du champ magnétique.

- **Préparation de la colonne LD** : La colonne LD est fixée au support aimanté, et préalablement lavée avec 2 mL de PBS 1X. Le sang est transféré dans la colonne avant la fin du lavage pour éviter la présence d'air dans le système.
- **Filtration des gamétocytes** : 4mL de sang prélevé dans un tube hépariné est centrifugé à 2000 tr/min pendant 5 min. Le plasma est retiré à l'aide d'une micropipette et le culot globulaire (environ 1mL) est lavé dans 3 mL de PBS 1X, mélangé par inversion et centrifugé de nouveau à 2000 tr/min pendant 5 min. La partie supérieure est éliminée et le culot est repris dans 3mL de PBS ; le mélange obtenu est transféré dans la colonne. Dès que la coloration du liquide à la sortie de la colonne (à l'extrémité en aval) devient rose, les stades asexués sont récupérés dans un tube de 4 mL, tandis que les érythrocytes contenant des gamétocytes sont fixés sur la matrice de billes ferromagnétiques. Une fois que la colonne est vidée, le tube est enlevé et cette dernière est lavée avec du PBS jusqu'à l'obtention d'un liquide incolore à son extrémité. La colonne est enlevée du support aimanté et placé au-dessus d'un nouveau tube sec. Un volume de 4 mL de PBS est à nouveau transféré dans la colonne, pour être purgé délicatement jusqu'à élution totale des gamétocytes. Le tube est ensuite centrifugé à 2000 tr/min pendant 5 min, le PBS surnageant est

retiré à l'aide d'une micropipette et le culot est repris dans 50µL de PBS puis conservé à -20°C pour l'extraction d'ADN génomique (ADNg).

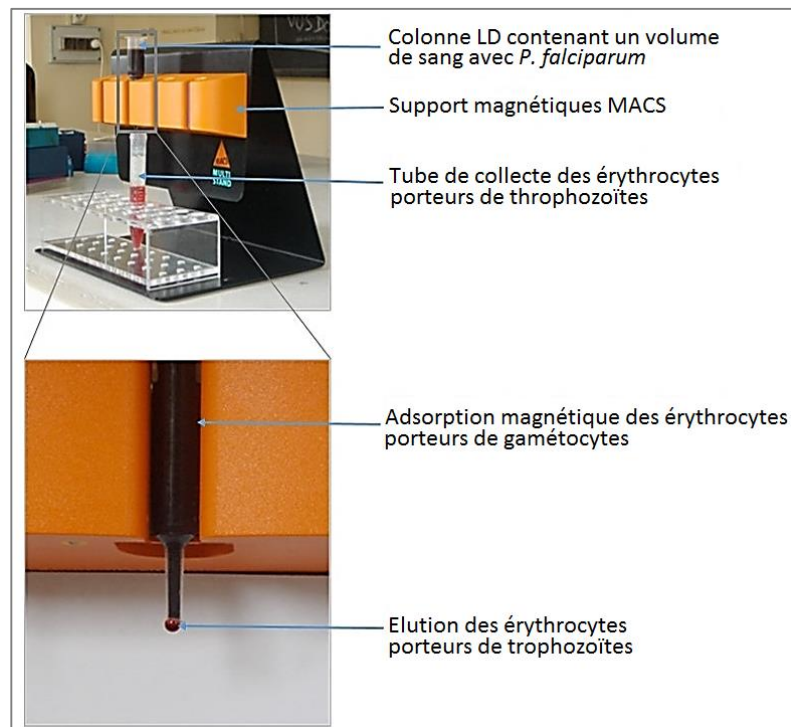


Figure 19 : Purification des gamétocytes de *P. falciparum*. (OCEAC)

VI-5- Infections expérimentales de moustiques avec le parasite murin *P. berghei* :

Les infections à *P. berghei* sont effectuées par gorgement direct des moustiques sur une souris infectée avec des clones exprimant constitutivement la protéine fluorescente GFP : PbGFPcon (Franke-Fayard et *al.*, 2004) et PbGOMO14 (Manzoni et *al.*, 2014). Le parasite est maintenu par transfert de sang d'une souris infectée à une souris saine. Pour ce faire, du sang est prélevé par ponction cardiaque sur la souris infectée et dilué en fonction de la parasitémie dans une solution de PBS stérile. Cette solution est ensuite transférée par injection intraveineuse à une souris saine 3 jours avant le jour de l'infection, permettant ainsi d'obtenir une parasitémie de 2 à 5% et une gamétocytemie de 0.05 à 0.15%. Le diagnostic de l'infection chez les souris est fait sur une goutte de sang prélevée au bout de la queue par cytométrie de flux (FACS : *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS Calibur) et/ou microscopie optique (analyse d'un frottis sanguin).

Après vérification de leur parasitémie qui doit être comprise entre 2 et 5%, les souris sont anesthésiées avec un mélange de solution de Xylazine (5mg/mL) et Kétamine (10mg/mL) dans du PBS à raison de 10 µL/g de poids corporel. Une fois la souris endormie, elle est déposée sur la

cage/gobelet de moustiques. Le repas de sang des moustiques dure environ 30 minutes à 21°C. Par la suite, les femelles gorgées sont triées et conservées à la même température (Figure 20).

Au bout de 7 jours, les moustiques survivants sont disséqués dans du PBS sur la glace et les intestins sont montés dans un mélange PBS + glycérol (1v/1v) entre lame et lamelle. Les intestins sont visualisés avec un microscope à fluorescence *Nikon AZ100*. Les oocystes sont comptés en utilisant le logiciel *ImageJ*.

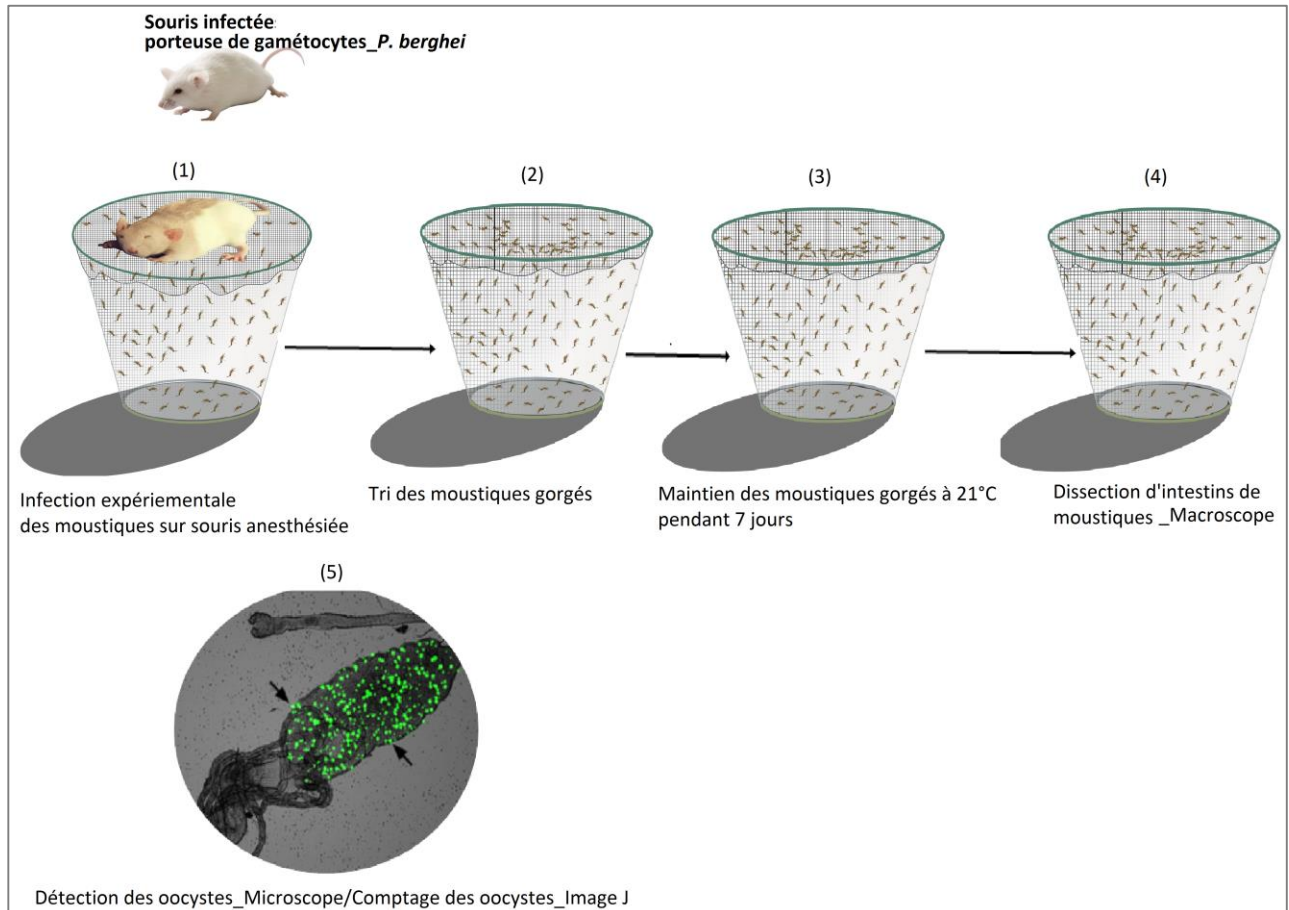


Figure 20 : Infection expérimentale des moustiques sur souris (IBMC)

VII- Extraction d'ADN génomique (ADNg) et analyses moléculaires :

VII-1- Extraction d'ADN génomique :

Les méthodes d'extraction d'ADNg ainsi que les différents tampons utilisés sont reportés dans le tableau 3. Les protocoles de chaque méthode sont reportés en annexe 3.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction d'ADNg utilisées pour les analyses moléculaires

Lignées de moustiques et Parasites	Matériel biologique	Méthodes d'extraction	Tampons d'extraction	Tampon de suspension d'ADNg	Conservation
Moustiques terrain	Carcasses	CTAB	CTAB 2%	Eau stérile	-20°C
L3-5 vs Ng	Carcasses	<i>MN Nucleospin Tissue XS kit</i>	T1, B3 et Protéinase K	Tris (PH = 8,2)	-20°C
	Intestins de moustique avec oocystes Pf*	<i>Qiagen blood and tissue kit</i>	ATL, AL et Protéinase K	Tris (PH = 8,2)	-20°C
	Moustique entier	<i>Grinding method</i>	<i>Grinding buffer</i>	/	-20°C
	Patte de moustique	<i>Grinding method</i>	<i>Grinding buffer</i>	/	-20°C
S1high vs S1low	Carcasses	<i>MN Nucleospin Tissue XS kit</i>	T1, B3 et Protéinase K	Tris (PH = 8,2)	-20°C
	Intestins de moustique avec oocystes Pf*	<i>Qiagen blood and tissue kit</i>	ATL, AL et Protéinase K	Tris (PH = 8,2)	-20°C
	Moustique entier	<i>Grinding method</i>	<i>Grinding buffer</i>	/	-20°C
	Patte de moustique	<i>Grinding method</i>	<i>Grinding buffer</i>	/	-20°C
Parasites sanguins	Gamétocytes de Pf*	<i>Qiagen blood and tissue kit</i>	AL et Protéinase K	Tris (PH = 8,2)	-20°C

* : *Plasmodium falciparum*

VII-2- Diagnostic moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* et étude du polymorphisme des gènes candidats pro/anti parasitaires :

La méthode d'analyse utilisée est la PCR-RFLP. Après l'extraction d'ADNg elle s'est déroulée en deux étapes successives : 1) l'amplification de séquences cibles par PCR, et 2) la digestion enzymatique avec des enzymes de restriction spécifiques, suivie d'une révélation par électrophorèse en gel d'agarose étalonné avec un marqueur un poids moléculaire.

VII-2-1- Diagnostic moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae s.l.* chez les moustiques de terrain :

La technique appliquée ici est basée sur l'amplification des séquences d'intérêt par PCR multiplex avec 4 différentes amorces, AG (5'-CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT-3'), AM (GTG ACC AAC CCA CTC CCT TGA), AA (AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA) spécifiques respectivement à *An. gambiae*, *An. melas*, et *An. arabiensis*, et UN (5'-GTG TGC CGC TTC CTC GAT GT-3') l'amorce universelle dont la séquence est conservée au sein du complexe. Cette

amplification est suivie d'une restriction enzymatique avec de l'enzyme *Hha* I (*Haemophilus haemolyticus* I) à 37°C (Fanello et al., 2002). Le milieu réactionnel et le processus d'amplification génique sont réalisés comme l'indique le tableau 4, et le profil de restriction est observé sur gel d'agarose 2%. Les différentes tailles de bandes obtenues sont caractéristiques d'espèce ; chez *An. gambiae* on a 390 pb (*An. coluzzii* : 367 + 23 pb ; *An. gambiae s. s.* : 257 + 110 + 23 pb), les autres *An. melas*, et *An. arabiensis* pouvant être observées sans restriction enzymatique à 464 pb et 315 pb respectivement.

Tableau 4 : Protocole de PCR multiplexe avec restriction enzymatique pour le diagnostic moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae s. l.*

PCR Master mix			PCR		
PCR	Concentration finale	Volume pour 25 µL de réaction	Dénaturation	95°C 2 Min	35 Cycles
Tampon Taq 10X	1X	2.5	Dénaturation	95°C 15 Sec	
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 mM	2.5	Hybridation	55°C 15 Sec	
dNTPs* (5 mM)	0.2 mM each	1.0	Elongation	72°C 1 Min	
Amorce UN (10 µM)	0.2 µM	0.5	Elongation	72°C 5 Min	
Amorce AG (10 µM)	0.2 µM	0.5	Tailles de fragments attendus		
Amorce AA (10 µM)	0.2 µM	0.5	<i>An. gambiae</i> : 390 pb		
Amorce AM (10 µM)	0.2 µM	0.5	<i>An. arabiensis</i> : 315 pb		
Enzyme Taq (5 U/µL)	0.02 U/µL	0.1	<i>An. melas</i> : 464 pb		
H ₂ O	/	14.9			
ADNg	/	2.0			
Digestion Master mix			Digestion enzymatique		
Digestion	Final concentration	Volume pour 25 µL de réaction	Incubation 12 heures à 37°C		
Tampon d'enzyme (10X) avec BSA	1X	2.5			
Enzyme <i>Hha</i> I (10 U/µL)	0.1	0.25	Tailles de fragments attendus		
H ₂ O	/	12.25	<i>An. gambiae s. s.</i> : 257 + 110 + 23 pb		
ADN (produit PCR)	/	10	<i>An. coluzzii</i> : 367 + 23 pb		

VII-2-2- Etude du polymorphisme de *TEPI* :

L'étude du polymorphisme de *TEPI* permet de diagnostiquer les différents génotypes afférents présents dans les populations naturelles d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*. L'amplification de la séquence cible de *TEPI* a été faite par PCR nichée et la taille des fragments attendus est de 764 pb. Les milieux réactionnels ont été préparés comme l'indique le tableau 5, avec les amorces suivantes respectivement pour la première et deuxième PCR : PCR1 : VB3 (5'-ATG TGG TGA GCA GAA TAT GG-3') et VB4 (5'-ACA TCA ATT TGC TCC GAG TT-3') ; PCR2 : AG 1653 (5'-CTT CAG TTG AAC GGT GTA GTC GTT-3') et AG 1656 (5'-ATC TAA TCG ACA AAG CTA CGA ATT T-3'). Pour déterminer les génotypes de *TEPI*, les produits de la seconde PCR sont digérés distinctement

avec 3 enzymes de restriction *Bam* HI (*Bacillus amyloquefaciens* HI), *Hind* III (*Haepphilus influenza* III) et *Bse* NI ou *Bsr* I (*Geobacillus stearothermophilus* I) (Levashina et al., protocole non publié). L'analyse du profil de restriction sur gel d'agarose 2% a permis de distinguer 2 allèles résistants (R1 et R2) et 2 allèles sensibles (S1 et S2) à travers 10 géotypes possibles (Tableau 6).

Tableau 5 : Protocole de PCR nichée avec restrictions enzymatiques pour le géotypage *TEP1*.

PCR 1 Master Mix			PCR 1		
PCR 1	Final concentration	Volume pour 15 μ L de réaction	Dénaturation	95°C	2 Min
2X GoTaq Master mix	1X	7.5	Dénaturation	95°C	15 Sec
Amorce VB3 (10 μ M)	0.4 μ M	0.6	Hybridation	55°C	15 Sec
Amorce VB4 (10 μ M)	0.4 μ M	0.6	Elongation	72°C	1 Min
H ₂ O	/	4.3	Elongation	72°C	5 Min
ADNg	/	2			
					30 Cycles
PCR 2 Master Mix			PCR 2		
PCR 2	Concentration finale	Volume pour 40 μ L de réaction	Dénaturation	95°C	2 Min
2X GoTaq Master mix	1X	20	Dénaturation	95°C	15 Sec
Amorce AG 1653 (10 μ M)	0.4 μ M	1.6	Hybridation	55°C	15 Sec
Amorce AG 1656 (10 μ M)	0.4 μ M	1.6	Elongation	72°C	1 Min
H ₂ O	/	15.8	Elongation	72°C	5 Min
ADN (produit PCR1)	/	1			
					Taille de fragment attendu : 764 bp
Digestion Master Mix			Digestion enzymatique		
Digestion	Concentration finale	Volume pour 15 μ L de réaction			
Tampon enzyme (10X) avec BSA	1X	1	<i>Bam</i> HI	T° : 37°C	12 heures
Enzyme de restriction (10 U/ μ L)	0.1 U/ μ L	0.2	<i>Hind</i> III	T° : 37°C	12 heures
H ₂ O	/	3.8	<i>Bse</i> NI (<i>Bsr</i> I)	T° : 65°C	12 heures
ADN (produit PCR2)	/	10			

Tableau 6 : Profil de restriction pour le diagnostic des génotypes *TEPI*.

Genotypes <i>TEPI</i>	Tailles des fragments de restriction (bp)		
	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Bse</i> NI (<i>Bsr</i> I)
<i>*R1/R1</i>	399	764	764
	365		
<i>*R2/R2</i>	399	764	663
	365		101
<i>*S1/S1</i>	764	657	537
		108	227
<i>*S2/S2</i>	764	657	764
		108	
<i>*R1/R2</i>	399	764	764
	365		663
<i>*R1/S1</i>	764	764	764
	399	657	537
<i>*R1/S2</i>	365	108	227
	764	764	764
<i>*R2/S1</i>	399	657	
	365	108	537
<i>*R2/S2</i>	764	764	764
	399	657	663
<i>*S1/S2</i>	365	108	101
	764	657	764
<i>*S1/S2</i>	764	657	537
		108	227

VII-2-3- Identification moléculaire des moustiques L3-5 et NG.

Certains des échantillons de L3-5 inclus dans les infections de terrain étaient contaminés par des moustiques NG. Afin d'identifier et d'exclure les moustiques contaminants, nous avons sélectionné au moins un marqueur par bras de chromosome permettant de distinguer les L3-5 des NG. A partir des séquences des génomes des lignées L3-5 et Ngousso disponibles au laboratoire, des polymorphismes de type SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisme*) ont été identifiés afin de dessiner des marqueurs moléculaires de type CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) permettant de distinguer les deux lignées par une amplification par PCR suivie d'une digestion restrictive spécifique d'une des lignées (Figure 21). L'amplification par PCR est effectuée avec le mélange commercial GoTaq (*Promega*), qui contient le tampon de réaction, les dNTPs, ainsi que la *Taq* polymérase. Le milieu réactionnel est réalisé selon le tableau 7, avec les amorces spécifiques des séquences à amplifier (tableau 8). La PCR est réalisée dans les conditions suivantes : 2 min à 95°C, 35 cycles comprenant chacun une première étape de dénaturation de l'ADN matrice de 10 s à 94°C, une étape

d'hybridation (Températures, voir tableau 8), puis une étape d'élongation par la Taq polymérase à 72°C pendant 45 sec. La réaction est achevée par une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C. Les fragments d'ADN sont ensuite soumis à une réaction de digestion par une enzyme de restriction. Le milieu réactionnel (Tableau 9) est incubé à 37°C pendant 3 heures. Le produit de la digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

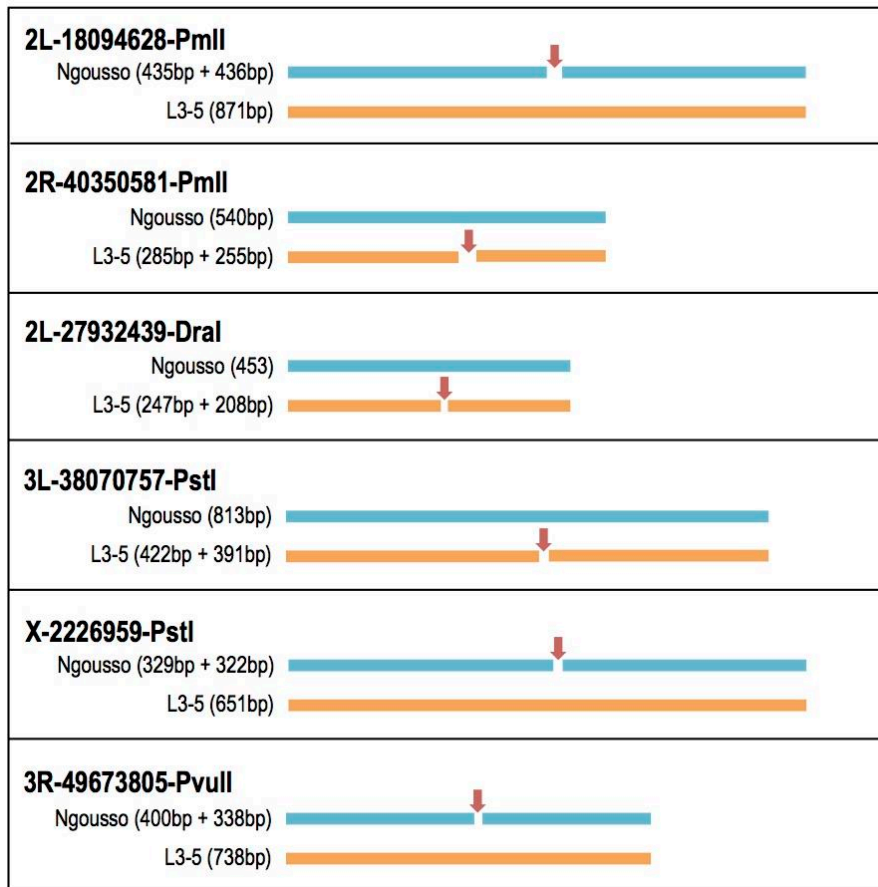


Figure 21 : Marqueurs moléculaires utilisés pour la distinction des lignées L3-5 et Ngouso.

En gras, le chromosome, la position du SNP et l'enzyme de restriction utilisée. Entre parenthèses, les tailles des fragments générés par PCR puis digestion enzymatique.

Tableau 7 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par PCR

Réactif	Volume (μ L)	Concentration finale
Mélange GoTaq 2X (Promega)	7,50	1X
Amorce sens (10 μ M)	0,75	500 nM
Amorce antisens (10 μ M)	0,75	500 nM
ADN génomique	1,00	/
H2O	qsp 15 μ L	/

Tableau 8 : Amorces et températures d'hybridation pour chaque marqueur

Marqueur moléculaire	Chromosome	Enzyme de restriction	Nom de l'amorce	Séquence (3'-5')	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)	Fragment généré pour Ngouso (bp)	Fragments générés pour L3-5 (bp)
2L-18094628-PmII	2L	PmII	AG3329 AG3330	TCCTACCTGTGAGAGTGAATGGT TCTTCCAGACGTACCTGTTCAAC	53	871	435 + 436	871
2R-40350581-PmII	2R	PmII	AG3333 AG3334	GGTAGCGCACAAATGCTTAAACT GGTTCATCTACGACGACGGTGTGAAG	53	540	540	285 + 255
2L-27932439-DraI	2L	DraI	AG3331 AG3332	TACGAGGTAGGTTGATGGTACTT CCAACCTTTTCATTTGTTGCTCA	50	453	453	247 + 208
X-2226959-PstI	X	PstI	AG3327 AG3328	GGCAGCAGCACCAATCCCTA GTGTGTGCGAGTGCCTACC	50	651	329 + 322	651
3L-38070757-PstI	3L	PstI	AG3321 AG3322	TTCGATTTAGCTGTTGCAT AGGCCCTTGCTCATCCGTAA	50	813	813	422 + 391
3R-49673805-PvuII	3R	PvuII	AG3337 AG3338	GAATAGATTACATCGCCGGCGTA ACGCTAGCAAACGTTGCCCAATT	54	738	400 + 338	738

Tableau 9 : Composition du milieu réactionnel pour la digestion des produits de PCR

Réactif	Volume (μ L)
Mélange PCR	15,0
Tampon de réaction 10X (FastDigest, ThermoFisher)	1
Enzyme de restriction ((FastDigest, ThermoFisher)	0,3
H2O	qsp 25 μ L

VII-3- Génotypage des gamétocytes de *P. falciparum* :

L'analyse est faite par PCR héli-nichée pour l'étude de la diversité génétique de *P. falciparum*, avec 7 marqueurs microsatellites répétés en tandem sur 5 chromosomes différents (Anderson et al., 2000 ; Razakandrainibe et al., 2005 ; Annan et al., 2007) (Tableau 10). En effet les marqueurs moléculaires analysés dans les isolats de gamétocytes ont permis de déterminer la MOI (*Multiplicity Of Infection*), qui représente le nombre minimal de clones de parasites, au stade sexué, ingéré par le moustique lors du repas de sang (Nsango et al., 2012).

Tableau 10 : Marqueurs microsatellites utilisés pour la PCR.

Marqueurs Microsatellites	Locus	Amorces	Tailles de fragments attendus	Fluorochrome
Poly α	Chr4	P20 F AAA ATA TAG ACG AAC AGA	130-186	2FAM_blue
		P20 R1 ATC AGA TAA TTG TTG GTA		
		P20 R2 (fluo) GAA ATT ATA ACT CTA CCA		
TA87	Chr6	P25 F1 ATG GGT TAA ATG ACG TAG A	89-119	2PET_red
		P25 F2 (fluo) AAT GGC AAC ACC ATT CAA C		
		P25 R ACA TGT TCA TAT TAC TCA C		
TA109	Chr6	P26 F1 TAG GGA ACA TCA TAA GGA T	151-194	1VIC_green
		P26 F2 (fluo) GGT TAA ATC AGG ACA ACA T		
		P26 R CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA		
ARA2	Chr11	P22 F1 GTA CAT ATG AAT CAC CAA	57-84	2VIC_green
		P22 F2 (fluo) GAA TAA ACA AAG TAT TGC		
		P22 R GCT TTG AGT ATT ATT AAT A		
Pfg377	Chr12	P23 F GAT CTC AAC GGA AAT TAT	92-104	1NED_yellow
		P23 R1 TTA TGT TGG TAC CGT GTA		
		P23 R2 (fluo) TTA TCC CTA CGA TTA ACA		
Pfpk2	Chr12	P24 F CTT TCA TCG ATA CTA CGA	160-207	2NED_yellow
		P24 R1 CCT CAG ACT GAA ATG CAT		
		P24 R2 (fluo) AAA GAA GGA ACA AGC AGA		
TA60	Chr13	P21 F1 CTC AAA GAA AAA TAA TTC	70-88	1FAM_blue
		P21 F2 (fluo) TAG TAA CGA TGT TGA CAA		
		P21 R AAA AAG GAG GAT AAA TAC AT		

Légende : Fluo = fluorochrome utilisé pour la deuxième PCR ; a et b = pool A et pool B, pour la constitution des mélanges

Pour chaque locus, l'ADN du parasite a été amplifié par deux PCR successives (Tableau 11). La première PCR a été faite avec un couple d'amorces non marqué afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour le génotypage microsatellite. La seconde PCR a été effectuée dans les mêmes conditions, à partir du produit de la première amplification, à la seule différence qu'une des amorces non marquées a été remplacée par une amorce marquée avec un fluorochrome. Le fragment amplifié lors de la seconde PCR est ainsi détecté à l'aide d'un séquenceur équipé de logiciels *GENESCAN* et *GENOTYPER* qui va permettre de mesurer les tailles des allèles en fonction du standard de taille LIZ-500 (Genescan).

Tableau 11 : Protocole d'amplification des marqueurs microsatellites chez *P. falciparum* (Hemi-nested PCR).

PCR 1 Master mix			PCR process		
PCR 1	Concentration finale	Volume pour 15 μ L de réaction			
Tampon Taq 10X	1X	1.5	Dénaturation	94°C	3 Min
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	0.5	Dénaturation	94°C	30 Sec
dNTPs (5 mM)	0.2 mM	0.3	Hybridation	42°C	30 Sec
Amorce F (10 μ M)	1.5 pM	0.15	Elongation	65°C	40 Sec
Amorce R (10 μ M)	1.5 pM	0.15	Elongation	65°C	2 Min
Enzyme Taq (5 U/ μ L)	1 U/ μ L	0.2			
H ₂ O	/	10.2			
ADNg	/	2.0			
					25 Cycles
PCR 2 Master mix			PCR process		
PCR 2	Concentration finale	Volume pour 15 μ L de réaction			
Taq Buffer 10X	1X	1.5	Dénaturation	94°C	3 Min
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	0.5	Dénaturation	94°C	20 Sec
dNTPs (5 mM)	0.2 mM each	0.3	Hybridation	45°C	20 Sec
Amorce (10 μ M)	1.5 pM	0.15	Elongation	65°C	30 Sec
Amorce fluorescente (10 μ M)	1.5 pM	0.15	Elongation	65°C	2 Min
Enzyme Taq (5 U/ μ L)	1 U/ μ L	0.2			
H ₂ O	/	10.2			
Produit PCR 1	/	2.0			
					30 Cycles

VII-4- Caractérisation du polymorphisme de *Pfs47* :

L'étude du polymorphisme de *Pfs47* a permis de rechercher, chez les parasites de terrain, les SNPs caractéristiques des isolats virulents et avirulents rapportées dans les travaux de Molina-Cruz et *al.*, 2013, en comparaison avec les souches de laboratoire NF54, 3D7, GB4 et 7G8. Pour caractériser le polymorphisme de *Pfs47*, l'ensemble de la partie codante du gène est amplifiée et séquencée. Le couple d'amorces AG 3146 (5'-ATT TAC TCG GTC ACA AAA TAT AAA CA-3') et AG 3147 (5'-TGG AAA ACA TTC CAT ATA CTA AAT CA-3') permet d'amplifier un fragment de 1797 pb (Tableau 12). Le produit d'amplification a par la suite été séquencé avec les amorces AG 3146 et AG 3147 et 2 amorces internes : AG 3148 (5'-CTC TTT GGA AAG ACA AGA GTG TG-3') et AG 3149 (5'-TAT GCA ATA AAT TCA TCG TTC AGT-3'). Les chromatogrammes obtenus après séquençage ont été comparés aux séquences *Pfs47*, rapportées dans les travaux de Molina-Cruz et *al.*, 2013 avec les souches *P. falciparum* de laboratoire NF54, 3D7, GB4 et 7G8. L'analyse est faite à l'aide du logiciel *DNASTAR Seqman*.

Tableau 12 : Protocole de PCR Pf47 chez *P. falciparum*.

PCR Master mix			PCR process		
PCR	Concentration finale	Volume pour 20 μ L de réaction	Dénaturation	94°C	4 Min
Tampon Kapa (5X)	1X	4	Dénaturation	98°C	20 Sec
dNTPs (10 mM)	0.3 mM each	0.6	Hybridation	56°C	40 Sec
Amorce AG 3146 (10 μ M)	0.3 pM	0.6	Elongation	65°C	1 Min 15 Sec
Amorce AG 3147 (10 μ M)	0.3 pM	0.6	Elongation	65°C	10 Min
Enzyme Kapa (5 U/ μ L)	0.1 U/ μ L	0.4	Taille de fragment attendu : 1797 pb		
H ₂ O	/	10.8			
ADNg	/	3.0			

35
Cycles**VIII- Préparation des bibliothèques d'ADN génomique pour le séquençage à haut débit :**

Les ADN génomiques des moustiques collectés sur le terrain et destinés au séquençage génomique sont préparés avec le kit Macherey-Nagel et les échantillons sont élués dans 30 et 50 μ L de Tris 10mM, pH = 7,7 pour les intestins et les carcasses, respectivement. La concentration des ADNs génomiques est mesurée à l'aide du fluoromètre Qubit 2.0 avec le kit High Sensitivity dsDNA assay (Life Technologies). Chaque échantillon est dilué à 0,2 ng/ μ L afin de procéder à la préparation de banques de séquençage, avec le kit Nextera XT (Illumina). L'ADN est fragmenté par tagmentation à 55°C pendant 5 min, et l'amplification par PCR permettant l'introduction de doubles indexes Illumina (Illumina) est faite à l'aide d'un thermocycleur Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Les banques de fragments d'ADN sont purifiées avec des billes magnétiques Clean NGS (Clean NA) selon le protocole fourni, et normalisées suite à leur quantification avec le protocole décrit plus haut (Qubit). Des mélanges de 18 échantillons sont préparés, et une sélection de taille est appliquée à l'aide des billes magnétiques Clean NGS, avec des ratios de 0,7X/0,6X pour les sélections gauche et droite, respectivement. La distribution des tailles des fragments est observée à l'aide du Bioanalyseur Agilent 2100, avec le kit Agilent D1000 High Sensitivity (Agilent) en suivant les recommandations du fournisseur. Les banques de séquençage ainsi mélangées et sélectionnées présentent un pic à 550 pb. Elles sont séquencées "en paire" (2 x 150 pb) par la plateforme de séquençage de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), à l'aide d'un séquenceur Illumina HiSeq 4000.

Résultats

Chapitre 1 :

Do the venous blood samples replicate malaria parasite densities found in capillary blood ? A field study performed in naturally-infected asymptomatic children in Cameroon.

Ce chapitre a fait l'objet de publication sur *Malaria Journal* (Sandeu et al., 2017). Et un résumé est proposé ci-dessous.

Résumé :

L'étude des interactions *Anopheles-Plasmodium*, la mesure de l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques ou le développement de candidats vaccins pour le contrôle du paludisme sont basés sur la technique DMFA (*Direct Membrane Feeding Assay*). Dans ce dispositif, le sang, veineux ou capillaire, contenant des gamétocytes est apporté aux moustiques à travers un système de gorgement artificiel sur membrane. Les porteurs de gamétocytes sont sélectionnés après examens microscopiques de gouttes épaisses réalisés à la suite de prélèvement de sang au bout du doigt. Cependant un volume de sang veineux est prélevé au pli du coude pour les infections expérimentales, alors que les parasites dans le sang circulant sont séquestrés dans de petits vaisseaux, et ce phénomène peut altérer la détermination précise de la parasitémie sur la goutte épaisse. La source de sang, veineux ou capillaire, pourrait alors avoir un impact sur le succès des infections expérimentales. Des investigations étaient alors nécessaires pour implémenter la technique DMFA en conditions naturelles de transmission.

Les gouttes épaisses ont été obtenues auprès d'enfants asymptomatiques porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* dans les écoles primaires de l'Arrondissement de Mfou, à 30 Km de Yaoundé au Cameroun. Les collectes ont duré quatre saisons. Les densités de parasites ont été déterminées chez 137 enfants infectés et comparées en fonction de l'origine du prélèvement sanguin, veineux ou capillaire. L'effet de l'origine du sang, veineux ou capillaire, sur les densités de gamétocytes et des stades asexués a été évalué par des méthodes d'ajustement de modèles cumulatifs (CLMM : *Cumulative link mixed models*). L'infectivité des gamétocytes pour les moustiques a été mesurée par DMFA.

La prévalence du portage asymptomatique de stades asexués de *P. falciparum* chez les enfants âgés de 4 à 15 ans est de 51,8%. La prévalence globale du portage de gamétocytes de *P. falciparum* est de 8,9% et varie d'une école à une autre. Aucune différence dans la densité des gamétocytes et des stades asexués n'est observée dans le sang capillaire vs sang veineux. Les infections par DMFAs avec du sang capillaire n'ont pas pu être réalisées pour des raisons techniques.


Les densités de parasites ne diffèrent pas dans le sang veineux et le sang capillaire chez les sujets asymptomatiques, pour les stades sexués et les stades asexués. Ces observations suggèrent que la source de sang, veineuse ou capillaire, n'interfère pas sur l'efficacité des DMFAs.

RESEARCH

Open Access



Do the venous blood samples replicate malaria parasite densities found in capillary blood? A field study performed in naturally-infected asymptomatic children in Cameroon

Maurice M. Sandeu¹, Albert N. Bayibéki¹, Majoline T. Tchioffo^{1,2}, Luc Abate², Geoffrey Gimonneau², Parfait H. Awono-Ambéné¹, Sandrine E. Nsango^{1,3}, Diadier Diallo⁴, Antoine Berry^{5,6}, Gaétan Texier^{7,8†} and Isabelle Morlais^{1,2*†} 

Abstract

Background: The measure of new drug- or vaccine-based approaches for malaria control is based on direct membrane feeding assays (DMFAs) where gametocyte-infected blood samples are offered to mosquitoes through an artificial feeder system. Gametocyte donors are identified by the microscopic detection and quantification of malaria blood stages on blood films prepared using either capillary or venous blood. However, parasites are known to sequester in the microvasculature and this phenomenon may alter accurate detection of parasites in blood films. The blood source may then impact the success of mosquito feeding experiments and investigations are needed for the implementation of DMFAs under natural conditions.

Methods: Thick blood smears were prepared from blood obtained from asymptomatic children attending primary schools in the vicinity of Mfou (Cameroon) over four transmission seasons. Parasite densities were determined microscopically from capillary and venous blood for 137 naturally-infected gametocyte carriers. The effect of the blood source on gametocyte and asexual stage densities was then assessed by fitting cumulative link mixed models (CLMM). DMFAs were performed to compare the infectiousness of gametocytes from the different blood sources to mosquitoes.

Results: Prevalence of *Plasmodium falciparum* asexual stages among asymptomatic children aged from 4 to 15 years was 51.8% (2116/4087). The overall prevalence of *P. falciparum* gametocyte carriage was 8.9% and varied from one school to another. No difference in the density of gametocyte and asexual stages was found between capillary and venous blood. Attempts to perform DMFAs with capillary blood failed.

Conclusions: *Plasmodium falciparum* malaria parasite densities do not differ between capillary and venous blood in asymptomatic subjects for both gametocyte and trophozoite stages. This finding suggests that the blood source should not interfere with transmission efficiency in DMFAs.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Membrane feeding, Blood source, Malaria, Cameroon

*Correspondence: isabelle.morlais@ird.fr

†Gaétan Texier and Isabelle Morlais contributed equally to this work

² UMR MIVEGEC, Institut de Recherche pour le Développement, 911

Avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier Cedex, France

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

Background

Despite recent progress towards disease control, malaria continues to affect 212 million people and kill 429,000 persons per year [1]. In sub-Saharan Africa, *Plasmodium falciparum* remains the most important threat, accounting for most of the malaria mortality [2, 3]. Current control strategies aim at reducing malaria transmission through vector control interventions and appropriate diagnosis and treatment. There is currently no effective vaccine for malaria. The most advanced candidate, the RTS,S, has shown relative low efficacy and WHO has recommended pilot implementations before its deployment [4–6]. Several other vaccine candidates are under development and among them transmission-blocking vaccines (TBVs) that target *Plasmodium* parasites within the mosquito, are in pre-clinical trials [7, 8]. The efficacy of TBVs at reducing or blocking transmission is measured by the reduction of the oocyst intensity and infection prevalence in mosquitoes through membrane feeding assays (MFAs) [8, 9].

In malaria endemic areas, transmission from human to mosquito occurs when a female *Anopheles* mosquito ingests gametocytes, the sexual stages, from peripheral blood while feeding. Thus, gametocytes represent a crucial stage for transmission-reducing interventions (TRIs). However, transmissibility of gametocytes from naturally infected donors is complex and relies on multiple factors from the host, the parasite and the mosquito [10–12]. In a meta-analysis of previous studies, DMFAs were shown suitable for the evaluation of gametocyte infectiousness and different aspects that require optimization for larger scale screening of TBVs were discussed [11]. Differences in the gametocyte concentration or maturity between different blood compartments were pointed out as a putative source of variation in DMFAs.

In the present study, *P. falciparum* parasite densities, trophozoites (ring stages) and gametocytes, were compared between capillary and venous blood samples from naturally-infected gametocyte carriers identified among pupils attending primary schools in Cameroon.

Methods

Ethics statement

All procedures involving human subjects used in this study were approved by the Cameroonian national ethics committee (statements 2013/02/031/L/CNERSH/SP, and 2014/04/440/CE/CNERSH/SP). Participants were enrolled upon signature of an informed consent by their parent or legal guardian.

Study population

Participants in this study were recruited among asymptomatic children aged from 4–15 years who attended

primary schools in the area of Mfou (3°72N; 11°64E), a small city 30 km apart from Yaoundé, Cameroon. A total of seven schools were screened in the area. Parasitological surveys were conducted in collaboration with the medical team of the local hospital during four consecutive seasons of malaria transmission, short rainy seasons (April–May) and long rainy seasons (October–November) in 2013 and 2014.

Sample collection and parasite quantification

A thick blood smear from finger prick was performed to each volunteer attending school the day of collection. All blood smears were dried, stained with a 10% Giemsa solution for 20 min and then examined microscopically by qualified, experienced microscopists using a Leica® light microscope with a 100× oil-immersion objective. Asexual parasite-positive children were treated with an artemisinin-based combination therapy (ACT) according to national guidelines the day following the parasitological survey. Blood collections for accurate quantification of parasites were performed to those identified as gametocyte carriers. Blood collections from mixed-infections were excluded from the study.

For each gametocyte carrier, thick blood smears were prepared simultaneously in triplicate using a standardized blood volume of 5 µl. Capillary blood (CB) samples were collected by pipetting drops of blood from finger prick dispensed on a clean glass slide. Venous blood (VB), ~200 µl, was drawn from the antecubital vein into a dried Vacutainer® tube pre-warmed in an incubator at 37 °C and 5 µl volumes were pipetted directly from the tube for the microscopy.

Blood smears were treated as described above and slides were blinded prior to microscopic examination, to avoid reading bias due to participant code or blood source. Parasite densities were determined by counting gametocytes against 1000 white blood cells (WBS) and asexual blood stages (ABS) against 500 WBS, assuming a standard number of 8000 WBS/µl of blood.

Data analysis

The datasets used for statistical analyses are included in Additional files 1 and 2.

Univariate analysis was realized by Chi square and Kruskal–Wallis tests. All 95% confidence intervals for mean were estimated by a bias-corrected and accelerated (BCa) bootstrap procedure (“boot” package). The relationship between sexual and asexual parasite counts was assessed using Spearman’s correlation.

An outcome variable (parasitaemia) was created by averaging individual triplicate measures to smooth a possible within-host variability. Parasite counts were highly skewed and discontinuous, so data were transformed into

an ordinal variable (none, low, high). Agreement among paired samples was tested using the Krippendorff's alpha coefficient [13]. As proposed by Agresti [14], an ordinal response variable is usually analysed by cumulative link models, also known as ordinal regression models. To take into account the pairwise aspect of the data and a possible correlation effect on the dependent variable (parasite density), a cumulative link mixed models (CLMM) was used. Because the study was conducted in seven different sites requiring taking into account local malaria endemicity levels and a possible group effect, the village of inclusion was set as random intercept in each model. To compare the parasitaemia in capillary and venous blood, blood origin measures were adjusted on age and sex. The CLMM was fitted using the Laplace approximation and a probit link function. All analysis was performed in R 3.3.0 [15] with the R package 'ordinal' (function 'clmm') [16]. To assess whether blood origin had an influence on the response variable, models were compared using Akaike Information Criterion (AIC), the difference in AIC from the top-ranked model (Δ AIC) and the blood origin was considered as a significant predictor if $P < 0.05$.

Results

Malaria prevalence in the studied area

The parasitological surveys were conducted over 4 transmission seasons from April 2013 to November 2014. Participants were pupils from 7 primary schools, aged between 4 and 15 years. A total of 4087 individuals were

screened for parasite carriage by microscopic examination of thick blood smears from finger pricks. Results from the blood examinations provided data on the extent of the *P. falciparum* asymptomatic reservoir in this high malaria transmission setting. Microscopical readings identified 8.9% (364/4087) gametocyte carriers and their distribution per season, age and school is given in Table 1. The proportion of gametocyte carriers was similar from one season to another ($P = 0.116$) but varied across schools ($P = 0.05$; Table 1). *Plasmodium falciparum* asexual parasites were detected in 51.8% (2116/4087) of thick blood smears. Mixed infections were identified for 2.8% (115/4087) of the blood smears. Infections with *P. falciparum* and *Plasmodium malariae* represented 94.8% (109/115) of the mixed infections, *P. falciparum* and *Plasmodium ovale* 4.3% (5 samples) and one blood smear contained the three species. The prevalence of *P. falciparum* gametocytes was not different in mixed species infections and in *P. falciparum* mono-infections ($P = 0.84$). Presence of *P. falciparum* gametocytes was recorded in 37.1% (135/364) of blood samples that had no *P. falciparum* asexual stages, which gives an overall *P. falciparum* prevalence of 55.1% (2251/4078).

Comparison of parasite carriage in capillary and venous blood

A total of 137 sets of samples, comprising each 6 blood smears, 3 from capillary blood and 3 from venous blood, were included for the analysis. Coefficient of variation for

Table 1 Malaria prevalence data from the school screenings of asymptomatic individuals (N = 4087)

	N	Gametocyte positive Pf (%)	Asexual parasite positive (%)			
			Pf	Pm	Po	Mixed
Transmission season						
Short rainy, 2013	766	10.6	54.3	2.1	0.1	1.7
Long rainy, 2013	1086	8.2	51.3	4.7	0.3	3.5
Short rainy, 2014	1008	9.7	49.4	2.6	0.1	1.9
Long rainy, 2014	1227	7.8	52.6	4.5	0.5	3.7
Age						
04–05	980	10.5	55.6	4.4	0.4	3.6
06–10	2129	9.6	53.3	3.9	0.2	2.8
11–15	978	5.8	44.6	2.2	0.2	2.0
Village						
Ekali	1052	7.9	52.8	2.6	0.4	2.3
Ekoko	209	6.2	53.1	6.2	0	4.3
Essazok	259	7.3	49.4	1.9	0.8	1.5
Koumou	419	12.2	47.7	2.6	0	2.1
Metet	213	7.5	51.2	1.9	0	1.9
Nkilzok	742	8.4	52.8	4.2	0.1	3.1
Nkolnda	1193	10.1	57.2	5.3	0.4	3.9

N, number of individuals screened; Pf, *P. falciparum*; Pm, *P. malariae*; Po, *P. ovale*; mixed, mixed species infections

the three smears was 13.1 for CB and 13.0 for VB within the trophozoite series, and 34.5 for CB and 27.4 for VB within the gametocyte set of data. Participants were pupils from 7 different primary schools, aged between 4 and 15 years. The median age of the participants was 8 years (IQR [6–10]) and 21% were >10 years old. Among the 137 individuals, 71 were males and 66 females (sex-ratio 0.92). The means of parasite densities in capillary and venous blood among asymptomatic infections are presented in Table 2.

The Krippendorff's alpha coefficient was 0.741, indicating good reliability among paired samples. Then further analysis does not distinguish the source of the blood, data from VB and CB were pooled ($n = 274$). Means of parasite densities varied from 38 to 112 for sexual stage and from 285 to 14,699 for asexual stages. The analysis revealed a positive correlation between the estimated densities of asexual and sexual parasites (Spearman's rank correlation = 0.162, $P = 0.007$; Figs. 1 and 2); the density of gametocytes increased as the density of asexual parasites does. Also, the mean parasite densities differed according to the village for both sexual and asexual stages (Fig. 1; Table 2).

Baseline characteristics used in the multivariate ordinal mixed model are presented in Additional file 3 for gametocyte and asexual stage data. Parasite densities were grouped in 3 different classes. For gametocyte data, class 0 corresponds to no gametocyte detected by microscopy. Indeed, at the day of blood collections, 4 (3%) volunteers had no more gametocytes neither in VB nor in CB, 3 (2%)

had gametocytes only in one of the VB slides and 4 (3%) only in one CB slide. Results from the CLMM model are summarized in Table 3. There was no effect of blood origin on parasite counts when age, sex and village were considered in the model, not only for gametocytes ($P = 0.98$) but also for trophozoites ($P = 0.47$) (Table 3). The “trophozoites” multivariate analysis showed a decrease of parasite densities with increasing age class: asexual densities were halved for the 6-10 years old ($P = 0.18$) and divided by 3.45 for the 11-15 years old ($P = 0.02$). A model including “village” as a fixed effect better explained the variation in the parasite densities than a null model without random effect. The significance of the random intercept “village” ($P = 0.002$) in the trophozoite model (Table 3) indicates different asexual densities between the villages.

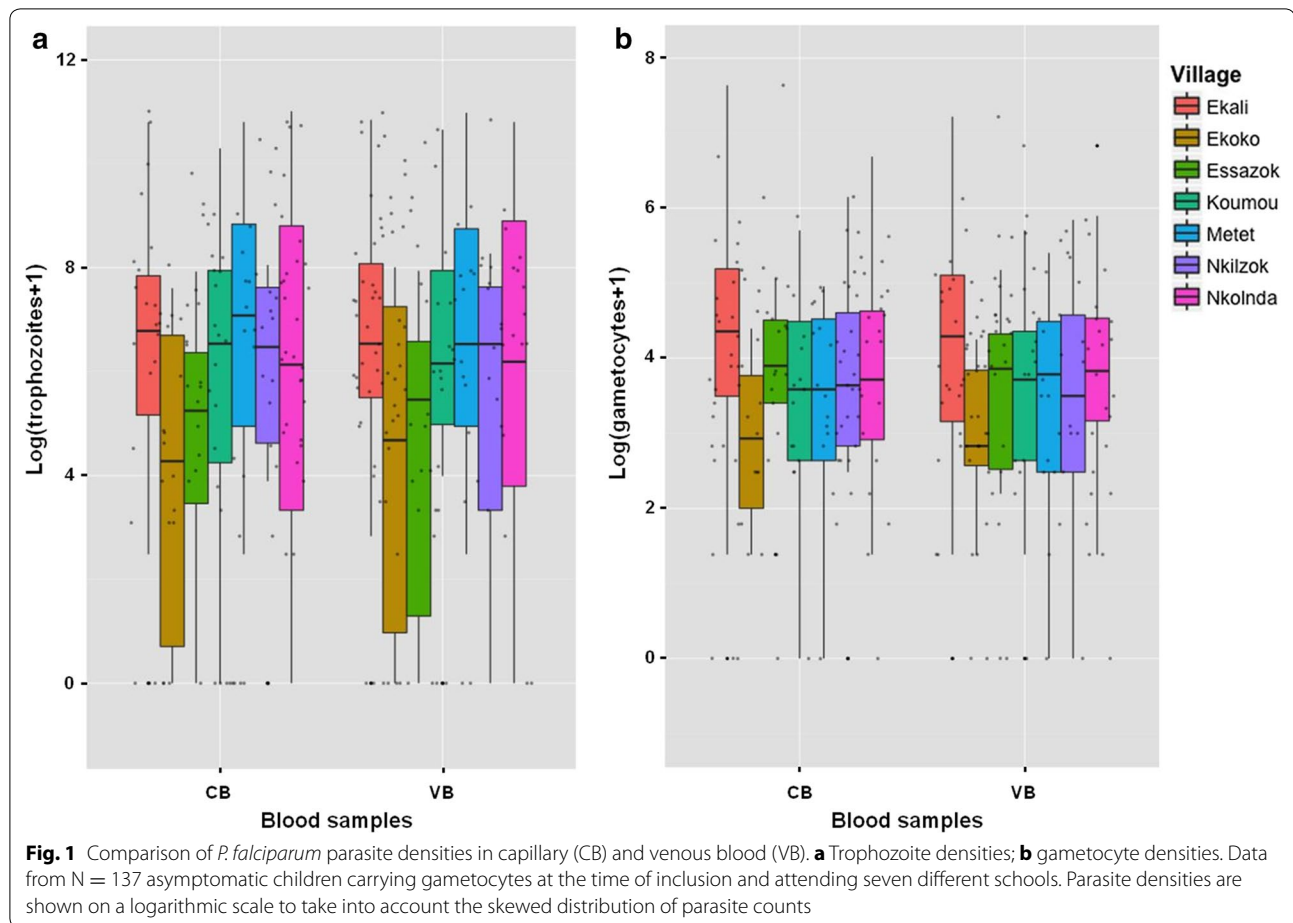
Gametocyte infectiousness for mosquitoes

Despite repeated efforts, DMFAs with capillary blood were not successful. Membrane feedings were performed using 150 μ l of capillary blood for 11 gametocyte donors. The too small amount of blood (400 μ l would be required to fill glass feeders) and the technical constraints to collect capillary blood (that coagulates rapidly) did not allow to obtain good results: only 3 assays produced oocysts, but in a small number of mosquitoes: 1 infected mosquito with 1 oocyst out of 25 dissected, 1 mosquito with 3 oocysts/32 dissected and 2 mosquitoes with 1 oocyst/18 dissected.

Prevalence of infection in the 11 experiments was >40% when using venous blood and DMFAs were stopped.

Table 2 Mean of parasite densities in capillary and venous blood among asymptomatic infections harbouring gametocytes at enrollment (N = 137)

	Capillary blood		Venous blood	
	Gametocyte mean [CI 95%]	Trophozoite mean [CI 95%]	Gametocyte mean [CI 95%]	Trophozoite mean [CI 95%]
Sex				
F	102 [65–236]	5023 [2982–8505]	86 [59–163]	5499 [3277–9194]
M	89 [66–129]	3429 [1817–6 993]	92 [68–139]	3626 [2099–7124]
Age				
04–05	58 [24–118]	10,590 [2061–27,549]	44 [22–85]	7839 [2338–18,672]
06–10	106 [76–190]	4392 [2814–7035]	97 [71–150]	5150 [3 359–8 196]
11–15	72 [50–106]	905 [467–2283]	82 [57–118]	1098 [565–2572]
Village				
Ekali	166 [98–401]	3478 [1678–8854]	141 [90–275]	4050 [2099–9951]
Ekoko	29 [11–57]	574 [101–1379]	30 [11–51]	972 [55–2236]
Essazok	65 [29–112]	653 [142–1954]	61 [28–123]	706 [155–1948]
Koumou	63 [43–94]	3449 [1743–6913]	62 [43–94]	4330 [2065–9074]
Metet	52 [31–78]	8089 [2678–18,980]	58 [35–94]	8626 [3110–20,302]
Nkilzok	75 [42–146]	961 [580–1436]	75 [42–130]	1184 [717–1774]
Nkolnda	110 [56–257]	9179 [3673–20,398]	113 [55–288]	8113 [3203–17,557]



Discussion

This study aimed to compare densities of gametocyte and asexual stages between capillary and venous blood, and to measure the infectiousness of gametocytes from the different blood sources for mosquitoes.

Unfortunately, it has not been possible to assess whether the source of infectious blood matters for the infectiousness to mosquitoes in DMFAs. Indeed, blood taken from finger pricks was coagulating during collection and the amount required for DMFAs (400 μ l) was too large. When using DMFAs to test transmission-blocking vaccine candidates or for the evaluation of transmission-blocking interventions, large numbers of mosquitoes, over 30 mosquitoes per batch, are required to measure the efficacy of different drugs or vaccines, most often at different concentrations, and it will not be possible to obtain the necessary blood amounts (>3 ml) per assay from finger pricks. The major advantage of using capillary blood over venous blood was to avoid venipuncture and any discomfort at the site of puncture. The question about gametocyte infectiousness remains open and further molecular analysis at transcriptomic

and proteomic levels may help deciphering whether biological differences exist between gametocytes according to the blood source. The DFMA using venous blood from naturally infected parasite donors and the SMFA that allows mosquito feedings with cultured gametocytes then remains the reference methods to assess the impact of novel transmission-blocking candidates on gametocyte infectivity.

In the present study, malaria parasite densities do not differ between capillary and venous blood in asymptomatic subjects for both gametocyte and trophozoite stages. Previous studies reported that blood films from capillary blood were more sensitive for the detection of asexual stages than that from venous blood [17, 18]. However, Njunda et al. [17] found that parasitaemia among symptomatic patients were not different between the two blood sources. Ouédraogo et al. [18] performed thin blood smears among asymptomatic subjects and found that parasite densities expressed as the number of parasitized red blood cells were higher in capillary blood. But the small sample size and the absence of blood smear replicates in their study suggest a low statistical power. In

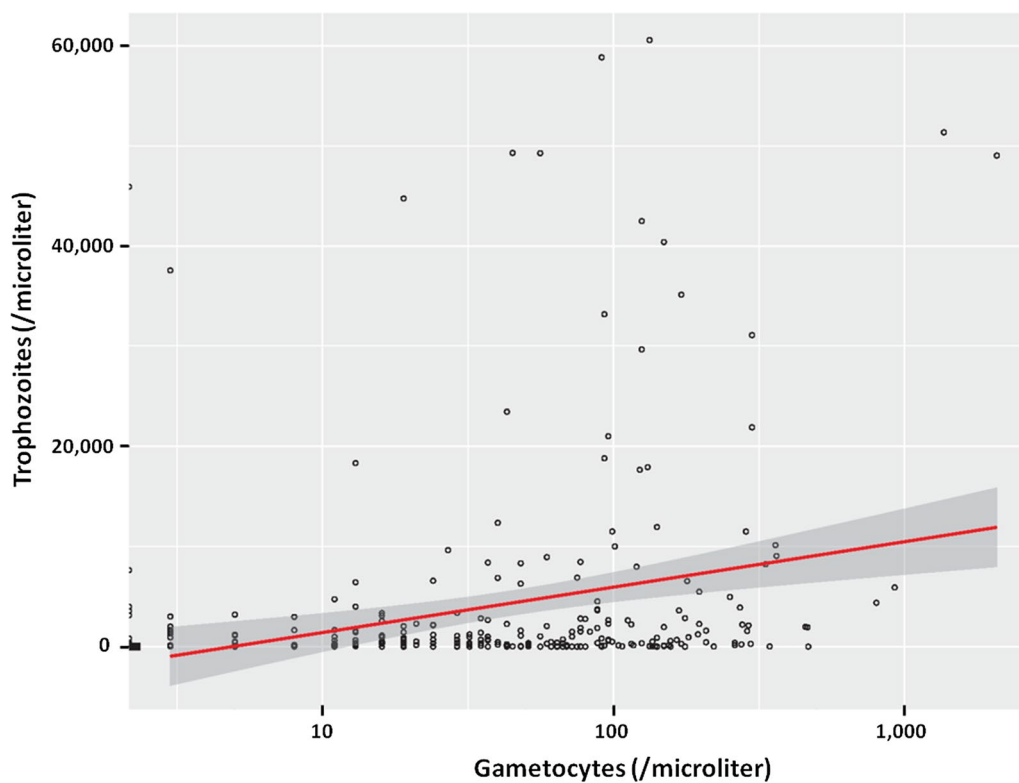


Fig. 2 Relationship between gametocyte and trophozoite densities. The *line* indicates the best linear model and the *shaded area* the 95% confidence interval

the present study, blood smears were performed in triplicates and the CLMM model controls the “village” variability, which provides a greater power to confirm there is no difference in parasite densities between the blood sources.

Interestingly, in this study, gametocyte densities were significantly associated with asexual stage parasitaemia. Previous studies reported contrasting results and the relationship between sexual and asexual parasite densities is heterogeneous, depending on the epidemiological setting, age, haematocrit and malaria status (symptomatic versus asymptomatic) [19–22]. Here, asexual parasite densities decreased with age, within the 4–15 age group, but no correlation was observed for age and gametocyte loads, which is in agreement with previous studies conducted in the vicinity of our studied area [23, 24]. Densities of *P. falciparum* asexual stage parasites varied between the screened schools, which is also suggested by significance ($P = 0.002$) of the random effect (village) in the trophozoite model (Table 3), and this result may reflect biting heterogeneity, even at small geographical scales. Variation in malaria exposure between villages exists, due to the proximity to larval breeding

sites, human behaviour or genetic factors, and it has led to the definition of hotspots of transmission [25–28].

Differences in gametocyte prevalence between the screened schools were observed, but not in the prevalence of *P. falciparum* asexual stages. This could result from a different malaria exposure in the different villages. Indeed, it has been previously reported that gametocyte carriage is higher in people exposed to lower mosquito infectious bites [29, 30]. Also, previous studies in symptomatic subjects reported higher gametocyte carriage in mixed-infections [31]. In this study, prevalence of gametocytes was not different in mixed-infections and in *P. falciparum* mono-infections and this can reflect either a different epidemiological setting or a different relationship in asymptomatic carriers.

Malaria parasite carriage was assessed among pupils from primary schools, one of the most vulnerable populations. A total of 55.1% of participants were infected by *P. falciparum*, a proportion similar to a previous study performed in 2005–2006 in the same area [32]. This result highlights the importance of the asymptomatic reservoir in this studied area and poses challenges to future disease control strategies. Malarial infections were detected by

Table 3 Analysis of blood origin effect on parasitemia measurement adjusted on age, sex and village

	Trophozoite class ^a			Gametocyte class ^b		
	Adjusted			Adjusted		
	P value	OR	CI 95% [2.5–97.5%]	P value	OR	CI 95% [2.5–97.5%]
Sex						
F		1			1	
M	0.31	1.33	[0.77–2.31]	0.98	0.99	[0.49–2.02]
Age ^c						
04–05		1			1	
06–10	0.18	0.52	[0.20–1.36]	0.21	2.22	[0.65–7.60]
11–15	0.02	0.29	[0.10–0.85]	0.08	3.54	[0.88–14.3]
Blood origin						
CB		1			1	
VB	0.47	1.23	[0.72–2.08]	0.98	1.01	[0.51–2.00]
Village random intercept	0.002			0.45		
Ekali		1.71	[1.05–2.79]		0.72	[0.26–1.19]
Ekoko		0.44	[0.17–1.10]		0.97	[0.54–1.74]
Essazok		0.54	[0.21–1.38]		0.98	[0.54–1.76]
Koumou		1.13	[0.67–1.90]		0.99	[0.62–1.59]
Metet		2.52	[1.34–4.74]		0.72	[0.43–1.23]
Nkilzok		0.52	[0.29–0.95]		0.93	[0.56–1.57]
Nkolnda		1.67	[0.86–3.25]		1.23	[0.73–2.06]

n total samples, venous and capillary blood pairs from 137 volunteers

^a Trophozoite class 0 = [0], class 1 = [1–5000], class 2 = [>5000]

^b Gametocyte class 0 = [0], class 1 = [1–250], class 2 = [>250]

^c Age at the time of inclusion

microscopic reading of thick blood smears. This method has theoretical detection limits of 4–10 parasites/μl and it obviously underestimates the real infection prevalence. Indeed, highly sensitive and specific PCR-based methods now permits a detection limit much lower than that of well-trained microscopists [33, 34]. However, molecular screening for parasites is particularly useful to detect submicroscopic infections in areas of low endemicity [22, 35]. In a setting of high malaria transmission intensity such as in our studied area, submicroscopic infections contribute less to mosquito transmission [36]. Nonetheless the development of reliable molecular methods for the specific detection of mature gametocytes would be helpful to the implementation of DMFAs at a larger scale in laboratories from malaria endemic areas.

Conclusion

This study was conducted to better understand the variability observed in DMFAs and investigated differences in the gametocyte concentration between microvasculature and vein. No significant differences in the gametocyte densities between capillary and venous blood was detected and this result suggests that the blood source, capillary or venous, should not interfere

with transmission efficiency in membrane feeding experiments.

Additional files

Additional file 1. Sample information and associated Plasmodium prevalence.

Additional file 2. Sample information, associated parasite densities and corresponding class.

Additional file 3: Table S1. Baseline characteristics at the parasite class level.

Authors' contributions

IM and AB conceived the concept of the project. MMS, ANB, MTT, LA, SEN and IM collected samples. MMS, ANB, MTT, LA performed the lab work. GT and IM carried out the data analysis. PHAA, DD, AB, GT, IM contributed reagents/materials/analysis tools. MMS and IM wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, BP288, Yaoundé, Cameroon. ² UMR MIVEGEC, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier Cedex, France. ³ Université de Douala, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, BP2701 Douala, Cameroon. ⁴ PATH Malaria Vaccine Initiative, Washington, DC 20001, USA. ⁵ Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS, UMR5282, Université de Toulouse III, BP 3028, 31024 Toulouse

Cedex 03, France. ⁶ Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, TSA 40031, 31059 Toulouse, France. ⁷ Centre d'épidémiologie et de santé publique des armées, 111 avenue de la Corse, BP40026, 13568 Marseille Cedex 02, France. ⁸ UMR 912-SESSTIM-INSERM/IRD, Université Aix-Marseille, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Acknowledgements

We are grateful to volunteers from Mfou primary schools and their parents or legal guardians for participating in this study, to the medical team from the Mfou Hospital for assistance in the field and to the technician staff from the IRD-OCEAC laboratory for *P. falciparum* infections and mosquito dissections. We thank Meribeth Morin (PATH) for critical reviewing of the manuscript. Funding was provided by PATH (Grant No. 303672).

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its Additional files 1 and 2.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All procedures involving human subjects used in this study were approved by the Cameroonian national ethics committee (statements 2013/02/031/L/CNERSH/SP, and 2014/04/440/CE/CNERSH/SP). Participants were enrolled upon signature of an informed consent by their parent or legal guardian.

Funding

This work was supported by funds from the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and PATH. MMS and GG were supported by fellowships from the IRD.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 August 2016 Accepted: 7 August 2017

Published online: 17 August 2017

References

- WHO. World malaria report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- Adio MB, Ndamukong KJ, Kimbi HK, Mbuh JV. Malaria and intestinal helminthiasis in school children of Kumba Urban Area, Cameroon. *East Afr Med J*. 2004;81:583–8.
- Tchinda MHV, Ponka R, Ndzi ES, Madocgne KA, Motsebo A, Tchinda MG, et al. Prevalence of malaria and soil-transmitted helminth infections and their association with undernutrition in schoolchildren residing in Mfou health district in Cameroon. *J Public Health Epidemiol*. 2012;4:253–60.
- World Health Organization. Malaria vaccine: WHO position paper, January 2016—recommendations. *Vaccine*. 2017. doi:10.1016/j.vaccine.2016.10.047.
- RTS, S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS, S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med*. 2014;11:e1001685.
- RTS, S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*. 2015;386:31–45.
- Birkett AJ. Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. *Vaccine*. 2016;34:2915–20.
- Sauerwein R, Bousema T. Transmission blocking malaria vaccines: assays and candidates in clinical development. *Vaccine*. 2015;33:7476–82.
- Miura K, Swihart BJ, Deng B, Zhou L, Pham TP, Diouf A, et al. Transmission-blocking activity is determined by transmission-reducing activity and number of control oocysts in *Plasmodium falciparum* standard membrane-feeding assay. *Vaccine*. 2016;34:4145–51.
- Bousema T, Churcher TS, Morlais I, Dinglasan RR. Can field-based mosquito feeding assays be used for evaluating transmission-blocking interventions? *Trends Parasitol*. 2013;29:53–9.
- Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS ONE*. 2012;7:e42821.
- 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.
- Krippendorff K. Content analysis: an introduction to its methodology, chapter 12. Beverly Hills: Sage; 1980.
- Agresti A. Categorical data analysis. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.
- Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2015. <http://www.R-project.org>.
- Christensen RHB. Ordinal—regression models for ordinal data. R package version 2015; 2015. p. 6–28.
- Njunda AL, Assob NJC, Nsagha SD, Kamga FHL, Mokenyu MD, Kwenti ET. Comparison of capillary and venous blood using blood film microscopy in the detection of malaria parasites: a hospital based study. *Sci J Microbiol*. 2013;2:89–94.
- Ouédraogo JB, Guiguemdé TR, Gbary AG. Etude comparative de la densité parasitaire de *Plasmodium falciparum* dans le sang capillaire et dans le sang veineux chez des porteurs asymptomatiques (Région de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso). *Médecine d'Afrique Noire*. 1991;38:8–9.
- Akim NI, Drakeley C, Kingo T, Simon B, Senkoro K, Sauerwein RW. Dynamics of *P. falciparum* gametocytemia in symptomatic patients in an area of intense perennial transmission in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63:199–203.
- Koepfli C, Nguiragool W, Hofmann NE, Robinson LJ, Ome-Kaius M, Sat-tabongkot J, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Sci Rep*. 2016;6:39183.
- Stepniewska K, Price RN, Sutherland CJ, Drakeley CJ, von Seidlein L, Nosten F, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. *Malar J*. 2008;7:249.
- Tadesse FG, van den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Tetteh K, Aseffa A, et al. The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J*. 2017;16:99.
- Paul RE, Bonnet S, Boudin C, Tchuinkam T, Robert V. Age-structured gametocyte allocation links immunity to epidemiology in malaria parasites. *Malar J*. 2007;6:123.
- van der Kolk M, Tebo AE, Nimpaye H, Ndongbol DN, Sauerwein RW, Eling WM. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:375–9.
- Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW, Smith DL, Churcher TS, Takken W, et al. Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination. *PLoS Med*. 2012;9:e1001165.
- Churcher TS, Trape JF, Cohuet A. Human-to-mosquito transmission efficiency increases as malaria is controlled. *Nat Commun*. 2015;6:6054.
- Hardy A, Mageni Z, Dongus S, Killeen G, Macklin MG, Majambare S, et al. Mapping hotspots of malaria transmission from pre-existing hydrology, geology and geomorphology data in the pre-elimination context of Zanzibar, United Republic of Tanzania. *Parasit Vectors*. 2015;8:41.
- Ndiath M, Faye B, Cisse B, Ndiaye JL, Gomis JF, Dia AT, Gaye O. Identifying malaria hotspots in Keur Soce health and demographic surveillance site in context of low transmission. *Malar J*. 2014;13:453.
- Bousema T, Sutherland CJ, Churcher TS, Mulder B, Gouagna LC, Riley EM, et al. Human immune responses that reduce the transmission of *Plasmodium falciparum* in African populations. *Int J Parasitol*. 2011;41:293–300.

30. Lawaly R, Konate L, Marrama L, Dia I, Diallo D, Diene Sarr F, et al. Impact of mosquito bites on asexual parasite density and gametocyte prevalence in asymptomatic chronic *Plasmodium falciparum* infections and correlation with IgE and IgG titers. *Infect Immun*. 2012;80:2240–6.
31. Bousema JT, Drakeley CJ, Mens PF, Arens T, Houben R, Omar SA, et al. Increased *Plasmodium falciparum* gametocyte production in mixed infections with *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:442–8.
32. Mendes AM, Schlegelmilch T, Cohuet A, Awono-Ambene P, De Iorio M, Fontenille D, et al. Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000069.
33. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Renia L, Day NP, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3303–9.
34. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes. *PLoS ONE*. 2013;8:e76316.
35. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2009;200:1509–17.
36. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouedraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun*. 2012;3:1237.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Chapitre 2 :

Résistance des moustiques vs virulence du parasite : Etude des interactions génétiques entre les moustiques résistants L3-5 (*Anopheles coluzzii*) et *Plasmodium falciparum* en conditions naturelles.

BAYIBEKI NGANO Albert^{1,2}, BOUR Cyril¹, JELLY Noémie¹, ABATE Luc³, MORLAIS Isabelle³, AWONO-AMBENE Parfait⁴, NSANGO Sandrine Evéline^{2,5}, BLANDIN Stéphanie¹

¹Université de Strasbourg, Inserm, CNRS UPR9022, IBMC, 15 rue René Descartes, BP 67084 Strasbourg, France

²CPC, BP 1274 Yaoundé, Cameroon

³IRD-MIVEGEC, UMR 224 IRD, 911 avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier, France

⁴OCEAC, BP 15665 Yaoundé-Cameroun

⁵Université de Douala, Université de Douala, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Douala, Cameroon

Résumé :

Les moustiques *An. coluzzii* sont des vecteurs du paludisme humain en Afrique sub-saharienne (Fontenille et *al.*, 2003). Ils s'infectent après une prise de repas de sang chez un l'hôte humain porteur de gamétocytes. Les études sur les interactions génétiques vecteur – parasite définissent la compétence vectorielle des moustiques à l'origine de la transmission du paludisme (Ndiath et *al.*, 2011 ; Fryxell et *al.*, 2012 ; Gnémé et *al.*, 2013 ; Boissière et *al.*, 2013). Elles permettent de mettre en évidence des gènes pro/antiparasitaires, dont *TEPI*, un gène polymorphique déterminant la résistance/sensibilité des moustiques *An. coluzzii* vis-à-vis de *P. berghei*, parasite de rongeur (Blandin et *al.*, 2009). Pour identifier les gènes pro/antiparasitaires impliqués dans les interactions *An. coluzzii* – *P. falciparum*, nous avons réalisé sur le terrain, à Mfou au Cameroun, des infections expérimentales avec des isolats naturels de *P. falciparum* chez les moustiques L3-5, sélectionnés pour leur résistance à *P. berghei*. Les moustiques Ngousso sont utilisés ici comme contrôle de l'infectivité des parasites. Les résultats observés montrent que la plupart des isolats de *P. falciparum* sont infectieux pour les moustiques L3-5, mais globalement dans une moindre mesure que pour les NG. Toutefois on observe une variabilité dans la virulence des parasites en fonction des isolats et dans le phénotype des L3-5 exposés à un isolat infectieux. Nous n'avons pas détecté de corrélation entre le génotype de *Pfs47* et l'infectiosité de l'isolat, ce qui suggère que d'autres facteurs déterminent la capacité des parasites à infecter les L3-5, porteurs de *TEPI*RI*, un allèle de *TEPI* lié à la résistance du moustique vis a vis de *P. berghei*.

Mots clés : *An. coluzzii*, *P. falciparum*, *TEPI*, Compétence vectorielle.

Introduction :

Les moustiques *An. coluzzii* sont des vecteurs du paludisme humain en Afrique sub-saharienne (Fryxell et al., 2012 ; Gnémé et al., 2013 ; Ndiath et al., 2011). Ils s'infectent après une prise de repas de sang chez un l'hôte humain porteur de gamétocytes. Ils montrent une grande sensibilité à l'infection à *P. falciparum* (Boissière et al., 2013). Et les interactions *Anopheles/Plasmodium* sont complexes et multifactorielles, dépendant parfois des facteurs inhérents à l'hôte humain (immunité naturelle bloquant la transmission), au vecteur (génotype, statut immunitaire) et même au parasite (densité gamétocytaire, MOI ou génotype) (Bousema et al., 2011 ; Frolet et al., 2006 ; Nsango et al., 2012 ; Morlais et al., 2015 ; Molina-Cruz et al., 2015). Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu entre le parasite et son vecteur, il est utile de mettre en place des modèles simplifiés afin de s'affranchir de certains paramètres pour en étudier d'autres. Ainsi, des modèles d'interaction moustique/parasite ont été mis en place avec des lignées de moustiques adaptées au laboratoire et relativement bien caractérisées, et le parasite murin *P. berghei* qui présente plusieurs avantages, notamment d'être non-infectieux pour l'homme et d'être sur le plan génétique facilement manipulable. Des expériences menées sur le terrain, avec des isolats naturels de *P. falciparum* collectés sur des porteurs de gamétocytes, sont ensuite mises en place afin de tester la transposition des résultats obtenus en condition de laboratoire aux conditions de terrain.

Pour nos expériences, la L3-5 est la souche test provenant de Gambie et maintenue en laboratoire depuis plus de 30 ans (Collins et al., 1986). Elle a été isolée pour sa résistance au parasite simien *P. cynomolgi*, et a également servi pour des études d'interactions avec les parasites murin *P. berghei* (Blandin et al., 2004 et 2009 ; Osta et al., 2004a et 2004b) et humain *P. falciparum* (Molina-cruz et al., 2012 ; Molina-cruz et al., 2013 ; Eldering et al., 2016). La souche NG du Cameroun est utilisée comme contrôle afin de vérifier l'infectiosité des isolats de parasites locaux sur le terrain. En effet, les caractéristiques mesurables chez les porteurs (i.e. parasitémie, gamétocytémie) ne sont pas des indicateurs complètement fiables de l'infectiosité des isolats, et la souche NG présente une grande sensibilité à l'infection à *P. falciparum* (Morlais, communication personnelle ; Harris et al., 2012).

La résistance des L3-5 et la sensibilité des NG aux infections à *P. berghei* et *P. falciparum* s'expliquent en partie par le polymorphisme du gène *TEPI* (Blandin et al., 2009, White et al., 2010). Les moustiques L3-5 sont homozygotes porteurs de l'allèle résistant *TEPI*RI*, alors qu'on retrouve chez NG deux allèles dits sensibles **SI* (15%) et **S2* (85%). Cependant, les moustiques L3-5 sont sensibles à certains isolats de *P. falciparum*, dont la lignée de laboratoire NF54. Ces parasites portent un allèle spécifique du gène *Pfs47* codant une protéine de surface qui leur permet d'éviter la réponse antiparasitaire dépendante de *TEPI* (Molina-Cruz et al., 2013 ; Rampuhl et al., 2014). Cependant,

Eldering et collaborateurs ont démontré que le polymorphisme de *Pfs47* dans des isolats naturels de *P. falciparum* ne corrèle pas avec le manque de sensibilité de certains isolats naturels de *P. falciparum* à *TEPI*, suggérant que d'autres mécanismes sont mis en jeu pour déterminer la compatibilité entre les moustiques et les parasites. Dans leur étude, Eldering et collaborateurs ont également exposé les L3-5 à deux lignées de *P. falciparum* en condition de laboratoire. NF165 présentait un génotype identique aux parasites virulents (GB4, 3D7) rapportés dans l'étude de Molina-Cruz et collaborateurs (Molina-Cruz et al., 2013) mais était majoritairement éliminés par mélanisation chez les L3-5, tandis que NF166 présentait un SNP similaire au parasite avirulent 7G8 mais était peu mélanisé et avait un meilleur taux d'infection. Nous avons décidé de tester la compétence vectorielle des L3-5 vs NG vis-à-vis d'isolats de terrain et de collecter des échantillons individuels de moustiques et de parasites afin de pouvoir rechercher des facteurs de résistance chez les L3-5 et de virulence chez *P. falciparum*. Nous avons dans un premier temps effectué une série d'enquêtes parasitologiques dans les localités prospectées pour la recherche des porteurs de gamétocytes.

Résultats :

I- Dépistage des porteurs de gamétocytes et diversité génétique des parasites :

Au total 6764 enfants de 4 à 15 ans ont été examinés (Figure 22 et Tableau 13), et la prévalence globale du paludisme (infection à *Plasmodium*) entre septembre 2013 et mars 2016 était de 58,35%. Les mono-infections à *P. falciparum* sont retrouvées chez 46,92% d'enfants (Tpf_mono-inf + Gpf_mono-inf) et 11,43% de l'effectif total sont porteurs d'infections mixtes à *P. falciparum*, *P. malariae* et/ou *P. ovale* (Figure 22 et Tableau 13). L'indice gaméocytaire (nombre de sujets porteurs de gamétocytes) observé chez les sujets uniquement infectés à *P. falciparum* (Gpf_mono-inf) est de 5.14% en moyenne sur toute la période d'étude. C'est dans ce groupe que nous avons déterminé les MOI des isolats de gamétocytes (Figure 23), et sélectionné les porteurs de gamétocytes enrôlés pour les infections expérimentales.

Dans le tableau 13, nous avons observé des variations de données parasitologiques au cours du temps, de 2013 à 2016 en fonction des saisons d'infections. On note une augmentation de la prévalence du paludisme à *P. falciparum*, avec de plus grandes proportions d'infections mixtes dans les dernières saisons. On relève aussi une diminution de moitié du nombre de porteurs de gamétocytes. Et sur la figure 23 on observe une réduction de la diversité génétique des isolats de gamétocytes (MOI), notamment lors des deux dernières saisons (Mars-Mai 2015 et Septembre 2015-Mars 2016) ; la plupart des infections étant constituées d'un seul génotype.

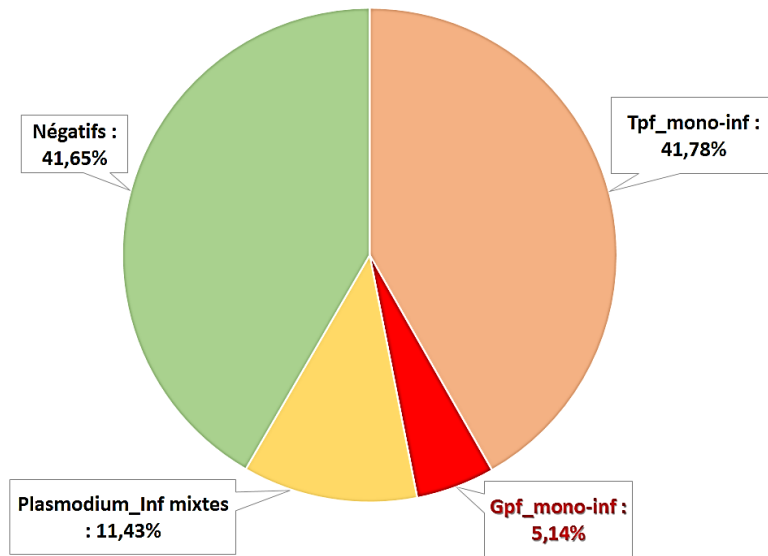


Figure 22 : Représentation des fréquences de portages des stades asexués et sexués de Plasmodium chez les enfants de 4 à 15 ans dans l'Arrondissement de Mfou de septembre 2013 à mars 2016.

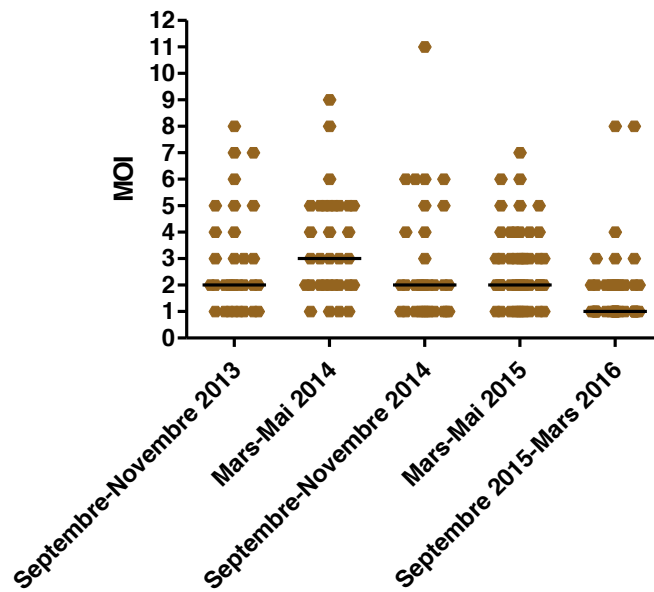


Figure 23 : Représentation graphique des MOIs d'isolats de gamécytes collectés sur le terrain en fonction des saisons d'infections.

Tableau 13 : Effectifs (N) et fréquence (F) d'enfants de 4 à 15 ans non-infectés et infectés porteurs des stades asexués et sexués de *Plasmodium* dans l'Arrondissement de Mfou de septembre 2013 à mars 2016.

Saisons d'infections	*Tpf_mono-inf		**Gpf_mono-inf		***Inf mixtes		Négatifs		Total
	N	F (%)	N	F (%)	N	F (%)	N	F (%)	
Septembre-Novembre 2013	462	42,54	81	7,46	54	4,97	489	45,03	1086
Mars-Mai 2014	417	41,37	96	9,52	27	2,68	468	46,43	1008
Septembre-Novembre 2014	546	44,50	93	7,58	60	4,89	528	43,03	1227
Mars-Mai 2015	648	44,35	47	3,22	201	13,76	565	38,67	1461
Septembre 2015-Mars 2016	753	37,99	31	1,56	431	21,75	767	38,70	1982
Total	2826	41,78	348	5,14	773	11,43	2817	41,65	6764

* : Trophozoïtes *P. falciparum*_mono-infections, ** : Gamétocytes *P. falciparum*_mono-infections, *** : Infections mixtes (*P. falciparum*, *P. malariae* et/ou *P. ovalae*).

II- Résistance/Sensibilité des moustiques L3-5 à l'infection à *P. falciparum* :

Afin de mesurer le degré de résistance des L3-5 à des isolats de terrain, nous avons réalisé deux saisons d'infections (Saison 1 : Expériences C233 à C276 ; Saison 2 : Expériences C382 à C425). Les profils d'infections en fonction des localités de provenance des isolats de parasites sont résumés sur la figure 24.

Au cours de la saison 1, les résultats obtenus (Figure 25) indiquent que la résistance des L3-5 (en termes de prévalence et niveaux d'infections) varie en fonction des isolats de *P. falciparum*. Pour la plupart des infections, les moustiques L3-5 ont des prévalences et niveaux d'infections inférieurs à ceux des NG (Figures 24, 25, 26 et 27). Cependant, sur 2 expériences (C241 et C270) les prévalences des L3-5 sont supérieures à celles des NG (Figure 25), et pour d'autres infections, les charges oocystiques chez les L3-5 infectés sont similaires (C233, C248, C270), supérieures (C271, C276) ou inférieures à celles des NG (C245) (Figures 24 et 27). Afin de comparer les génotypes des L3-5 infectés vs non-infectés, et les génotypes des isolats de parasites virulents vs avirulents chez les L3-5, nous avons envisagé, lors de la saison 2, de collecter individuellement : (1) les carcasses des moustiques après dissection de l'intestin, (2) les intestins disséqués porteurs d'oocystes, et (3) un filtrat des gamétocytes utilisés pour chaque infection.

Une difficulté s'est posée ; pour certaines expériences de la 2^e saison, nous avons détecté une contamination des L3-5 avec des NG. Nous avons dans un premier temps génotypé l'ensemble des L3-5 collectés pour *TEPI*. Sur 14 expériences, nous en avons éliminé deux (C413 et C414) pour lesquelles le taux de contamination était important. Pour les autres, un ensemble de 7 marqueurs additionnels, placés sur les différents bras des chromosomes du moustique et différenciant les L3-5 des NG ont été choisis à partir des données de séquençage du laboratoire. Ces marqueurs ont été utilisés pour génotyper les moustiques individuellement, ce qui nous a permis de « nettoyer » deux expériences pour lesquelles la contamination était faible (C409 et C412). Au total 12 expériences (C382 à C425) ont été retenues pour la 2^e saison (Figures 24 et 25). Là encore, les L3-5 sont globalement plus résistants que les NG (Figure 26), que ce soit au niveau de la prévalence (Figure 25) que de la charge parasitaire (Figure 27), avec cependant deux expériences où les niveaux d'infections (C400, C412) sont similaires chez les L3-5 et NG (Figures 24, 27).

Sur l'ensemble des expériences réalisées au cours des deux saisons, nous avons comparé les prévalences des L3-5 vs NG grâce à une méta-analyse binaire (Figure 25) qui montre que

les L3-5 s'infectent moins que les NG (prévalence, *p-value* < 0,0001). De même, comparant les niveaux d'infections, la méta-analyse continue (Figure 27) montre que les L3-5 ont globalement des charges oocystiques plus faibles que les NG (*p-value* < 0,0008).

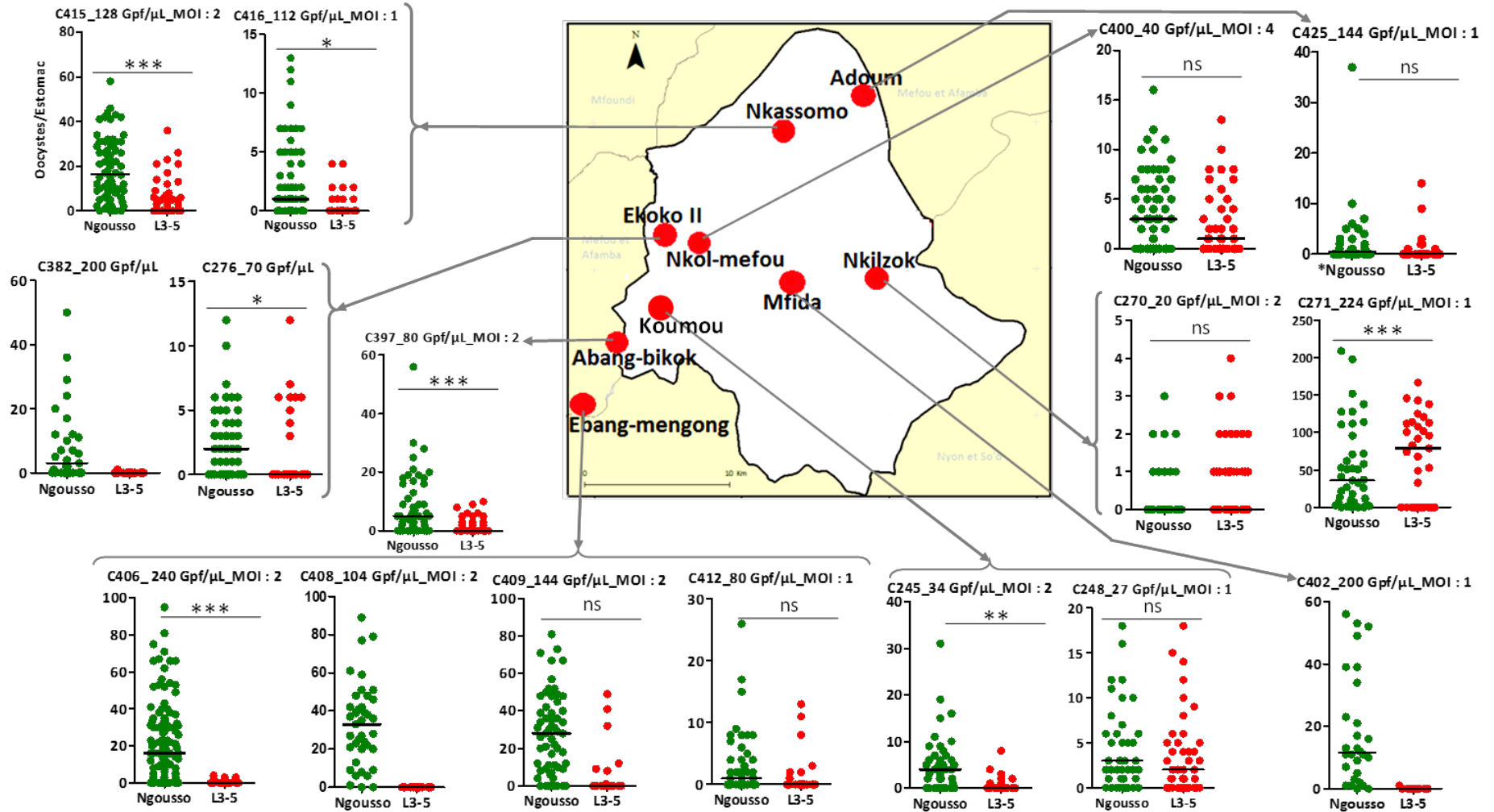


Figure 24 : Profils d'infections avec les isolats naturels de *P. falciparum* provenant de différentes localités. Les caractéristiques de l'isolat (gamétocytémie et MOI) sont indiquées pour chaque expérience. Chaque point vert et rouge indique le nombre de parasites chez les moustiques NG et L3-5 respectivement. Les barres horizontales à l'intérieur des nuages de points matérialisent la médiane pour chaque groupe. Pour chaque expérience, le nombre moyen d'ocystes par moustique infecté est comparé à l'aide du test t de student. La statistique du test est portée au-dessus des nuages de points. *** : p -value < 0,0001, ** : p -value > 0,001 et * : p -value > 0,01. La *Ngouso de l'expérience C425 est uniquement constituée des moustiques S1 sélectionnés à partir de la Ngouso d'origine.

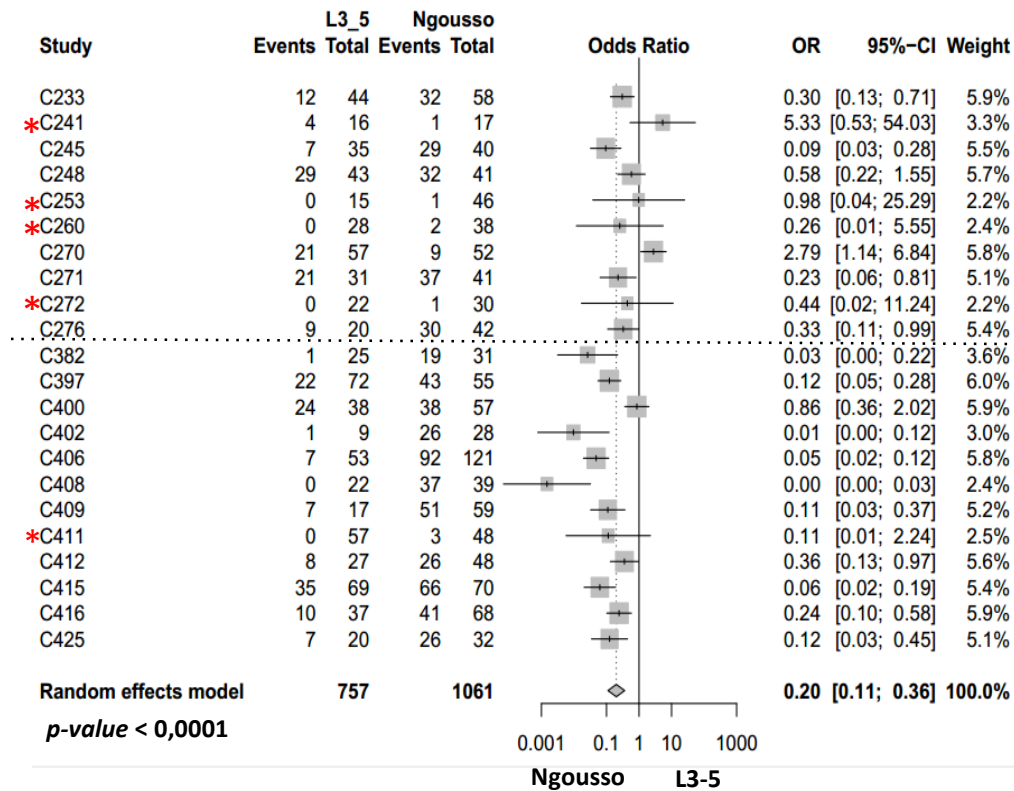


Figure 25 : Comparaison des prévalences chez L3-5 vs NG en fonction des expériences.
 * : Expériences avec de très faibles effectifs de moustiques infectés chez les Ngouso. **Events** : Nombre de moustiques infectés, **Total** : Nombre de moustiques disséqués, **OR** = Odds Ratio (Rapport de côtes), **CI** = Intervalle de Confiance. Les deux saisons sont séparées par une ligne en pointillés.

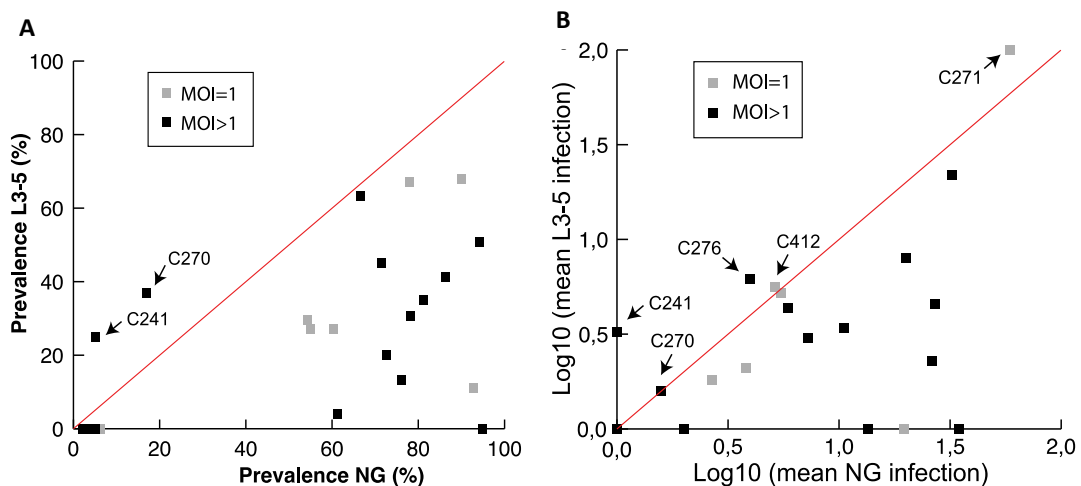


Figure 26 : Comparaison des prévalences (A) et des charges oocystiques (B) chez L3-5 (en ordonnées) et NG (en abscisses). Chaque carré correspond à une infection concomitante des deux lignées sur le même porteur. Les expériences ont de plus été séparées en fonction de la MOI (MOI = 1 et MOI > 1).

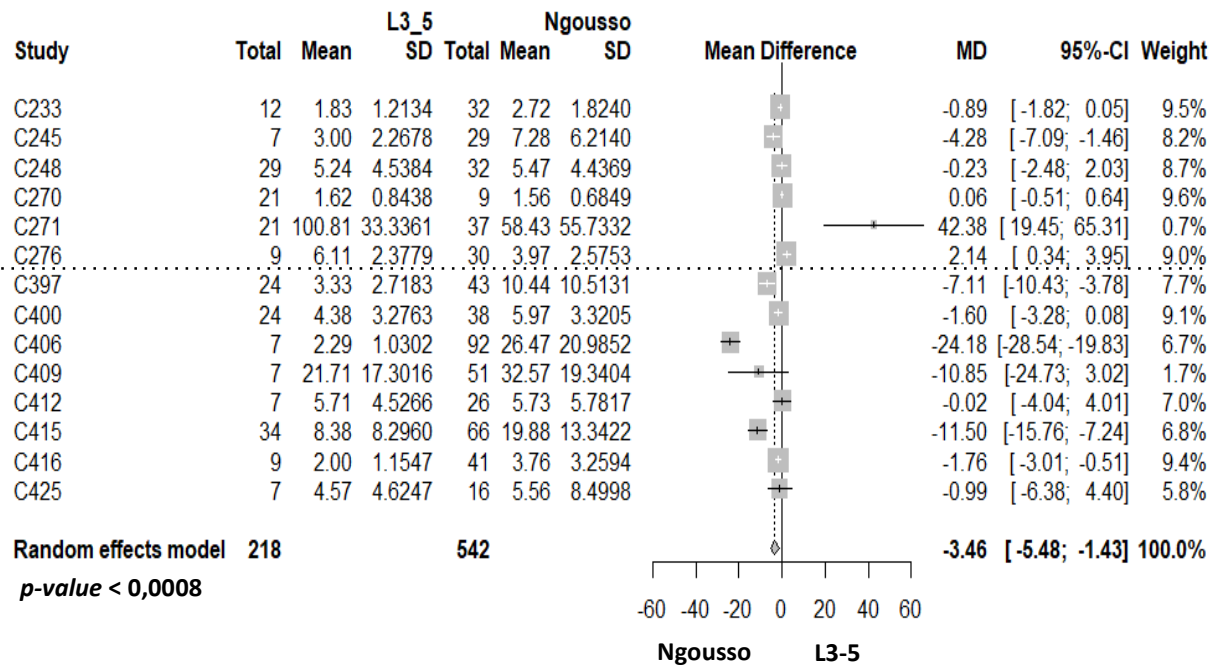


Figure 27 : Comparaison des nombres moyens d’oocystes chez les moustiques infectés L3-5 vs NG en fonction des expériences. Total= nombre de moustiques infectés, Mean = charge oocystique moyenne, SD : écart type, MD = différence des moyennes (Mean_L3-5 – Mean_NG), CI = intervalle de confiance. Les deux saisons sont séparées par une ligne en pointillés.

Quant aux charges oocystiques (Figure 28B, 28D), elles augmentent avec la gamétocytémie chez L3-5 et NG, même si elles restent dans la majeure partie des cas plus faibles chez L3-5 que chez NG.

Enfin, nous n’avons pas pu mettre en évidence de lien entre la MOI et la prévalence, les charges oocystiques moyennes des L3-5 et des NG ou les différences entre ces deux lignées (Figures 26 et 28).

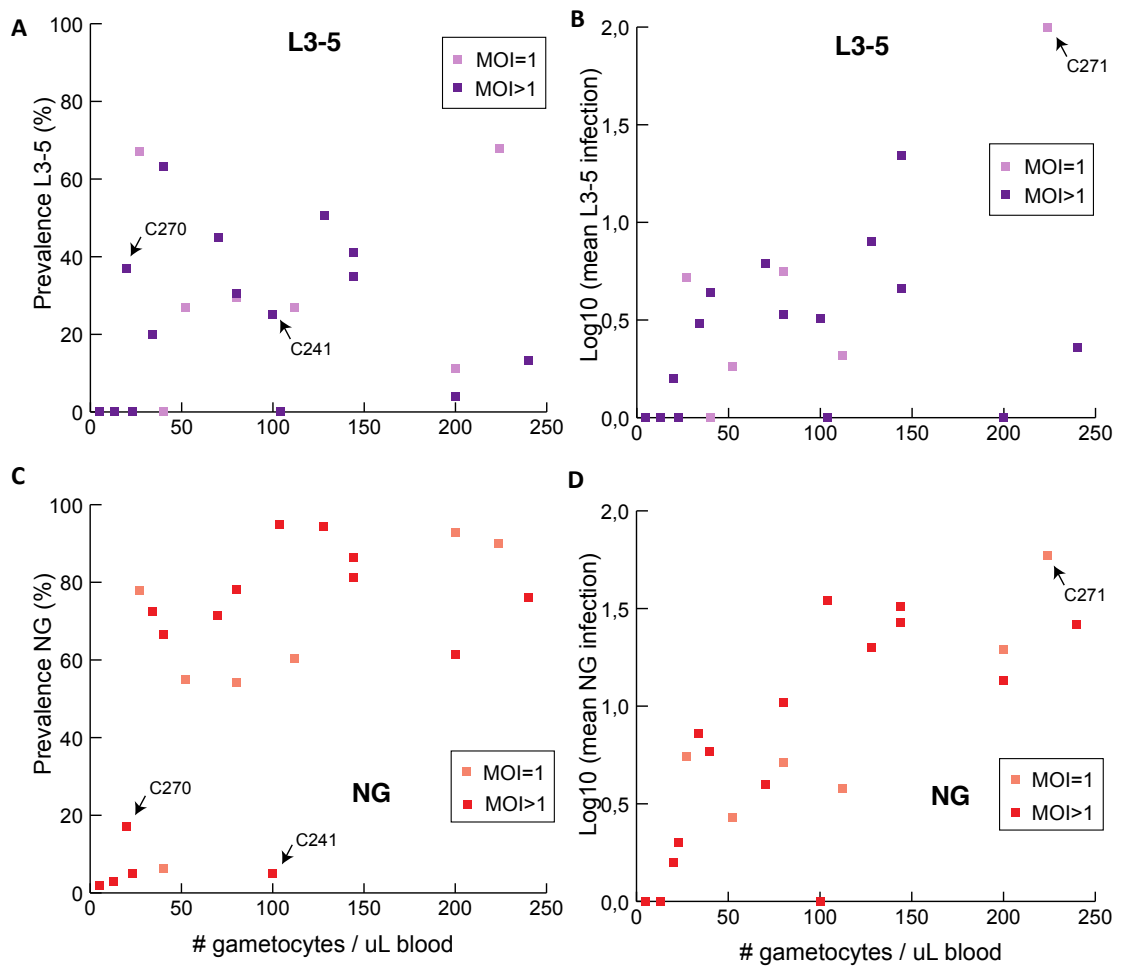


Figure 28 : Prévalences (A, C) et charges oocystiques (B, D) des L3-5 (A, B) et des NG (C, D) en fonction de la gamétocytémie du porteur. Chaque carré correspond à une infection concomitante des deux lignées sur le même porteur. Les expériences ont de plus été séparées en fonction de la MOI.

Rappelons ici que les moustiques L3-5 sont résistants vis-à-vis du parasite murin *P. berghei*. Les infections avec ce parasite se font avec une souche *Pb-ANKA* produisant une densité très forte de gamétocytes, générant ainsi des niveaux d'infections très forts chez les souches de moustiques sensibles (prévalence proche de 100% et charge parasitaire ~100 oocystes/moustique chez les G3 par exemple). Afin de vérifier si les L3-5 sont sensibles à *P. berghei* lorsqu'ils sont exposés à des gamétocytémies plus faibles, nous avons infecté des L3-5 et des contrôles G3 sur des souris quotidiennement, entre 1 et 4 jours post-passage. Dans ce modèle expérimental, les parasitémies/gamétocytémies des souris augmentent chaque jour. Elles sont sub-optimales aux jours 1 et 2 et le maximum des infections est obtenu aux jours 3 et 4. Nos résultats montrent que les G3 s'infectent (prévalence : 80-100%) quel que soit la gamétocytémie de la souris (de 0,12 à 4,5%), et que dans cette lignée les charges oocystiques (8-153 oocystes/moustique en moyenne) augmentent avec la parasitémie (Figure 29). Par contre, les L3-5 restent résistants à *P. berghei* quel que soit la gamétocytémie de la souris.

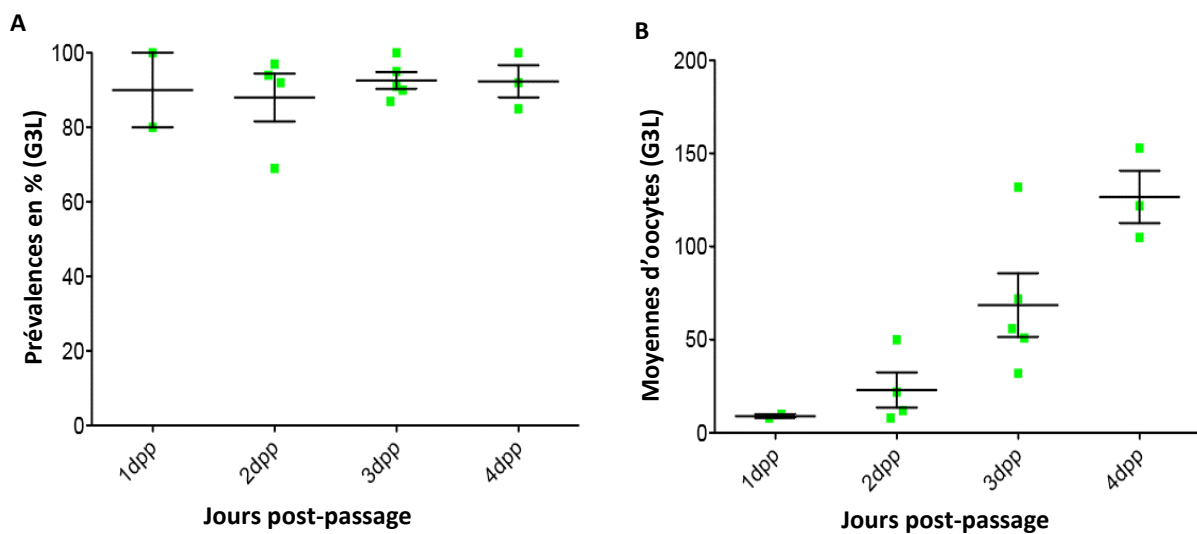


Figure 29 : Prévalences (A) et charges oocystiques (B) lors d'infections avec *P. berghei* (*Pb-GOMOI4*) chez la souche de moustiques G3, en fonction de la gamétocytémie. 4 expériences indépendantes, les temps extrêmes (1 jour et 4 jours post passage) n'ont été testés que 2 ou 3 fois.

Polymorphisme de *Pfs47* et infections chez L3-5 vs Ngouso :

Pour examiner si le polymorphisme de *Pfs47* détermine la virulence de *P. falciparum* vis-à-vis des L3-5 en condition naturelle de transmission comme il a été démontré en condition de laboratoire (Molina-cruz et al., 2013), nous avons séquencé le gène *Pfs47* des différents isolats qui ont été utilisés pour infecter les L3-5 et les NG. Pour ce faire, la séquence codante

complète de *Pfs47* a été amplifiée par PCR à partir des ADN génomiques extraits des filtrats de gamétocytes, puis séquencée. Les séquences obtenues ont été alignées en comparaison avec celles des isolats de laboratoire GB4 et 7G8 considérées respectivement comme virulente et avirulente (Molina-cruz et al., 2012 ; Molina-cruz et al., 2013). Nous avons réussi à amplifier *Pfs47* pour 7 des isolats (C397, C400, C402, C406, C408, C415, et C416). Pour les autres, la PCR n'a pas permis l'amplification de la séquence cible. Les 4 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) identifiés comme déterminants la virulence de GB4 et l'avirulence de 7G8 sont localisées aux positions 707, 725, 740 et 742 du locus *Pfs47* (Figure 30).

Notons dans un premier temps que 4 des 7 isolats séquencés sont constitués d'au moins 2 génotypes de parasites portant des allèles différents de *Pfs47*. Au regard des séquences obtenues, les positions 707, 725 et 740 ne sont pas variables dans nos isolats de terrain et sont de type virulent (Figure 30). La position 742 est variable ; elle est de type avirulent pour 4 isolats (C400, C406, C408, C416), variable pour les isolats C397 et C415 (MOI=2 pour chacun), et de type virulent pour C402. Aucune corrélation claire n'a pu être établie entre le génotype des isolats pour *Pfs47* à la position 742 et leur capacité à infecter les L3-5 (Figure 31). Nous avons de plus mis en évidence 3 positions variables supplémentaires par rapport aux 4 décrites plus haut : 657, 814, 815. Vu la diversité des génotypes auxquels ont été exposés les moustiques et le nombre restreint d'expériences, il est difficile de mettre en évidence des corrélations spécifiques. Notons cependant que (1) les isolats C397 et C415 ont le même génotype pour *Pfs47* et les infections qui en résultent sont assez similaires (Figures 24 et 30), et (2) l'isolat C402 a exactement le même génotype que la lignée virulente GB4 mais la prévalence des L3-5 qui ont été exposés au parasite est très basse (11% vs 93% pour les NG). Nos résultats suggèrent que le polymorphisme de *Pfs47* ne contrôle pas à lui seul la capacité de *P. falciparum* à infecter les L3-5.

Carriers	657	707	725	740	742	814	815
GB4 (Virulent)	G	C	C	T	A	A	A
7G8 (Non-virulent)	G	T	T	C	T	A	A
C416	A	C	C	T	T	T	A
C400	A/G	C	C	T	T	T	A
C406	A/G	C	C	T	T	T/A	A/T
C408	G	C	C	T	T	A	T
C415	G	C	C	T	A/T	A/T	A
C397	G	C	C	T	A/T	A/T	A
C402	G	C	C	T	A	A	A

Figure 30 : Polymorphisme de *Pfs47* chez les isolats naturels de *P. falciparum*. La première colonne à l'extrémité gauche représente les isolats de parasites, et la première ligne au-dessus représente les positions des SNPs sur la séquence amplifiée.

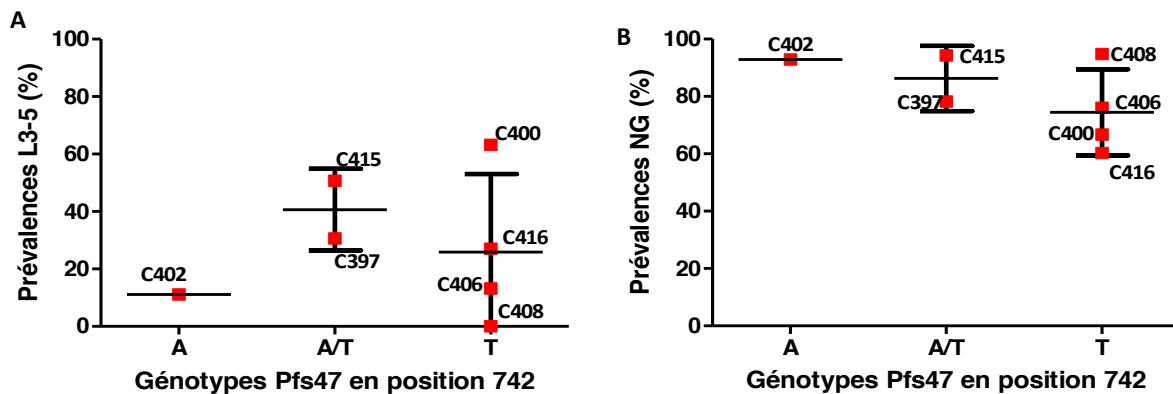


Figure 31 : Représentation des prévalences d'infections à *P. falciparum* chez L3-5 (A) et NG (B) en fonction des génotypes *Pfs47* en position 742. Chaque carré correspond à une prévalence avec l'isolat de parasite correspondant. Les barres horizontales représentent les moyennes avec les écarts types.

Discussion :

Nos travaux montrent que les L3-5 sont sensibles à la plupart des isolats naturels de *P. falciparum*. Cependant la prévalence et le niveau d'infection des L3-5 sont généralement moindre que ceux des NG, ce qui suggère que les L3-5 restent plus résistants que leurs congénères, possiblement et vraisemblablement pas seulement, grâce à l'allèle *TEPI*RI* qu'ils portent.

Les résultats obtenus ne permettent pas d'observer de corrélation entre la résistance/sensibilité des moustiques avec la MOI (*Multiplicity Of Infection*) qui représente le nombre de clones de parasite par isolat. Or en conditions naturelles de transmission il est prouvé que le phénotype antiparasitaire de *TEPI* n'est observable que pour les infections monoclonales et dans une certaine mesure biclonales (Nsango et al., 2012). Cette étude a été réalisée dans les mêmes localités que la nôtre, sauf qu'elles portaient sur plusieurs saisons d'infections expérimentales. Dans notre étude nous ne disposons pas assez d'expériences pour rechercher l'effet de la MOI sur la résistance/sensibilité des L3-5 vs NG, et lors de la saison 2 (De septembre 2015 à mars 2016) les infections réalisées étaient essentiellement mono et biclonales ; la moitié des porteurs retrouvés étaient monoclonaux et en général plus des $\frac{3}{4}$ avaient des parasites sexués mono/biclonaux (Figure 23). La récurrence des infections mono et biclonales pourrait être due à un goulot d'étranglement au sein des populations naturelles de parasites, qui aurait réduit le portage polyclonal de gamétocytes chez les enfants asymptomatiques. Car la plupart des infections de la saison 2 ont été faites entre janvier et février 2016, période de saison sèche au cours de laquelle on note une baisse importante de la transmission du paludisme du fait de l'assèchement des gîtes larvaires et la diminution du taux d'inoculation entomologique (Mouchet et al., 2004). D'autres facteurs non-encore maîtrisés pourraient mieux expliquer la réduction de cette diversité génétique des parasites de septembre 2015 à mars 2016, ceci d'autant plus que le nombre de porteurs de gamétocytes retrouvé en 2015 dans les localités prospectées a réduit de moitié par rapport à 2013 et 2014 (Tableau 13). Par ailleurs, on observe que la prévalence et le niveau d'infection chez L3-5 et NG sont en partie corrélés à la gamétocytémie du porteur (effet de seuil pour la prévalence, et proportionnalité pour les niveaux d'infection). Ces données ont aussi été reportées quelques années plus tôt dans les mêmes localités (Mendes et al., 2011 ; Morlais et al., 2015), et dans d'autres faciès épidémiologiques, en Afrique de l'Ouest (Da et al., 2015).

Les données de notre étude rapportent que bien qu'il existe des isolats peu ou non-infectants chez L3-5 (C382, C402, C406, C408) d'autres parviennent à former des oocystes (C245, C248, C270, C271, C276, C397, C400, C409, C412, C415, C416, C425) (Figure 24). Nous observons dans notre étude que dans une même localité (Exemple : Ebang-mengong) les parasites C406 et C408 sont presque ou totalement éliminés chez L3-5 alors que C409 et C412 parviennent à former des oocystes à des quantités similaires aux NG. Ces phénotypes sont aussi observés dans les localités voisines d'Abang-bikok, Ekoko II, Koumou et Mfida entre C397, C382, C276, C245, C248 et C402 (Figure 24). Ces différences pourraient être liées aux flux migratoires existant entre les populations humaines et les clones parasitaires dans ces localités. Dans notre étude nous n'avons pas observé de parasites mélanisés sur toutes les expériences réalisées, mais les travaux de White et collaborateurs (2010), utilisant la souche ND37 de *P. falciparum*, ainsi que ceux de Molina-cruz et *al.*, 2012 montrent des parasites mélanisés chez L3-5, bien qu'ils révèlent aussi que 3D7 et GB4 sont très peu ou pas mélanisés. Le fait que certains isolats de *P. falciparum* soient infectieux pour les L3-5 pourrait s'expliquer par une co-adaptation du vecteur avec son parasite naturel *P. falciparum* (Cohuet et *al.*, 2006 ; Molina-cruz et *al.*, 2017), et suggère que les facteurs génétiques du parasite peuvent déterminer la virulence des ookinètes lors de la traversée de l'épithélium intestinal. En effet, celui-ci a mis en place des stratégies afin d'échapper à la réponse immunitaire, et notamment Pfs47 qui permet de limiter la réponse antiparasitaire du moustique (Molina-Cruz et *al.*, 2013 ; Ramphul et *al.*, 2014).

Les observations faites dans notre étude indiquent que le polymorphisme de *Pfs47* n'explique pas la virulence des isolats naturels de *P. falciparum*, contrairement aux travaux présentés par les travaux de Molina-cruz et collaborateurs (2013) qui révèlent que *Pfs47* exprimée à la surface des ookinètes de *P. falciparum* est une protéine à l'origine de la suppression du phénomène de nitration induit par les enzymes HPX2 et NOX5 lors de la traversée de l'épithélium intestinal par le parasite. Et nous savons que ce phénomène de nitration affecte la mobilité du parasite et précède l'activité cytotyrique du complexe TEP1cut/LRIM1/APL1C (Oliveira et *al.*, 2012) contre *P. berghei*. D'autres observations suggèrent que certains haplotypes *Pfs47* n'ont un rôle protecteur pour le parasite que dans un contexte de coévolution dans les interactions *Anopheles/Plasmodium* en condition de sympatrie et non d'allopatric (Molina-Cruz et Barillas-Mury, 2014 ; Molina-Cruz et *al.*, 2015). Mais récemment, les travaux d'Eldering et collaborateurs (2016) ont confirmé nos observations en montrant que le polymorphisme de *Pfs47* n'est pas le seul déterminant de l'évasion de certains

isolats de parasites à la réponse immunitaire chez *An. gambiae*. D'autres facteurs encore non identifiés pourraient davantage élucider la complexité de ces interactions en conditions naturelles de transmission.

A noter, les isolats de *P. falciparum* que nous avons prélevés proviennent de la région de Mfou au Cameroun, où l'allèle *TEPI*RI* est quasi absent. Ceci aurait pu laisser penser que les isolats, n'ayant pas été en contact avec cet allèle de résistance auparavant et n'ayant ainsi pas pu développer de stratégies d'échappement, seraient pour la plupart peu/pas infectieux vis à vis des moustiques L3-5 porteurs de *TEPI*RI*. Au contraire, la plupart des isolats étaient infectieux chez les L3-5 et nous avons observé une large palette de phénotypes en fonction des porteurs, allant de l'extrêmement infectieux (e.g. C271) à non-infectieux (e.g. C402 malgré une gamétocytémie similaire à C271, ou bien C408 malgré une infectiosité chez les NG similaire à celle de C271). Ces résultats et le fait que le knockdown de *TEPI* n'induit pas un phénotype fort lors d'infections avec *P. falciparum* (Nsango et al., 2012; Eldering et al., 2016) suggèrent que le locus *TEPI*, et l'allèle *TEPI*RI*, n'exercent pas une pression de sélection importante sur *P. falciparum*, possiblement parce que ce parasite a mis en place des stratégies d'échappement à la réponse antiparasitaire du moustique. Il serait toutefois intéressant compléter notre étude en exposant les L3-5 à des isolats prélevés dans des régions où la fréquence allélique de *TEPI*RI* est élevée (e.g. Mali) et où le parasite a pu s'adapter à cet allèle résistant afin de confirmer ce point. En effet, si au contraire, la pression de sélection exercée par ce locus est élevée, on s'attendrait à ce que l'ensemble des isolats infectieux pour les NG le soient aussi pour les L3-5. Il serait dans ce cas intéressant de comparer les génotypes des isolats prélevés dans des régions où l'allèle *TEPI*RI* est fréquent et où il est quasi absent.

Avec les échantillons collectés individuellement dans l'étude que nous avons menée, il sera intéressant de : (1) comparer par séquençage les génotypes des L3-5 très infectés vs non-infectés pour certaines expériences avec des isolats infectieux en suivant une approche GWAS, actuellement en cours, (2) comparer les génotypes des gamétocytes infectieux vs non infectieux pour les L3-5, et si possible (3) comparer des génotypes des isolats de gamétocytes infectieux à ceux des parasites qui se sont développés dans les L3-5 et chez les NG (approche par Selective Whole Genome Amplification en développement au *Sanger institut*, collaboration avec l'équipe de Mara Lawniczak).

Conclusion :

Il ressort de notre étude que la résistance des moustiques L3-5 varie en fonction des isolats de *P. falciparum* retrouvés dans les localités de l'Arrondissement de Mfou. Outre la gamétoctémie qui impacte de façon claire la prévalence chez les NG (effet de seuil) et dans une moindre mesure chez les L3-5, et le niveau d'infection chez les deux lignées (proportionnel à la gamétoctémie, nos résultats montrent que certains isolats sont plus virulents que d'autres chez les moustiques L3-5. Nous n'avons pas pu identifier de corrélation entre le polymorphisme de *Pfs47* et l'infectiosité des isolats de parasites. Nous avons collecté un ensemble de plusieurs milliers d'échantillons qui nous permettra, grâce aux séquençages et études d'associations, de trouver des gènes candidats impliqués dans la résistance/sensibilité chez les moustiques contre *P. falciparum*, et dans l'infectiosité du parasite.

Références Bibliographiques :

- Blandin S., Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, Levashina E.A. (2004). Complement-Like Protein TEP1 is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell* ; 116, 661–670.
- Blandin S. A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E. A., Steinmetz L. M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science*, 326(5949):147-150.
- Boissiere A., Gimonneau G., Tchioffo M.T., Abate L., Bayibéki A., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Morlais I. (2013). Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. *PLoS One* 8(1): e54820.
- Bousema Teun, Rhoel R. Dinglasan, Isabelle Morlais, Louis C. Gouagna, Travis van Warmerdam, Parfait H. Awono-Ambene et al. (2012). Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected Plasmodium falciparum Gametocyte Carriers. *PLoS One* 7(8): e42821.
- Cohuet A., Osta M.A., Morlais I., Awono-Ambene P.H., Michel K., Simard F., Christophides G.K., Fontenille D. and Kafatos F.C. (2006). Anopheles and Plasmodium : from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285-9.
- Collins F.H., Sakai R.K., Vernick K.D., Paskewitz S., Seeley D.C., Miller L.H., et al. (1986). Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*. 1986;234:607–10.
- Da D.F., Churcher T.S., Yerbanga R.S., Yaméogo B., Sangaré I., Ouedraogo J.B., Sinden R.E., Blagborough A.M., Cohuet A. (2015). Experimental study of the relationship between Plasmodium gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Exp Parasitol.*;149:74-83.
- 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.
- Eldering M., Morlais I., van Gemert G.J., Van de Vegte-Bolmer M., Graumans W., Siebelink-Stoter R., Vos M., Abate L., Roeffen W., Bousema T., Levashina E.A., Sauerwein R.W. (2016). Variation in susceptibility of African Plasmodium falciparum malaria parasites to TEP1 mediated killing in Anopheles gambiae mosquitoes. *Scientific Reports* ; 6:20440.
- Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W., Hoffmann J.A., Blandin S.A., Levashina E.A. (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of Plasmodium. *Cell Host Microbe.* ; 5(3):273-84.
- Frolet C., Thomas M., Blandin M., Hoffman J., and Levashina E. (2006). Boosting *NF-kB*-Dependent Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghi*. *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg; France. Immunology* ; 25, 677-685.
- Fryxell R., Nieman C., Fofana A., Lee Y., Traoré S., Cornel C., Luckhart S., Lanzaro G. (2012). Differential *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles gambiae s.s.* molecular and chromosomal forms in Mali. *Malaria Journal* 2012, 11: 133.

- Gnémé Awa, Wamdaogo M Guelbéogo, Michelle M Riehle, Antoine Sanou, Alphonse Traoré, Soumanaba Zongo, Karin Eiglmeier, Gustave B Kabré, N'Falé Sagnon, and Kenneth D Vernick (2013). Equivalent susceptibility of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *Anopheles arabiensis* to *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *Malaria Journal* 2013; 12: 204
- Garver L.S., Dong Y. and Dimopoulos G. (2009). Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse Anopheline Species. *PLoS Pathogens* ; 5, e1000335.
- Garver L.S., Bahia A.C., Das S., Souza-Neto J.A., Shiao J., Dong Y., Dimopoulos G. (2012). Anopheles Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-Plasmodium action. *PLoS Pathog.* ; 8(6):e1002737.
- 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(1):e30849.
- Kwon H., Arends B.R., Smith R.C. (2017). Late-phase immune responses limiting oocyst survival are independent of TEP1 function yet display strain specific differences in *Anopheles gambiae*. *Parasit Vectors.* ; 10(1):369.
- 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.* ; 4708–4715.
- Mitri C., Jacques J.C., Thiery I., Riehle M.M., Xu J., Bischoff E., Morlais I., Nsango S.E., Vernick K.D. and Bourgouin, C. (2009). Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. *PLoS Pathog* ; 5, e1000576.
- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2017). Plasmodium P47 : A key gene for malaria transmission by mosquito vectors. *Curr Opin Microbiol.* ; 40:168-174.
- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Kamath N., Pavlovic N.V., Mu J., Ramphul U.N., Ramirez J.L., Barillas-Mury C. (2015). Plasmodium evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(49):15178-83.
- Molina-Cruz A., Garver L.S., Alabaster A., Bangiolo L., Haile A., Winikor J., Ortega C., Van Schaijk B.C., Sauerwein R.W., Taylor-Salmon E., Barillas-Mury C. (2013). The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science* ; 1235264.
- Molina-Cruz Alvaro, Randall J. DeJong, Corrie Ortega, Ashley Haile, Ekua Abban, Janneth Rodrigues, Giovanna Jaramillo-Gutierrez, and Carolina Barillas-Mury (2012). Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PNAS* ; 10.1073.
- Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. (2014). The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 109(5):662-7. Review.
- Morlais I., Nsango S.E., Toussile W., Abate L., Annan Z., Tchioffo M.T., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Fontenille D., Rousset F., Berry A. (2015). *Plasmodium falciparum* mating patterns and mosquito infectivity of natural isolates of gametocytes. *PLoS One.* ; 10(4):e0123777.

Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin. S., Lenoble R. D. Sircoulon J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *Editions John Libbey Eurotext. Paris.* 428p.

Ndiath MO, 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.

Nsango S.E., Luc Abate L., Thoma M., Pompon J., Malou Fraiture M., Rademacher A., Berry A., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A., Morlais I. (2012). Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International Journal for Parasitology.* ; 42 (6): 589-95.

Oliveira Giselle de Almeida, Joshua Lieberman, and Carolina Barillas-Mury (2012). Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. *Science.* ; 335(6070): 856–859.

Osta M.A., Christophides G.K., Kafatos F.C. (2004b). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science.* ; 303(5666):2030-2.

Osta M.A., Christophides G.K., Vlachou D., Kafatos F.C. (2004a). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae* : comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* ; 207(Pt 15):2551-63. Review.

Povelones M., Osta M.A., Christophides G.K. (2016). The Complement System of Malaria Vector Mosquitoes. *Advances in Insect Physiology* ; 2016.06.001. Review

Povelones M., Waterhouse R.M., Kafatos F.C. and Christophides G.K. (2009). Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science* ; 324, 258-61.

Ramphul U.N., Garver L.S., Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2015). *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(5):1273-80.

White Bradley J., Mara K.N. Lawniczak, Changde Cheng, Mamadou B. Coulibaly, Michael D. Wilson, N’Fale Sagnon, Carlo Costantini, Frederic Simard, George K. Christophides, and Nora J. Besansky (2010). Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *PNAS* ; 1013648108.

Chapitre 3 :

Les facteurs déterminant la compétence vectorielle des moustiques sont-ils conservés indépendamment des espèces de parasites ?

BAYIBEKI NGANO Albert^{1,2}, STAUB Marie¹, MORLAIS Isabelle³, AWONO-AMBENE Parfait⁴, NSANGO Sandrine Evéline^{2,5}, BLANDIN Stéphanie¹

¹Université de Strasbourg, Inserm, CNRS UPR9022, IBMC, 15 rue René Descartes, BP 67084 Strasbourg, France

²CPC, BP 1274 Yaoundé, Cameroon

³IRD-MIVEGEC, UMR 224 IRD, 911 avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier, France

⁴OCEAC, BP 15665 Yaoundé-Cameroun

⁵Université de Douala, Université de Douala, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Douala, Cameroon

Résumé :

Anopheles coluzzii est un vecteur majeur du paludisme en Afrique sub-saharienne. Ce pendant sa compétence vectorielle peut varier extrêmement d'un moustique à un autre au sein de l'espèce. Le polymorphisme de *TEPI* est un déterminant majeur de la résistance/sensibilité des moustiques vis-à-vis de *P. berghei* parasite murin (Blandin et al., 2009), et *P. falciparum* (White et al., 2010). À partir d'une même lignée parentale NGousso (*A. coluzzii*) portant l'allèle sensible *TEPI*SI*, nous avons isolé deux lignées (S1 high et S1 low) dont les prévalences sont similaires lors d'une infection avec *P. berghei*, mais dont les charges parasitaires sont très différentes, démontrant ainsi que d'autres facteurs génétiques pro/antiparasitaires contrôlent la compétence vectorielle chez les moustiques NG. Des croisements ont été effectués entre ces deux lignées afin de cartographier les régions qui contribuent à déterminer le niveau d'infection de ces lignées. Enfin, nous avons observé une inversion des phénotypes de ces lignées lors d'une infection avec des isolats naturels de *P. falciparum* au Cameroun, ce qui suggère que les mécanismes de résistance du moustique vis à vis de différentes espèces de parasites ne sont pas conservés, et que le parasite humain est capable dans une certaine mesure d'exploiter la réponse antiparasitaire montée par le moustique pour son propre bénéfice.

Mots clés : *An. coluzzii*, *P. falciparum*, *TEPI*, Compétence vectorielle.

Introduction

An. coluzzii est un vecteur majeur de l'infection à *P. falciparum*, parasite en cause du paludisme grave en Afrique subsaharienne et des cas de mortalité associée (WHO, 2016). Des études précédentes ont montré que l'implication d'*An. coluzzii* dans la transmission du paludisme humain est liée à sa compétence vectorielle, en grande partie déterminée par des facteurs génétiques (Collins et al., 1986 ; Blandin et al., 2009). Ces travaux étaient basés sur des modèles d'interaction en conditions de laboratoire afin d'identifier et de caractériser les mécanismes d'élimination des parasites, ainsi que les gènes candidats qui participent à la résistance/sensibilité des moustiques à l'infection. Le modèle de paludisme murin largement utilisé *An. coluzzii*-*P. berghei* a permis d'identifier certains gènes candidats impliqués dans la réponse antiparasitaire (Blandin et al., 2004, Osta et al., 2004a ; Osta et al., 2004b), et surtout de mettre en évidence les polymorphismes qui contribuent à déterminer la compétence vectorielle des moustiques. Le polymorphisme du gène *TEPI* contrôle la résistance/sensibilité à *P. berghei* (Blandin et al., 2009) et corrèle avec la résistance/sensibilité à *P. falciparum* (White et al., 2010), tandis que le polymorphisme du gène *APLIA* détermine en partie la résistance à *P. falciparum* (Mitri et al., 2009). Cependant, ces facteurs n'expliquent pas à eux seuls l'ensemble du phénotype des moustiques et notre objectif était d'en identifier d'autres par cartographie de QTL (*Quantitative Trait Loci*) en utilisant une sélection de lignées résistantes et sensibles au parasite *P. berghei*, et de tester la conservation des facteurs génétiques de résistance vis-à-vis de plusieurs isolats de parasite humain *P. falciparum*.

Pour ce faire nous avons effectué plusieurs séries de sélections sur la souche Ngouso (NG), provenant de Yaoundé au Cameroun, pour isoler dans un premier temps des lignées invariantes pour *TEPI*, *TEPI*S1* et *TEPI*S2*, dénommées respectivement NG-S1 et NG-S2. Dans le but de rechercher s'il est possible d'isoler génétiquement une lignée résistante et une lignée sensible à *P. berghei* à partir d'une souche invariante pour *TEPI*, nous avons choisi la lignée NG-S1, qui porte l'allèle le plus différent de *TEPI*RI* et le plus sensible à *P. berghei* (Blandin et al., 2009). Nous avons sélectionné des lignées résistantes (S1low) et sensibles (S1high) au parasite murin et testé leur phénotype lors d'infections avec des isolats naturels de *P. falciparum*.

Résultats :

Sélection des lignées de moustiques résistants et sensibles à *P. berghei* :

La lignée NG-S1 avait été précédemment sélectionnée au laboratoire pour être homozygote pour *TEPI*SI*, l'allèle le plus différent de *TEPI*RI* et associé à une sensibilité accrue aux infections avec *P. berghei* et *P. falciparum* (Blandin et al., 2009 ; White et al., 2010). Cette lignée présentait cependant un large spectre de phénotypes lors d'infections avec le parasite murin *P. berghei* ; on observait des moustiques complètement résistants au parasite et d'autres portant de grandes charges oocystiques. Ainsi, avons-nous décidé de sélectionner une lignée résistante et une lignée sensible à partir de la lignée parentale NG-S1. Nous avons procédé par des sélections d'iso-femelles. Pour ce faire, les femelles de la génération n ont été accouplées et infectées en groupe, puis séparées dans des tubes individuels pour pondre leurs œufs. Les femelles ne s'accouplant généralement qu'une seule fois au cours de leur vie, chaque progéniture peut être considérée comme issue d'un seul père. Les femelles ont été disséquées et les progénitures des femelles très infectées ont été conservées pour former la génération suivante de la lignée sensible « high » tandis que les progénitures des femelles peu/pas infectées (0-2 parasites par moustique) ont été utilisées pour la lignée « low ». Lors des 2 et 3 premières sélections des S1high et S1low, nous avons mélangé la progéniture de 3 à 8 femelles pour fonder la génération suivante. Pour toutes les autres sélections les progénitures ont été conservées séparées et leur phénotype lors d'une infection comparé pour sélectionner les progénitures les plus sensibles (S1high) ou les plus résistantes (S1low) afin de fonder la génération suivante.

La différence majeure entre ces 2 lignées concerne leur niveau d'infection. En effet, alors que les différences entre les charges oocystiques augmentaient au fur et à mesure des sélections (Figures 32 et 33A), nous n'avons pas réussi à réduire la prévalence de la lignée S1low en deçà de ~70% (Figure 32B). Il est à noter également qu'avec les sélections successives, les S1high sont devenus de plus en plus sensibles, avec des moyennes de charges oocystiques de plus en plus élevées (Figure 33 : les points s'écartent de plus en plus de la ligne 1x au fur et à mesure des sélections).

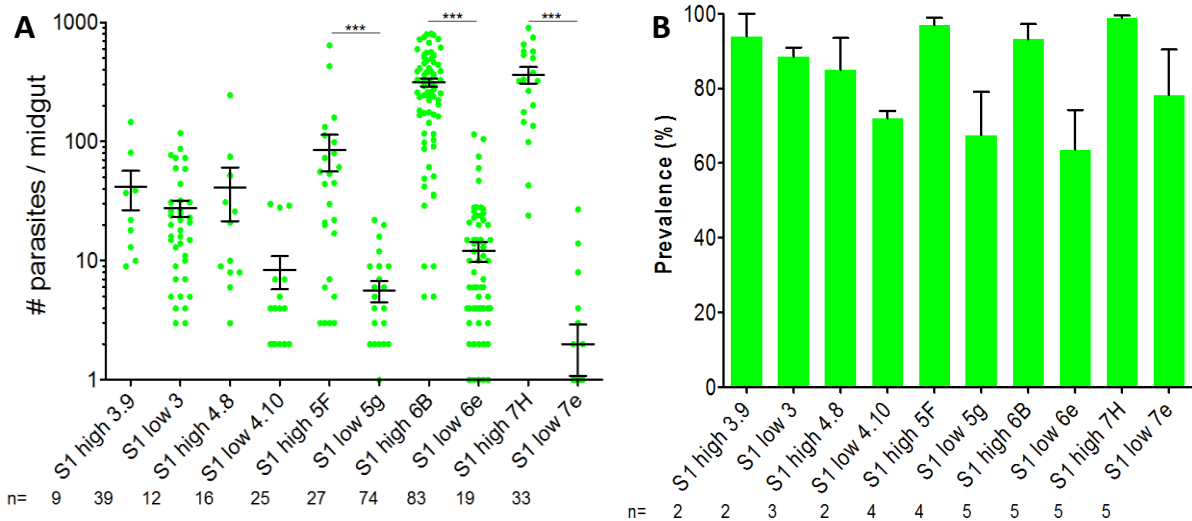


Figure 32 : Nombres d'oocystes chez les moustiques S1high vs S1low iso3 à iso7 (A) et Moyennes des prévalences sur plusieurs infections indépendantes pour les couples S1high/S1low sélectionnés (B).

Les infections ont été réalisées avec la souche Pb-ANKA de *P. berghei*. Chaque point représente le nombre d'oocystes pour un moustique donné. Chaque couple S1high/S1low a été infecté à des dates différentes et sur des souris différentes.

- (A) : Echelle de l'axe des y : log10 ; la moyenne et la déviation standard de la moyenne, ainsi que le nombre n de moustiques infectés, sont indiqués pour chaque groupe. Analyse statistique par Kruskal-Wallis avec post-test Dunn pour comparer les S1high/S1low dans chaque couple.
- (B) : La moyenne et la déviation standard de la moyenne, ainsi que le nombre n d'expériences indépendantes sont indiqués pour chaque groupe.

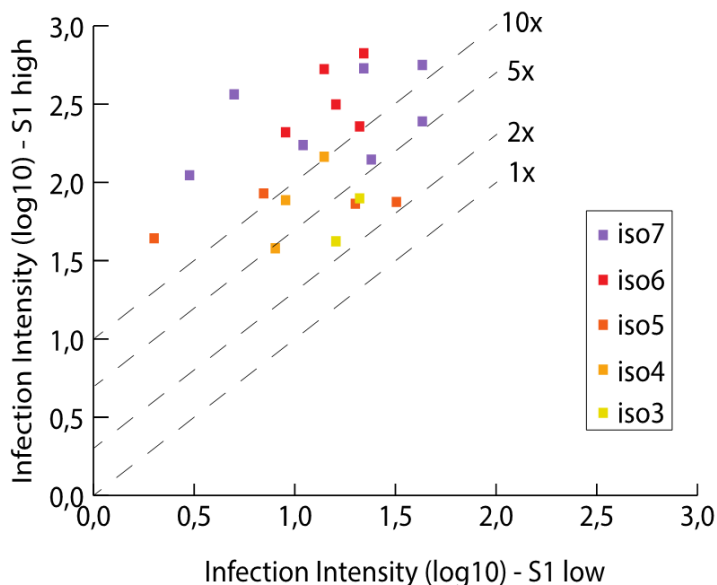


Figure 33 : Moyennes des charges oocystiques des S1high (Axe des Y) vs S1low (Axe des X). Chaque point correspond à une expérience indépendante. Les points sont colorés en fonction de la sélection. Les lignes en interrompues indiquent, pour une charge oocystique donnée chez les S1low, la charge des S1high lorsqu'elle est 1x, 2x, 5x ou 10x plus élevée.

La différence de phénotype entre les S1high/S1low n'est pas due à une différence d'accouplement entre les lignées :

Lors d'un accouplement, le mâle transfère l'hormone stéroïde 20-hydroxyecdysone avec son sperme, et cette hormone facilite le développement des parasites (Childs *et al.*, 2016). Afin d'exclure que la différence phénotypique observée entre les S1low et S1high repose sur leur statut d'accouplement (S1high accouplés et très infectés vs S1low non accouplés et peu infectés), deux groupes de moustiques femelles, accouplées et vierges, ont été constitués pour chaque lignée (iso6) et infectées avec *P. berghei* (Figure 34). Quel que soit le statut d'accouplement, les phénotypes sont conservés : les femelles S1high vierges ou accouplées ont des charges oocystiques importantes tandis que les S1low sont peu infectés. Nous infectons généralement nos moustiques 5-7 jours après émergence alors qu'ils sont en cage et libres de s'accoupler et la différence phénotypique entre les S1high et S1low accouplées est claire, suggérant que les phénotypes sélectionnés ne sont pas dus à des différences de statut d'accouplement entre lignées. Notons cependant que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et que le nombre de moustiques S1low vierge était très faible.

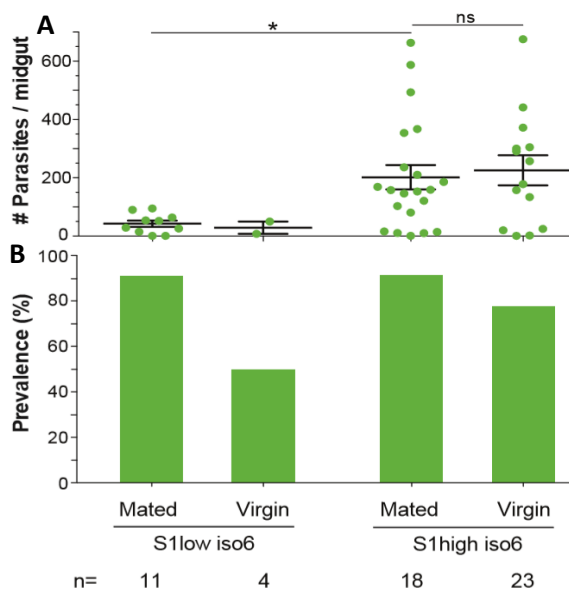


Figure 34 : Charge oocystique (A) et prévalence (B) lors d'une infection avec *P. berghei* chez les S1low/S1high iso6 accouplées (*Mated*) et vierges (*Virgin*). (A) Chaque point représente le nombre d'oocystes pour un moustique infecté donné. L'analyse statistique par le test de Mann Whitney a été faite pour comparer les niveaux d'infections chez S1high et S1low fertilisées vs vierges.

Le phénotype des S1high/S1low n'est pas conservé lors d'infections avec *P. falciparum* :

Des expériences chez S1high et S1low ont été réalisées en laboratoire au Max Plank Institute de Berlin avec la souche NF54 (2 expériences avec les iso5) et sur le terrain avec des isolats naturels de *P. falciparum* (42 expériences au total : 05 avec les iso3, 31 avec les iso5 et 06 avec les iso6). Nous avons observé deux phénotypes opposés lorsque les S1high et S1low ont été infectés avec la souche NF54 : (1) un phénotype similaire à celui obtenu lors d'une infection avec *P. berghei*, où cependant la mortalité post infection a été très importante dans les 2 lignées (2/3 des moustiques sont morts avant la dissection), et (2) un phénotype opposé dans l'autre expérience (Figure 35).

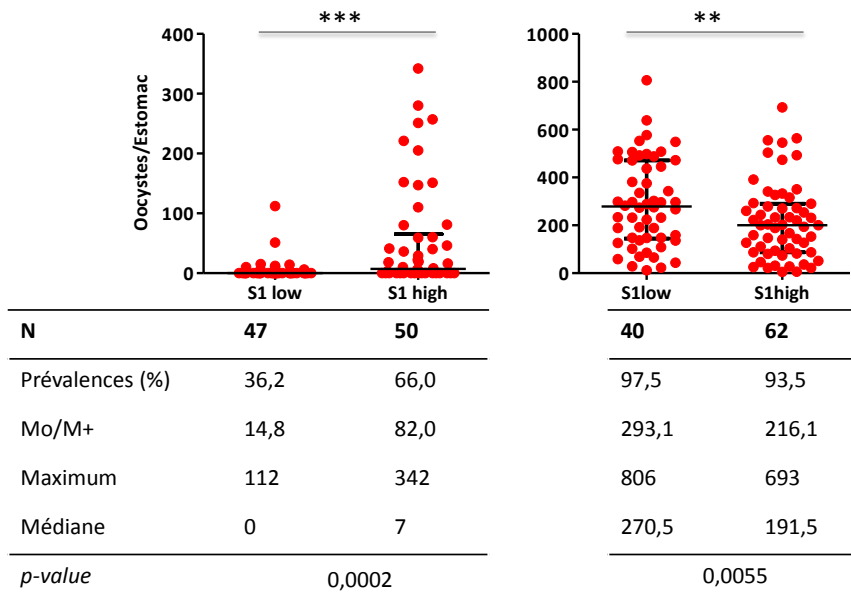


Figure 325 : Nombres d'oocystes et prévalences chez les moustiques S1high vs S1low iso5 infectés avec la souche NF54 de *P. falciparum*.

Les nuages de points représentent les nombres d'oocystes. Chaque couple S1high/S1low a été infecté à des dates différentes. L'axe des Y représente le nombre d'oocystes par intestin de moustique. L'axe de X représente les lignées S1low et S1high pour chaque expérience (1^{ère} expérience : A gauche/2^e expérience : A droite). Les barres horizontales représentent les médianes avec les quartiles. L'analyse statistique par le test de Mann Whitney a été faite pour comparer les niveaux d'infections chez S1high vs S1low dans chaque expérience.

Sur le terrain, les expériences ont été réalisées avec différents porteurs de gamétocytes. Nous avons (1) comparé les prévalences et niveaux d'infections des S1high vs S1low dans l'ensemble (Figure 36), (2) et effectué des méta-analyses binaires et continues pour comparer les prévalences et les niveaux d'infection, respectivement, entre les deux lignées sur l'ensemble

des expériences et en fonction des différents niveaux de sélection utilisés (iso3, iso5 et iso6) (figures 37 et 38).

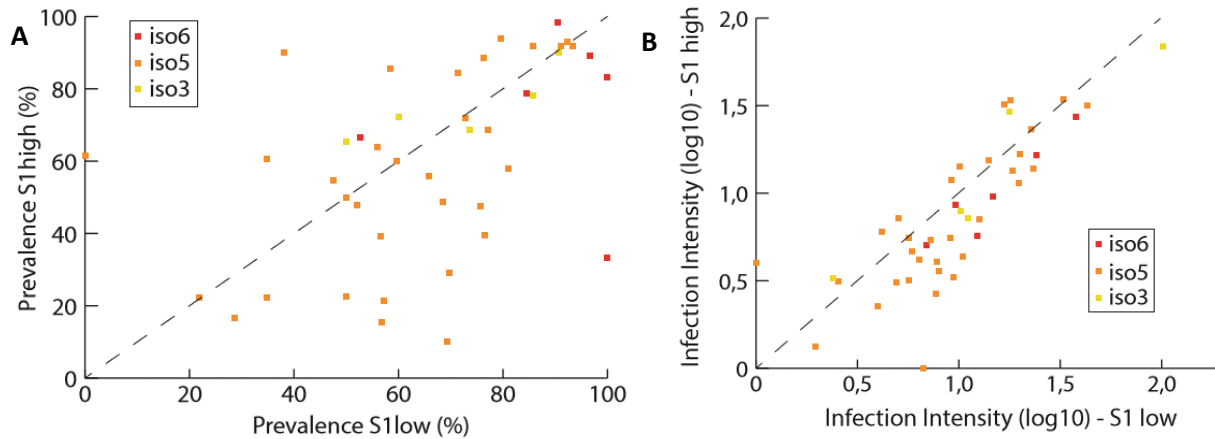


Figure 36 : Comparaison des prévalences (A) et charges oocystiques (B) chez S1high (Axe des Y) et S1low (Axes des X). Chaque carré correspond à une infection concomitante des deux lignées sur le même porteur.

Les prévalences des S1high vs S1low varient en fonction des isolats de parasites (Figure 37), avec des phénotypes opposés dans certains cas. Mais une tendance vers un phénotype opposé à celui obtenu lors d'infections avec *P. berghei* est observée. Par exemple, pour les iso5, 7 expériences (C326, C328, C332, C397, C400, C408 et C414) montrent clairement des prévalences plus importantes chez les S1low que les S1high, contrairement à deux autres (C337 et C340) où les S1high sont plus infectés ; le reste des expériences ne montre pas de différences significatives. Et chez les iso6, 4 expériences (C389, C402, C406 et C414) sur 6 montrent que les prévalences des S1low sont supérieures aux S1high, et seule la C402 montre que les S1low sont significativement plus infectés que les S1high. Ainsi, sans être significative, la tendance vers des prévalences plus grandes pour les S1low que pour les S1high chez les iso5 et iso6, montre un phénotype opposé à celui sélectionné avec *P. berghei*.

Cette tendance devient significative lorsqu'on compare les charges oocystiques chez les iso5 et les iso6 (p -values = 0,004 et 0,001 pour les iso5 et 6, respectivement ; Figure 38) ; les S1low sont plus infectés que les S1high. Chez les iso3 aucune différence n'est observée (p -value = 0,815 ; Figure 38). On note cependant chez les iso5 une variabilité des phénotypes en fonction des isolats de parasite ; 7 expériences (C317, C324, C332, C389, C391, C400 et C406)

montrent les S1low plus infectés que les S1high, alors que 3 autres (C254, C346 et C413) montrent que les S1high portent plus d'oocystes. Le reste des expériences ne montre pas de différences statistiques. Chez les iso6, 3 expériences (C397, C406 et C414) sur 6 sont statistiquement significatives.

Les *odd ratio* (OR) d'effet commun chez les iso3, iso5 et iso6 et les différences entre les moyennes (MD) décroissent progressivement lorsque le niveau de sélection augmente (Figure 37 : 1,32 ; 0,75 et 0,60 et Figure 38 : -0,60 ; -1,47 et -3,93 pour les iso3, iso5 et iso6) ; ce qui suggère que la différence de phénotype entre les S1high et S1low vis-à-vis de *P. falciparum* (S1low plus sensible que S1high) s'accroît davantage au fur et à mesure des sélections génétiques.

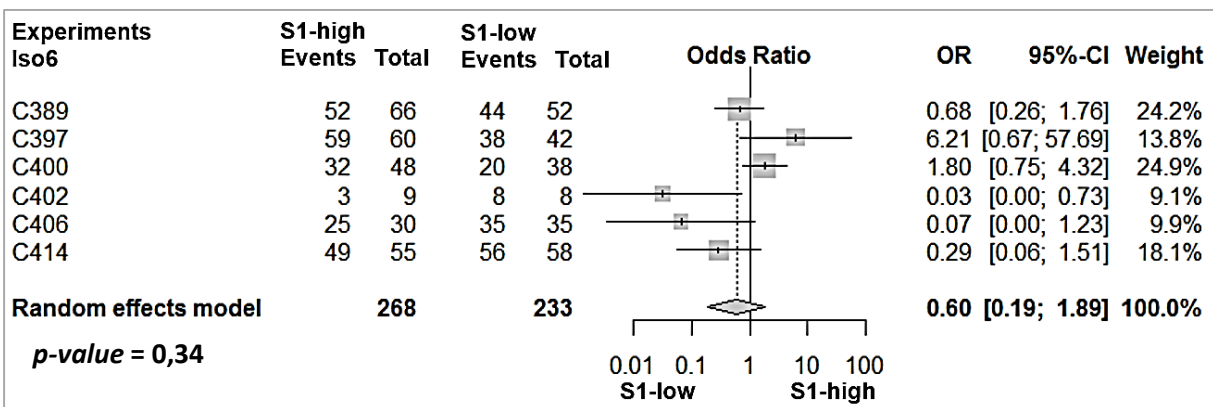
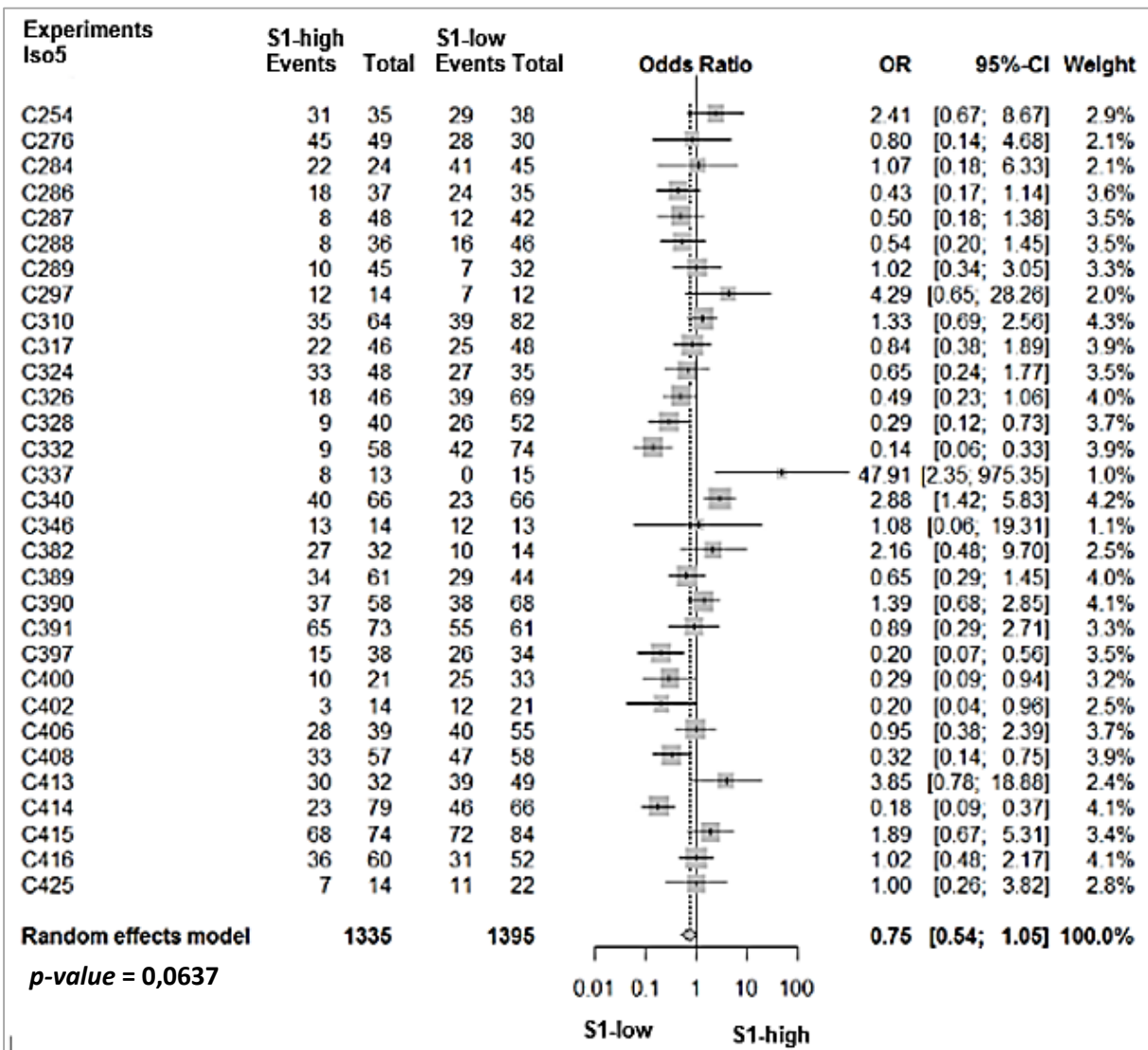
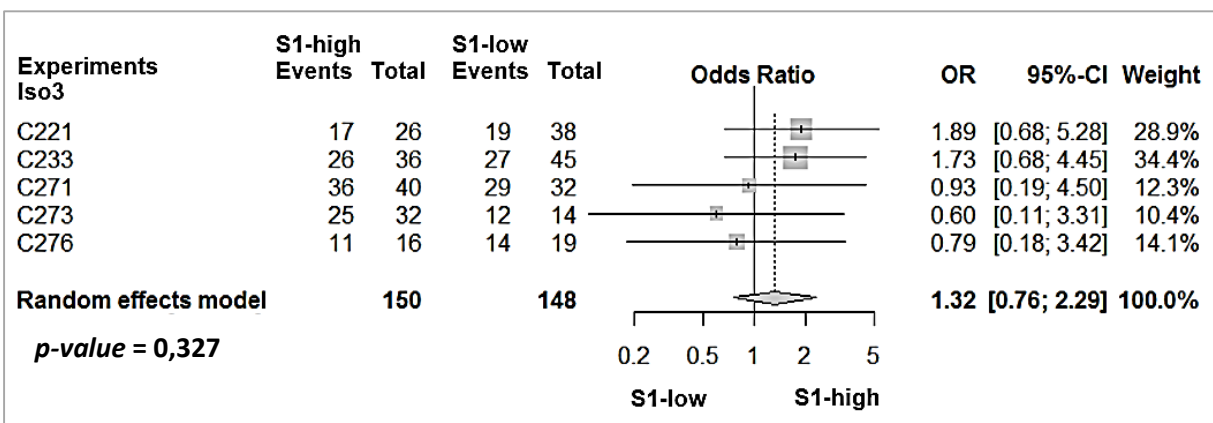


Figure 37 : Prévalences d'infections à *P. falciparum* chez les moustiques S1high et S1low.

Events : Nombre de moustiques infectés

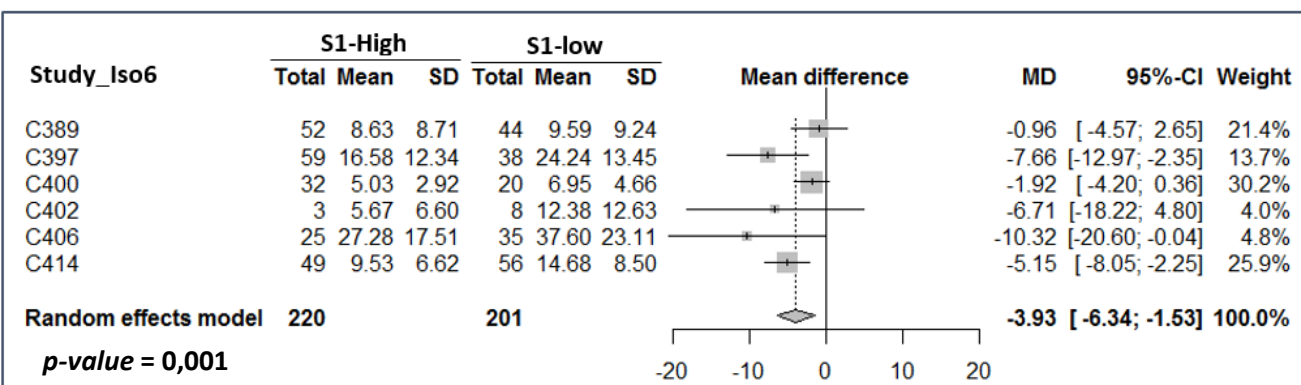
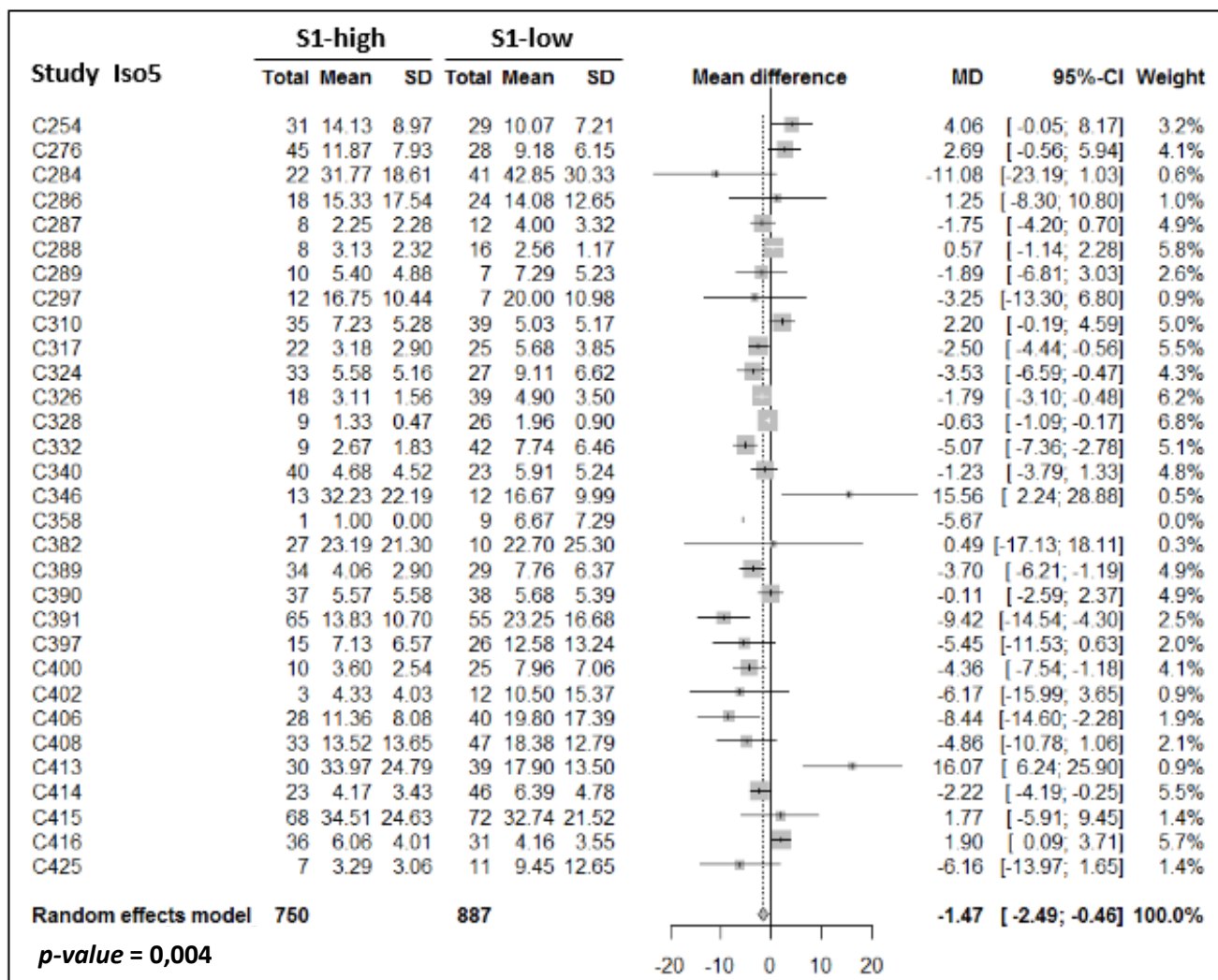
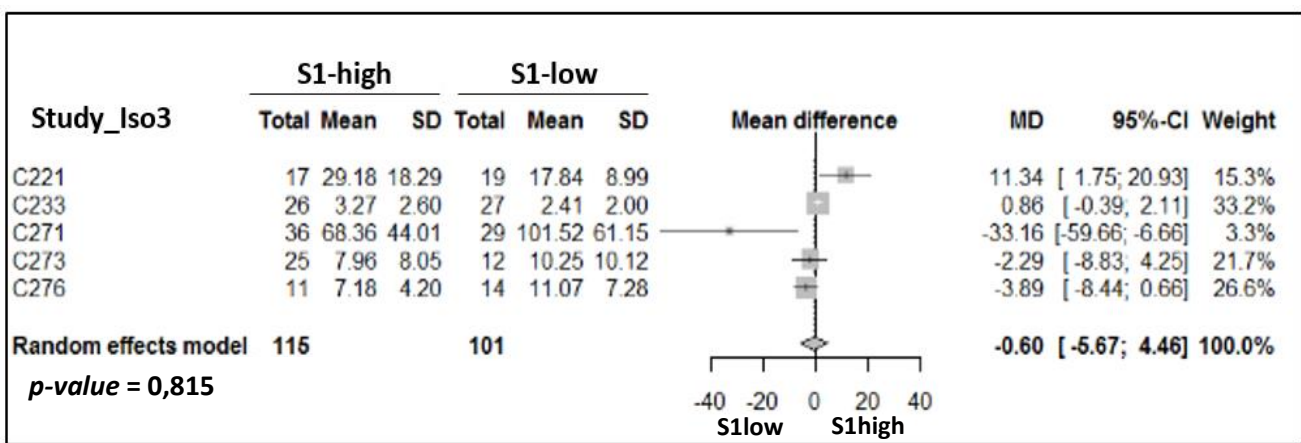


Figure 338 : Niveaux d'infection à *P. falciparum* chez les moustiques S1high vs S1low

SD : Standard Deviation

La gamétocythémie des porteurs influence la prévalence et le niveau d'infection chez les S1high/S1low :

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il existe un seuil pour la gamétocythémie des porteurs au-delà duquel les Ngousso s'infectent efficacement avec des prévalences > 60% et une corrélation claire entre la charge oocystique et la gamétocythémie. Pour les lignées S1high et S1low, les prévalences étaient globalement plus variables, notamment pour les S1high (figures 39A et 39B : régressions linéaires et p -values = 0,0540 / 0,0142 pour les S1high / S1low). De même, nos données montrent que la gamétocythémie détermine clairement l'intensité d'infection des S1high et S1low. En effet, on observe que le nombre d'oocystes chez les moustiques infectés augmente significativement en fonction du nombre de gamétocytes chez les porteurs (figures 39C et 39D : régressions linéaires et p -values < 0,0001 pour les S1high et les S1low).

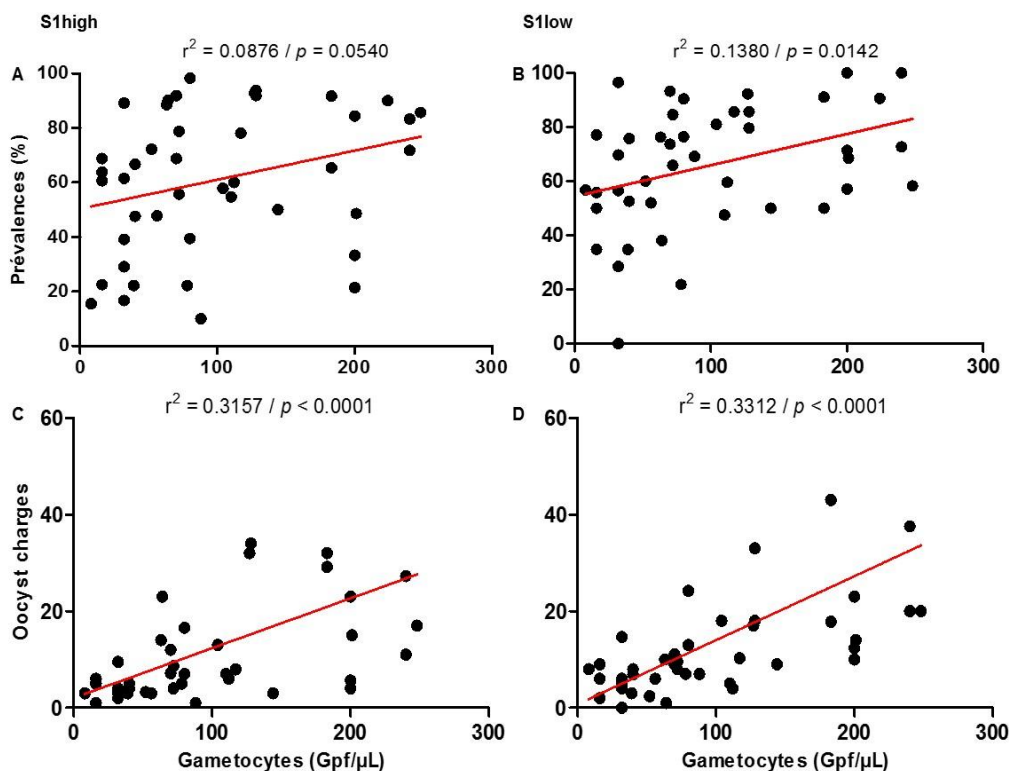


Figure 349 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) chez les S1high (A et C) vs S1low (B et D) en fonction des charges gamétocytaires.

Les points représentent les prévalences (A et B) et les charges moyennes d'oocystes (C et D). Les lignes obliques en rouge représentent les droites de régression, avec au-dessus la p -value (p) correspondante à chacune, ainsi que le coefficient de corrélation (r^2).

Discussion et conclusion :

Les lignées S1high et S1low ont été isolées à partir d'une lignée parentale NG-S1 portant l'allèle sensible *TEPI*SI* par sélections successives des moustiques les plus infectés et les moins infectés, respectivement, lors d'une infection avec *P. berghei*. Ces 2 lignées diffèrent par leurs charges oocystiques. Par contre les prévalences ne sont pas statistiquement différentes entre les S1high et S1low malgré des efforts répétés pour sélectionner la progéniture des moustiques non infectés dans le cas des S1low. Cette observation confirme que la prévalence et la charge oocystique sont des traits contrôlés par des facteurs génétiques différents (au moins en partie) et que la lignée parentale NG-S1 était dépourvue des variantes génétiques conférant une résistance en terme de prévalence, ou bien que nous avons perdu ces variantes plus tôt dans la sélection des lignées (par exemple dans le cas où plusieurs gènes sont impliqués, il n'est pas improbable de perdre une ou plusieurs variantes dès les premières sélections).

Nos données suggèrent également que les différences phénotypiques observées entre les S1high et les S1low ne sont pas dues à leur statut d'accouplement. Autrement dit les S1low portent moins de parasites que les S1high, que les moustiques femelles soient vierges ou accouplées.

Aussi, cette paire de lignées est-elle intéressante pour étudier les facteurs génétiques qui contrôlent la charge parasitaire des moustiques lors d'une infection avec *P. berghei*. Des croisements entre les S1high et les S1low (iso5) ont été réalisés au laboratoire pour pouvoir cartographier les régions génomiques d'intérêt qui contrôlent les charges oocystiques. Les génomes des moustiques F2 de phénotypes extrêmes ont été séquencés et l'analyse des QTL est en cours.

Lors d'infections avec *P. falciparum* sur le terrain, les charges oocystiques chez les S1high vs S1low sont fortement corrélées à la densité des gamétocytes chez les porteurs. Cette observation a été démontrée par Morlais et collaborateurs (Morlais et al., 2015, Mendes et al., 2011). De plus, les différences phénotypiques entre S1high et S1low sont plus variables qu'avec *P. berghei*, probablement à cause de la variabilité des isolats de terrain en terme de MOI (nombre de clones de parasite caractéristique du porteur), génotype(s) des parasites de l'isolat, caractéristiques du porteur, etc, alors que *P. berghei* est génétiquement simple (monoclonal) et produit sur des souris de même lignée élevées dans des conditions environnementales contrôlées. Cependant, nous avons observé une tendance à des phénotypes opposés lors

d'infections avec *P. falciparum* par rapport aux infections avec *P. berghei*. En effet, les charges oocystiques sont statistiquement plus importantes chez les S1low que chez les S1high, et ceci de façon plus prononcée au fur et à mesure des sélections. De même, la différence des charges oocystiques entre les S1high et S1low lors d'une infection avec *P. berghei* augmente avec les sélections ; on a des différences plus importantes entre les iso7 qu'entre les iso6, qu'entre les iso5, etc. Ceci suggère que les facteurs génétiques sélectionnés déterminant la charge parasitaire chez les S1high et S1low lors d'une infection avec *P. berghei* auraient un effet opposé vis-à-vis de *P. falciparum* (un agoniste pour *P. berghei* deviendrait antagoniste pour *P. falciparum* et/ou réciproquement). Dans la littérature, il existe plusieurs exemples de gènes dont l'inactivation rend les moustiques plus résistants/sensibles à *P. berghei* sans avoir d'effets sur *P. falciparum* (*CTL4*, *CTLMA2*, *LRIM1*, *APL1C*) (Cohuet et al., 2006 ; Mitri et al., 2009). De même, d'autres gènes (*SRPN7* et *CLIPC2*) montrent une activité pro/antiparasitaire vis-à-vis de *P. falciparum* sans avoir d'effet sur *P. berghei* (Blumberg et al., 2013), en accord avec l'hypothèse que le contrôle du développement des parasites murin *P. berghei* et humain *P. falciparum* est en partie au moins assuré par des voies de signalisation différentes chez *An. gambiae* (Dong et al., 2006). L'activation de la voie Toll, avec pour facteur de transcription Rel1, booste la réponse contre *P. berghei* (Frolet et al., 2006) mais ne bloque pas le développement de *P. falciparum*. Tandis que la voie Imd, dont les gènes effecteurs sont activés par Rel2 (Meister et al., 2005), est induite en réponse contre *P. falciparum* et contrôle le développement de ce parasite (Meister et al., 2009 ; Mitri et al., 2009 ; Garver et al., 2009). Dans le cas des deux lignées que nous avons sélectionnées où les phénotypes sont opposés lors d'infections avec *P. berghei* et *P. falciparum*, avec une augmentation concomitante des différences entre les deux lignées au fur et à mesure des sélections, il semblerait que les facteurs génétiques sélectionnés avec *P. berghei* aient un effet opposé pour *P. falciparum*, même si on ne peut pas exclure que les facteurs influençant le développement de *P. falciparum* soient des facteurs indépendants ségrégant par hasard dans nos deux lignées. Les premières analyses transcriptomiques de ces deux lignées ne semblent pas suggérer une différence d'activité des cascades Rel1 et Rel2 entre ces deux lignées, mais ces résultats restent à confirmer et le séquençage permettra de mettre en évidence des différences importantes entre ces lignées.

Références Bibliographiques :

- Blandin S., Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, Levashina E.A. (2004). Complement-Like Protein TEP1 is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell* ; 116, 661–670.
- Blandin S. A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E. A., Steinmetz L. M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science*, 326(5949):147-150.
- Boissiere A., Gimonneau G., Tchioffo M.T., Abate L., Bayibéki A., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Morlais I. (2013). Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. *PLoS One* 8(1): e54820.
- Bousema Teun, Rhoel R. Dinglasan, Isabelle Morlais, Louis C. Gouagna, Travis van Warmerdam, Parfait H. Awono-Ambene et al. (2012). Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected Plasmodium falciparum Gametocyte Carriers. *PLoS One* 7(8): e42821.
- Cohuet A., Osta M.A., Morlais I., Awono-Ambene P.H., Michel K., Simard F., Christophides G.K., Fontenille D. and Kafatos F.C. (2006). Anopheles and Plasmodium : from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285-9.
- Collins F.H., Sakai R.K., Vernick K.D., Paskewitz S., Seeley D.C., Miller L.H., et al. (1986). Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*. 1986;234:607–10.
- Da D.F., Churcher T.S., Yerbanga R.S., Yaméogo B., Sangaré I., Ouedraogo J.B., Sinden R.E., Blagborough A.M., Cohuet A. (2015). Experimental study of the relationship between Plasmodium gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Exp Parasitol.*;149:74-83.
- 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.
- Eldering M., Morlais I., van Gemert G.J., Van de Vegte-Bolmer M., Graumans W., Siebelink-Stoter R., Vos M., Abate L., Roeffen W., Bousema T., Levashina E.A., Sauerwein R.W. (2016). Variation in susceptibility of African Plasmodium falciparum malaria parasites to TEP1 mediated killing in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports* ; 6:20440.
- Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W., Hoffmann J.A., Blandin S.A., Levashina E.A. (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of Plasmodium. *Cell Host Microbe*. ; 5(3):273-84.
- Frolet C., Thomas M., Blandin M., Hoffman J., and Levashina E. (2006). Boosting *NF- κ B*-Dependent Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghi*. *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg; France. Immunology* ; 25, 677-685.
- Fryxell R., Nieman C., Fofana A., Lee Y., Traoré S., Cornel C., Luckhart S., Lanzaro G. (2012). Differential *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles gambiae s.s.* molecular and chromosomal forms in Mali. *Malaria Journal* 2012, 11: 133.

- Gnémé Awa, Wamdaogo M Guelbéogo, Michelle M Riehle, Antoine Sanou, Alphonse Traoré, Soumanaba Zongo, Karin Eiglmeier, Gustave B Kabré, N'Falé Sagnon, and Kenneth D Vernick (2013). Equivalent susceptibility of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *Anopheles arabiensis* to *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *Malaria Journal* 2013; 12: 204
- Garver L.S., Dong Y. and Dimopoulos G. (2009). Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse Anopheline Species. *PLoS Pathogens* ; 5, e1000335.
- Garver L.S., Bahia A.C., Das S., Souza-Neto J.A., Shiao J., Dong Y., Dimopoulos G. (2012). Anopheles Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-Plasmodium action. *PLoS Pathog.* ; 8(6):e1002737.
- 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(1):e30849.
- Kwon H., Arends B.R., Smith R.C. (2017). Late-phase immune responses limiting oocyst survival are independent of TEP1 function yet display strain specific differences in *Anopheles gambiae*. *Parasit Vectors.* ; 10(1):369.
- 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.* ; 4708–4715.
- Mitri C., Jacques J.C., Thierry I., Riehle M.M., Xu J., Bischoff E., Morlais I., Nsango S.E., Vernick K.D. and Bourgouin, C. (2009). Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. *PLoS Pathog* ; 5, e1000576.
- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2017). Plasmodium P47 : A key gene for malaria transmission by mosquito vectors. *Curr Opin Microbiol.* ; 40:168-174.
- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Kamath N., Pavlovic N.V., Mu J., Ramphul U.N., Ramirez J.L., Barillas-Mury C. (2015). Plasmodium evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(49):15178-83.
- Molina-Cruz A., Garver L.S., Alabaster A., Bangiolo L., Haile A., Winikor J., Ortega C., Van Schaijk B.C., Sauerwein R.W., Taylor-Salmon E., Barillas-Mury C. (2013). The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science* ; 1235264.
- Molina-Cruz Alvaro, Randall J. DeJong, Corrie Ortega, Ashley Haile, Ekua Abban, Janneth Rodrigues, Giovanna Jaramillo-Gutierrez, and Carolina Barillas-Mury (2012). Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PNAS* ; 10.1073.
- Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. (2014). The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 109(5):662-7. Review.
- Morlais I., Nsango S.E., Toussile W., Abate L., Annan Z., Tchioffo M.T., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Fontenille D., Rousset F., Berry A. (2015). *Plasmodium falciparum* mating patterns and mosquito infectivity of natural isolates of gametocytes. *PLoS One.* ; 10(4):e0123777.

Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin. S., Lenoble R. D. Sircoulon J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *Editions John Libbey Eurotext. Paris.* 428p.

Ndiath MO, 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.

Nsango S.E., Luc Abate L., Thoma M., Pompon J., Malou Fraiture M., Rademacher A., Berry A., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A., Morlais I. (2012). Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International Journal for Parasitology.* ; 42 (6): 589-95.

Oliveira Giselle de Almeida, Joshua Lieberman, and Carolina Barillas-Mury (2012). Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. *Science.* ; 335(6070): 856–859.

Osta M.A., Christophides G.K., Kafatos F.C. (2004b). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science.* ; 303(5666):2030-2.

Osta M.A., Christophides G.K., Vlachou D., Kafatos F.C. (2004a). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae* : comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* ; 207(Pt 15):2551-63. Review.

Povelones M., Osta M.A., Christophides G.K. (2016). The Complement System of Malaria Vector Mosquitoes. *Advances in Insect Physiology* ; 2016.06.001. Review

Povelones M., Waterhouse R.M., Kafatos F.C. and Christophides G.K. (2009). Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science* ; 324, 258-61.

Ramphul U.N., Garver L.S., Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2015). *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(5):1273-80.

White Bradley J., Mara K.N. Lawniczak, Changde Cheng, Mamadou B. Coulibaly, Michael D. Wilson, N’Fale Sagnon, Carlo Costantini, Frederic Simard, George K. Christophides, and Nora J. Besansky (2010). Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *PNAS* ; 1013648108.

Chapitre 4 :

Etude de la distribution géographique des vecteurs *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* dans la ville de Yaoundé, et effet du polymorphisme de *TEPI* sur leur compétence vectorielle.

BAYIBEKI NGANO Albert^{1,2}, NSANGO Sandrine Eveline^{2,3}, GEOFFREY Gimonneau^{4,5}, TCHIOFFO TSAPI Majoline⁶, FEUFACK DONFACK Brice^{1,2}, ABATE Luc⁷, SANDEU Maurice Marcel⁸, AWONO-AMBENE Parfait⁹, LEVASHINA Elena¹⁰, BLANDIN Stéphanie¹ & MORLAIS Isabelle⁷.

¹Université de Strasbourg, Inserm, CNRS UPR9022, IBMC, 15 rue René Descartes, BP 67084 Strasbourg, France

²CPC, Bp 1274 Yaoundé, Cameroon

³Université de Douala, Université de Douala, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Douala, Cameroon.

⁴CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France.

⁵Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone subhumide, Bobo-Dioulasso 01 BP 454, Burkina Faso.

⁶Institut Pasteur-Unité de Génétique fonctionnelle des maladies infectieuses, Département Génomes et Génétiques, 28 rue du Docteur Roux, BP : 75015 Paris

⁷IRD-MIVEGEC, UMR 224 IRD, 911 avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier, France

⁸Liverpool school of tropical medicine, Yaoundé-Cameroun

⁹OCEAC, BP 15665 Yaoundé-Cameroun

¹⁰Max Planck Institute for Infection Biology-Department of Vector Biology, Berlin

Résumé :

Les moustiques *Anopheles gambiae s.s.*, et *Anopheles coluzzii* sont deux espèces jumelles, qui exploitent des niches écologiques communes, en sympatrie, ou isolées l'une de l'autre, en allopatrie, et présentent des compétences vectorielles variables. En Afrique subsaharienne ce sont les vecteurs majeurs du paludisme (Ndiath et *al.*, 2011 ; Fryxell et *al.*, 2012 ; Gnémé et *al.*, 2013 ; Boissière et *al.*, 2013 ; Akono et *al.*, 2015).

Afin d'identifier des facteurs qui contrôlent la compétence vectorielle d'*An. gambiae s.s.*, et *An. coluzzii* vis-à-vis du parasite *P. falciparum*, nous avons collecté des moustiques au stade larvaire dans des gîtes naturels prospectés dans différentes localités de la ville de Yaoundé au Cameroun. Nous avons mis en évidence une évolution des proportions des 2 espèces (*An. gambiae s.s.* et *An. Coluzzii*) dans ces localités par rapport aux campagnes antérieures de prospection, modifications probablement liées à la saison de prélèvement (moins de contraintes sur les moustiques quand les conditions sont optimales pendant la saison des pluies) et à l'urbanisation importante en cours à Yaoundé. Nous avons de plus confirmé que, dans cette région, les *A. coluzzii* présentent une prévalence plus importante que les *A. gambiae* mais des charges oocystiques similaires, et nous avons détecté une corrélation entre le génotype de *TEPI* et le niveau d'infection chez les deux espèces de moustiques, corrélation qui restera à confirmer avec un échantillonnage plus important de moustiques. La collection de moustiques déjà assemblée nous permettra de plus d'analyser le polymorphisme de gènes pro/antiparasitaires identifiés au laboratoire et de chercher des corrélations entre génotypes et phénotypes.

Mots clés : *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*, *P. falciparum*, *TEPI*, Compétence vectorielle.

Introduction

An. coluzzii et *An. gambiae* sont deux espèces jumelles appartenant au complexe *An. gambiae* s.l. (Coetzee et al., 2013). Elles correspondent respectivement aux formes moléculaires M et S, maintenant considérées comme des espèces distinctes du fait de l'isolement reproductif en conditions naturelles (Lehmann and Diabate, 2008 ; Pombi et al., 2017). Ce sont des moustiques anthropophiles, vecteurs majeurs du paludisme en Afrique subsaharienne (White et al., 2010 ; Ndiath et al., 2011 ; Fryxell et al., 2012 ; Gnémé et al., 2013 ; Boissière et al., 2013 ; Akono et al., 2015). Dans la nature, les deux espèces présentent des niches écologiques différentes, bien qu'on les retrouve souvent en sympatrie dans certaines localités (Simard et al., 2009 ; Ayala et al., 2009 ; Kamdem et al., 2012). Plusieurs études ont tenté de comparer la susceptibilité des deux espèces vis-à-vis de *P. falciparum* et les résultats diffèrent selon la zone géographique considérée (Ndiath et al., 2011 ; Trout et al., 2012 ; Boissiere et al., 2013 ; Gnémé et al., 2013). Au Cameroun, la comparaison de la compétence vectorielle entre des femelles des deux espèces, collectées à l'état larvaire dans différents gîtes à Yaoundé, a révélé une plus grande sensibilité d'*An. coluzzii*, à l'infection par *P. falciparum*, par rapport à *An. gambiae* (Boissière et al., 2013).

Les mécanismes associés à la résistance des moustiques à l'infection ne sont pas complètement élucidés. Des sélections successives en fonction du phénotype, dans une lignée de moustiques de laboratoire, avaient montré dès 1986 que le caractère résistant/susceptible est en grande partie sous contrôle génétique (Collins et al., 1986). Par la suite, des études de cartographie génétique ont révélé que ce trait est multigénique (Zheng et al., 1997, 2003; Niaré et al., 2002 ; Blandin et al., 2009, Redmond et al., 2015), et ont permis d'identifier plusieurs gènes qui contribuent à déterminer la résistance des moustiques aux parasites du paludisme. Le gène antiparasitaire *TEPI*, homologue du facteur C₃ du complément chez l'homme, est très polymorphe, notamment dans sa moitié 3', permettant de distinguer deux catégories d'allèles, *TEPI**R et *TEPI**S. Les moustiques homozygotes pour l'allèle *TEPI**RI sont majoritairement résistants au parasite murin *P. berghei* (Blandin et al., 2009) et la présence d'un allèle proche de celui-ci dans une population hétérozygote à ce locus corrèle avec la sensibilité des moustiques à l'infection avec le clone ND37 dérivé de NF54 de *P. falciparum* (White et al., 2010). L'activité antiparasitaire contre *P. falciparum* est aussi associée à d'autres gènes candidats, notamment *APLIA* et *Toll11*, qui participent à la réponse immunitaire (Mitri et al., 2009 ; Redmond et al., 2015 ; Povelones et al., 2016).

En conditions naturelles, le phénotype d'invalidation de *TEPI* (augmentation de la susceptibilité à l'infection) n'est toutefois retrouvé que dans les infections monoclonales avec *P. falciparum* (Nsango et al., 2012). Actuellement, on distingue quatre classes d'allèles chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* : 2 classes d'allèles *TEPI***R* (*TEPI***R1*, et *TEPI***R2* qui est une chimère entre *TEPI***S* en 5' et *TEPI***R* en 3') et 2 classes d'allèles *TEPI***S* (*TEPI***S1*, et *TEPI***S2* qui est de type *TEPI***S* sur l'ensemble du gène sauf pour un fragment de 80 nucléotides dans le domaine thioester qui est de type *TEPI***R*) (Blandin et al., 2009). De nombreux autres polymorphismes simples (SNP) ont été identifiés dans des lignées de moustiques de laboratoire et de terrain. Dans le cas d'infections avec la lignée NF54 de *P. falciparum*, la présence de l'allèle *TEPI***R1* corrèle avec une résistance accrue à *P. falciparum* (White et al., 2010), cependant les niveaux de sensibilité que confèrent les allèles *TEPI***S1* et **S2* vis-à-vis du parasite humain n'ont pas encore été déterminés.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour objectifs 1) de caractériser la répartition géographique des moustiques *An. coluzzii* et *An. gambiae* dans la ville de Yaoundé au Cameroun, et 2) de comparer la sensibilité à l'infection à *P. falciparum* chez les femelles portant les allèles *TEPI***S1* et **S2*.

Résultats :

I- Distribution géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* dans la ville de Yaoundé :

Au total 1136 anophèles ont été collectés à partir des larves ramassées dans les 5 localités prospectées : 52,4% (595) représentent *An. coluzzii*, 47,2% (536) *An. gambiae* et 0,4% (5) d'individus hybrides *An. coluzzii/An. gambiae*. La présence d'hybrides suggère un échange continu de matériel génétique entre les deux espèces. Vu leur nombre réduit, ces hybrides n'ont pas été pris en compte pour l'étude de la sensibilité des moustiques en fonction de leur génotype. La figure 40 représente la répartition géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* selon les coordonnées GPS des différents points d'échantillonnage dans la ville de Yaoundé. Les deux espèces ont été retrouvées en sympatrie dans toutes les localités mais avec des proportions différentes. *An. coluzzii* est plus présent au sud de Yaoundé, à Ahala 92% (113), Mvan 91% (217) et Odza 68% (102), qui sont des localités urbaines. *An. gambiae* est plus retrouvé au nord et à l'ouest, respectivement à Nkolondom 91% (314) et Nkolbisson 52% (143), des localités péri-urbaines.

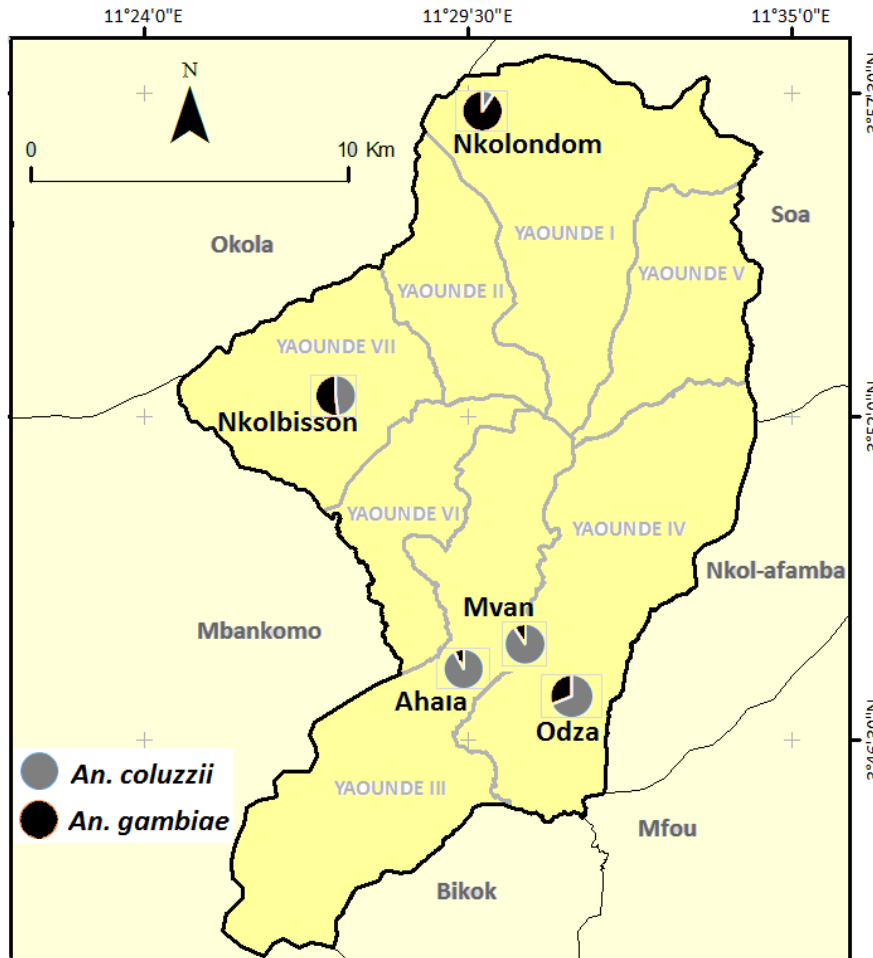


Figure 40 : Répartition géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* dans les localités prospectées de la ville de Yaoundé. Les coordonnées géographiques (Annexe 4) ont été relevées à l'aide d'un GPS *Garmin*.

II- Sensibilité comparée d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* à l'infection avec des isolats naturels de *P. falciparum* :

Au total, 32 expériences de gorgements artificiels ont été réalisées pour comparer la sensibilité des deux espèces à l'infection par des isolats naturels de *P. falciparum*. Pour 10 porteurs de gamétocytes, les moustiques n'ont pas été trouvés infectés 7 jours post-infection et ces expériences n'ont pas été prises en compte. Au final, 22 gorgements (soit 379 moustiques disséqués) ont été retenus. Il n'est pas possible d'effectuer une analyse inférentielle des données expérience par expérience en raison du faible nombre de moustiques disséqués après chaque gorgement. Nous avons donc considéré toutes les expériences ensemble, indépendamment de la charge gamétoctaire et de la MOI des différents porteurs. L'analyse a porté sur 174 moustiques *An. coluzzii* et 205 *An. gambiae* (Figure 41). Les prévalences sont de 55% (96) moustiques infectés chez *An. coluzzii* et 35% (78) chez *An. gambiae* (Figure 41A), confirmant

qu'*An. coluzzii* est plus infecté qu'*An. gambiae*. Pour l'intensité d'infection, nous avons exclu les moustiques gorgés sur le porteur C198, qui a une gamétocythémie très élevée (1280 Gpf/ μ L de sang), car les moustiques infectés gorgés sur ce porteur (2 moustiques sur 3) ont des valeurs extrêmes (*outliers*) en terme de charges oocystiques par rapport à la moyenne (271 et 300 oocystes). Nous avons comparé les intensités d'infection pour 172 *An. coluzzii* et 205 *An. gambiae*. La moyenne des charges oocystiques est de 8,3 et 7,8 parasites pour *An. coluzzii* et *An. gambiae*, respectivement (Figure 41B), et la différence n'est pas significative.

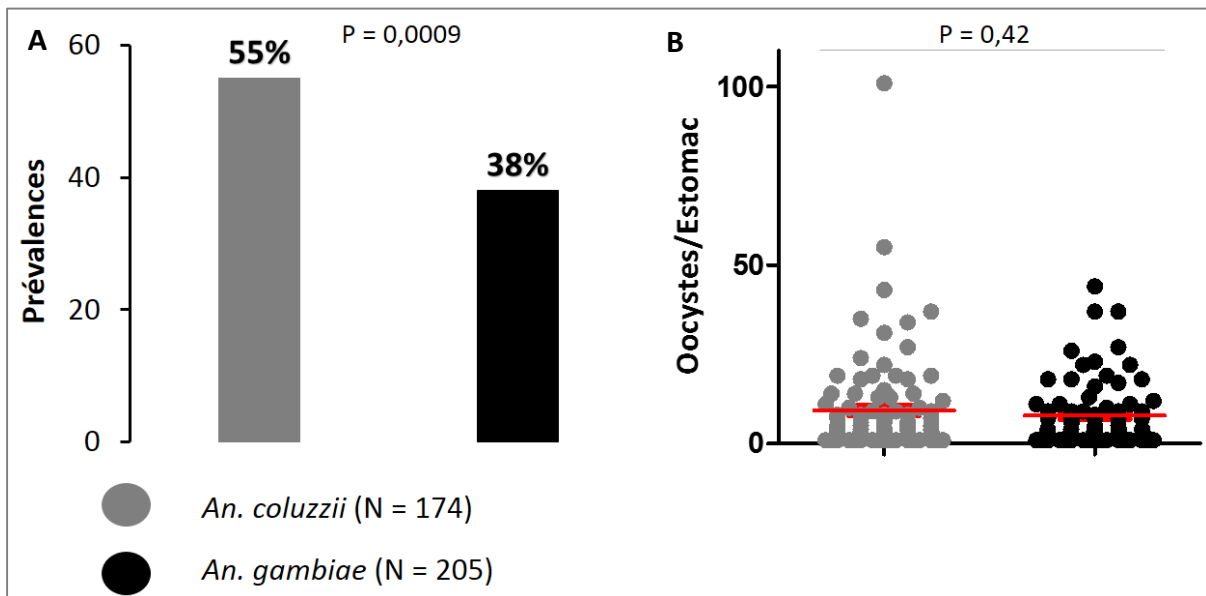


Figure 41 : Prévalence (A) et niveau d'infection (B) chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*.

Les prévalences ont été comparées avec un test exact de Fisher et les niveaux d'infections (nombre moyen d'oocystes par moustique infecté) avec un test de Welch. (Pour l'expérience C198 : FM526 et FM527 (*An. coluzzii*) 300 et 271 oocystes respectivement, FM528 (*An. gambiae*) 0 oocystes). Les axes des X correspondent aux espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Sur la figure 5A l'axe des Y représente la prévalence en %. Sur la figure 5B l'axe des Y représente les nombres d'oocystes par moustique infecté. Les barres horizontales en rouge représentent les charges moyennes d'oocystes par moustique infecté.

III- Polymorphisme de *TEPI* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* :

L'étude du polymorphisme de *TEPI* a été effectuée à partir du génotypage des carcasses de moustiques gorgés et de moustiques entiers non gorgés ; au total 1131 échantillons. La fréquence des différents allèles de *TEPI* a été mesurée chez les deux espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Pour déterminer l'association entre le génotype *TEPI* et le phénotype d'infection, seules les carcasses de moustiques disséqués 7 jours après le repas de sang ont été prises en compte (379 échantillons).

III-1- Distribution géographique des allèles de *TEPI* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* :

Les résultats du génotypage montrent un fort polymorphisme de *TEPI* chez les moustiques de terrain. Les 4 classes d'allèles *R1, *R2, *S1 et *S2 ont été identifiées. Chez *An. coluzzii*, nous avons eu respectivement 92% d'allèles *TEPI**S (*S1 et *S2) et 8% d'allèles *TEPI**R (*R1 et *R2). Chez *An. gambiae*, nous avons obtenu 84% d'allèles *TEPI**S contre 16% d'allèles *TEPI**R. On a observé chez *An. coluzzii* *S1 (57%) > *S2 (35%) > *R2 (7%) > *R1 (1%), alors que chez *An. gambiae* *S1 (76%) > *R2 (14%) > *S2 (8%) > *R1 (2%) (Figure 42). Notons également que les fréquences alléliques sont relativement stables pour chaque espèce, quel que soit le lieu de collection (Figure 42).

On retrouve les 10 combinaisons d'allèles possibles chez *An. coluzzii* et 9 chez *An. gambiae*, les homozygotes *R1/R1 n'ayant pas été identifiés chez cette dernière (Figure 43). Les combinaisons d'allèles *TEPI**S représentent la grande majorité des génotypes retrouvés chez les 2 espèces : 85,5% et 72,2% des individus chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*, respectivement. A noter, une forte proportion des moustiques *An. gambiae* sont de génotype *TEPI**S1/S1 (60%, à corrélérer avec la forte fréquence allélique de *TEPI**S1 dans cette espèce). Chez *An. coluzzii* où la fréquence allélique de *TEPI**S2 est plus importante, on retrouve une majorité d'hétérozygotes *S1/S2 (39%) tandis que les homozygotes *S1/S1 et *S2/S2 sont aussi bien représentés (33% et 13,6%, respectivement). Enfin, vu la faible fréquence des allèles *TEPI**R, nous avons observé très peu de génotypes homozygotes *TEPI**R et hétérozygotes *TEPI**R/S, mis à part 19% de *TEPI**R2/S1 chez *An. gambiae*.

L'analyse de génétique des populations faite chez les deux espèces montre une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg chez *An. coluzzii* (P -value = 0,005) (Annexe : 5). Le déséquilibre observé permet de noter que les génotypes *S1/S2, *S1/S1, *S2/S2, *R2/S1 et *R2/S2 sont plus fréquents que *R2/R2, *R1/S2, *R1/S1, *R1/R2 et *R1/R1.

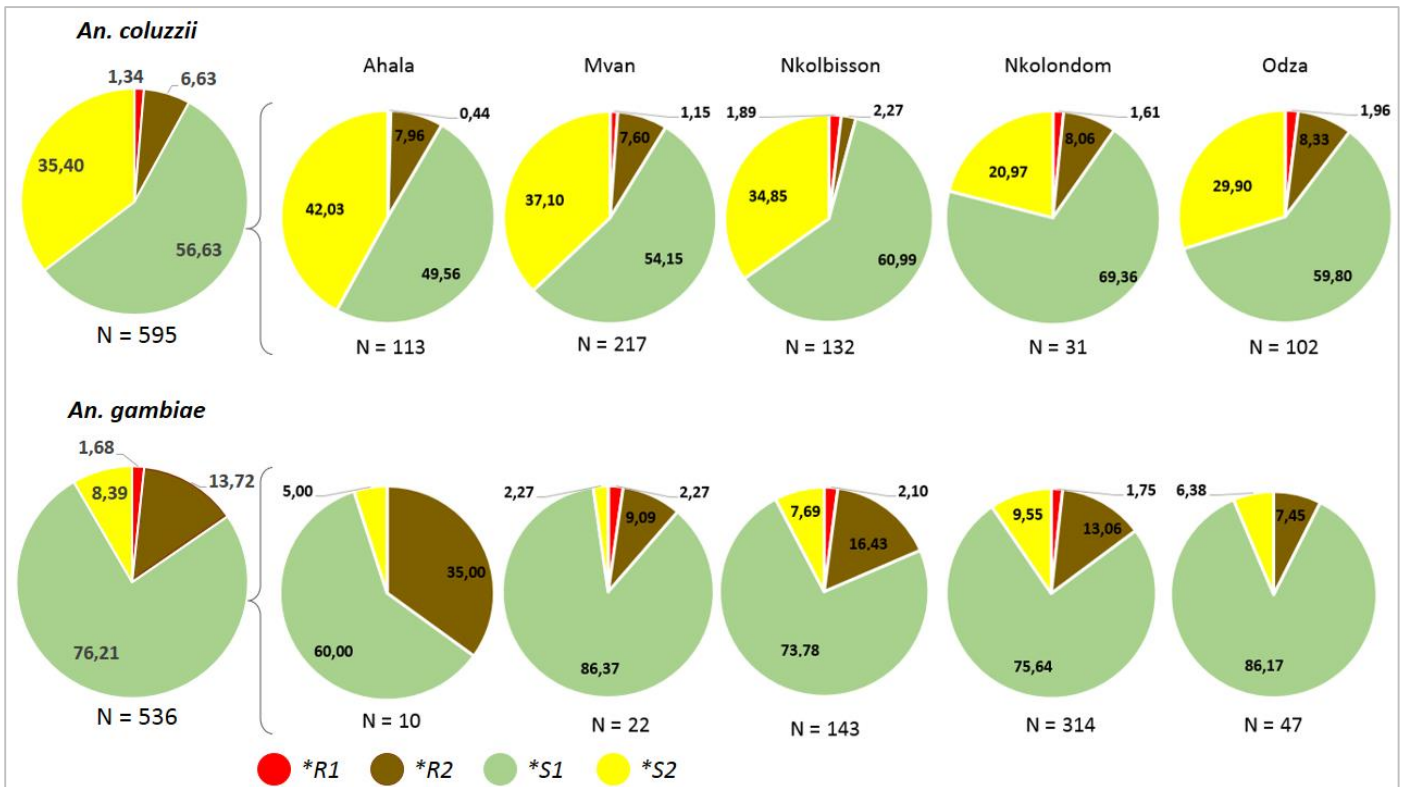


Figure 352 : Fréquences alléliques de *TEPI* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Sur les diagrammes en secteurs, les valeurs observées représentent les fréquences d'allèles *TEPI*. Les valeurs de N représentent les nombres de moustiques testés.

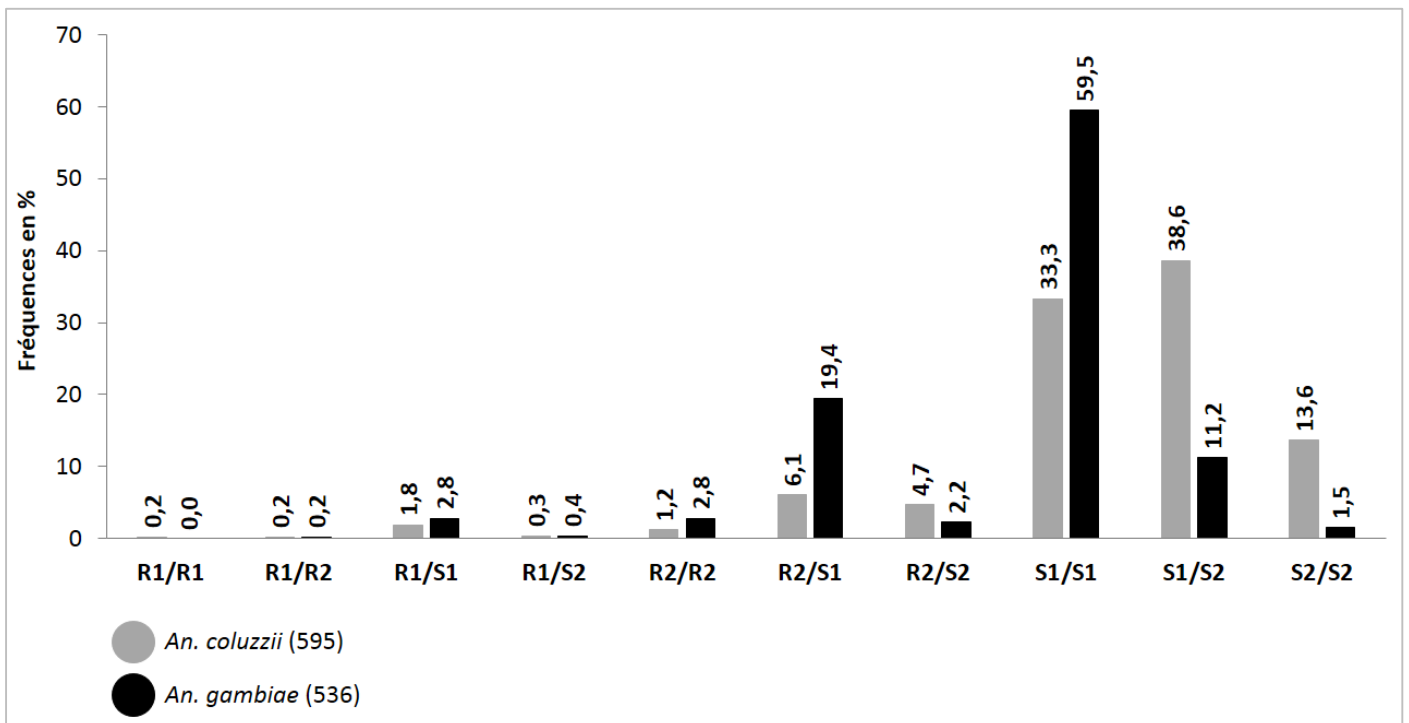


Figure 43 : Fréquences des génotypes *TEPI* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*. L'axe des X représente les différents génotypes *TEPI* retrouvés chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*. L'axe des Y représente les fréquences en %. Les effectifs de moustiques sont reportés entre parenthèses.

Nous avons en parallèle géotypé *TEPI* chez les moustiques Ndokayo (*An. gambiae*) entretenus au laboratoire. Pour ce faire, les carcasses des moustiques gorgés ont servi au géotypage de *TEPI* après dissection et comptage d'oocystes. Les résultats observés sur 645 moustiques (Figure 44) montrent un profil allélique largement représenté par *TEPI**S1, avec *S1 (93,48%) > *R2 (6,06%) > *S2 (0,46%) ; et les géotypes majoritaires sont : *S1/S1 (87,4%) et *R2/S1 (11,5%). D'autres géotypes minoritaires *S2/S2 (0,5%) et *R2/R2 = *S1/S2 (0,3%) sont aussi retrouvés.

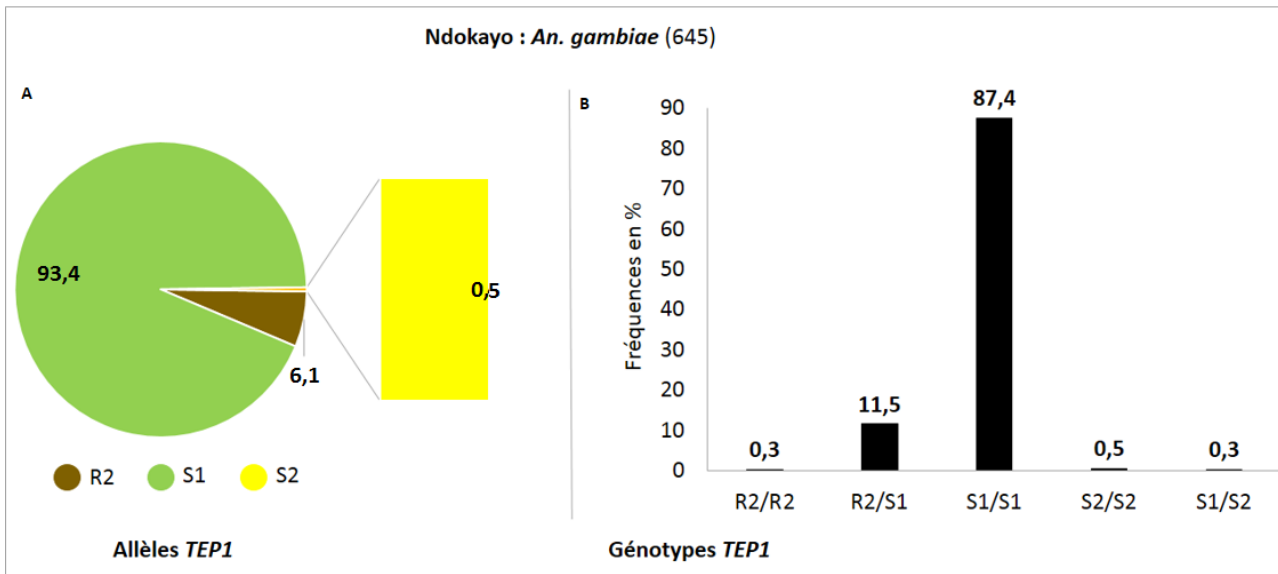


Figure 44 : Fréquences des allèles (A) et géotypes (B) *TEPI* chez Ndokayo. Sur le diagramme en secteurs, les valeurs observées représentent les fréquences en % d'allèles *TEPI* dans la souche Ndokayo. La valeur entre parenthèses représente le nombre de moustiques testés. Sur l'histogramme, l'axe des X représente les géotypes *TEPI* observés. L'axe des Y représente les fréquences en % des différents géotypes.

III-2- Polymorphisme de *TEPI* et résistance/susceptibilité d'*An. coluzzii* et *An. gambiae*

En considérant chaque géotype *TEPI* chez les deux espèces comme des variables indépendantes, les résultats d'infection montrent une sensibilité à *P. falciparum* variable d'un géotype à un autre (Figure 45). Chez *An. coluzzii*, les moustiques *S1/S2 sont sensiblement plus infectés que les homozygotes *S1/S1 et *S2/S2 (Figure 45A : Prévalences de 66% vs 47% et 50% respectivement), avec des intensités d'infection de 9,3 vs 9,4 et 5,7 respectivement (45C). De même, chez *An. gambiae*, les homozygotes *S1/S1 ont une prévalence plus faible que les hétérozygotes *R2/S1 et *S1/S2 (Figure 45B : Prévalences de 33% vs 51% et 42% respectivement), avec des intensités d'infection de 9,2 vs 7,9 et 8 respectivement (45D). Cependant les différences observées ne sont pas statistiquement significatives, même lorsque les géotypes homozygotes et hétérozygotes sont comparés ensemble (Figure 46) ; des effectifs

plus importants seraient nécessaires pour confirmer/infirmier cette observation. Les autres génotypes *TEP1* observés n'ont pas fait l'objet d'interprétation à cause de faibles effectifs (Inférieurs à 10 moustiques/génotype : Annexe 6).

Par ailleurs, les mêmes observations sont faites chez la Ndokayo (Figure 47) où les moustiques hétérozygotes **R2/S1* ont une prévalence plus grande que les homozygotes **S1/S1*, mais avec moins d'oocystes (6 oocystes en moyenne par moustique infecté chez **R2/S1* et 12 oocystes chez les **S1/S1*).

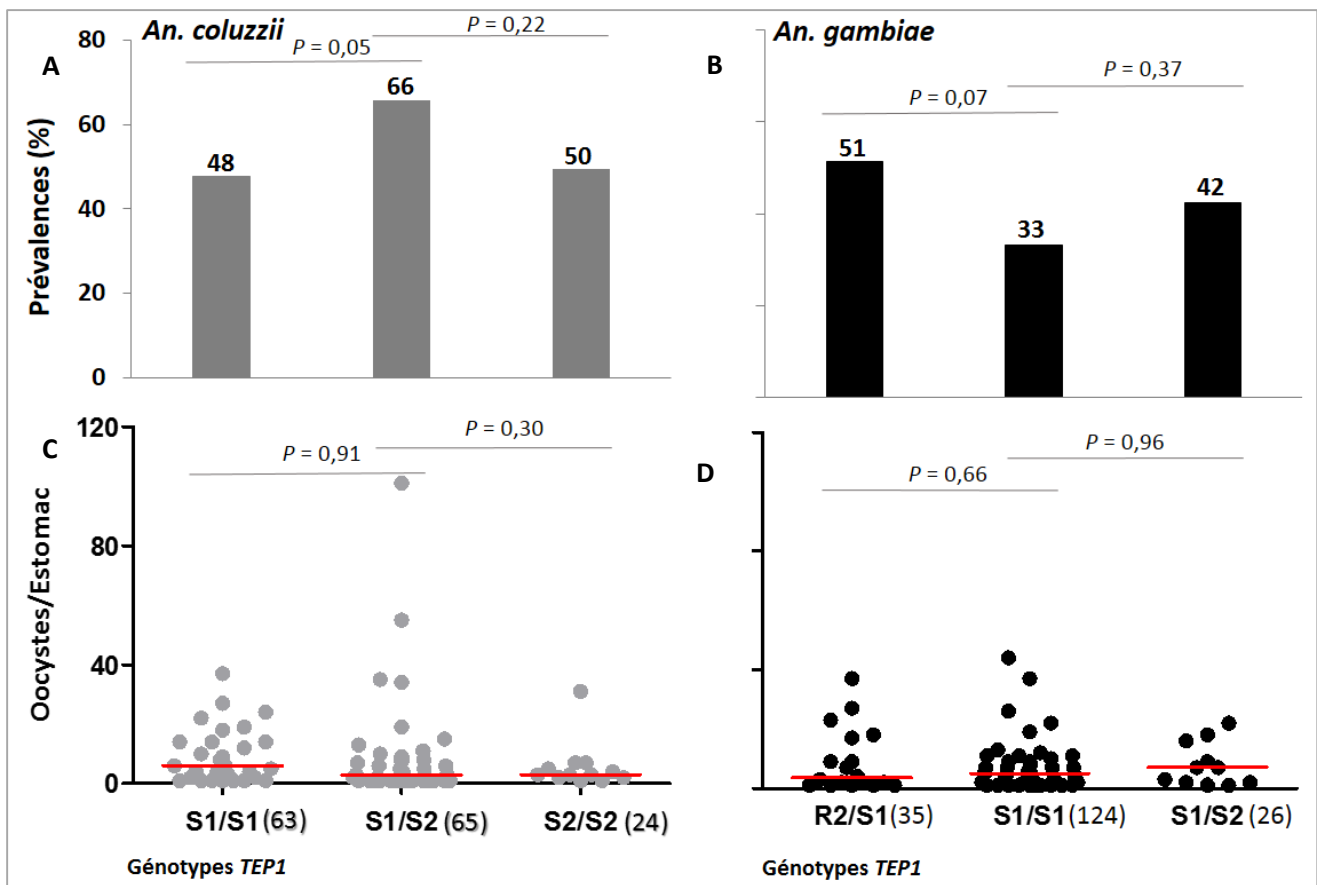


Figure 365 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) des génotypes *TEP1* les plus retrouvés chez *An. coluzzii* (A et C) et *An. gambiae* (B et D). Le nombre de moustiques pour chaque génotype est indiqué entre parenthèses sur 6A et 6B. Sur les histogrammes l'axe des Y représente les prévalences en % des différents génotypes. Sur les nuages de points l'axe des Y représente les nombres d'oocystes retrouvés chez les moustiques infectés, et les barres horizontales rouges matérialisent les moyennes. Les axes des X représentent les génotypes *TEP1*. Le test T de Fisher a permis de comparer les prévalences observées. Et les niveaux d'infections chez les moustiques suivant les génotypes *TEP1* sont comparés à l'aide du test de Welch.

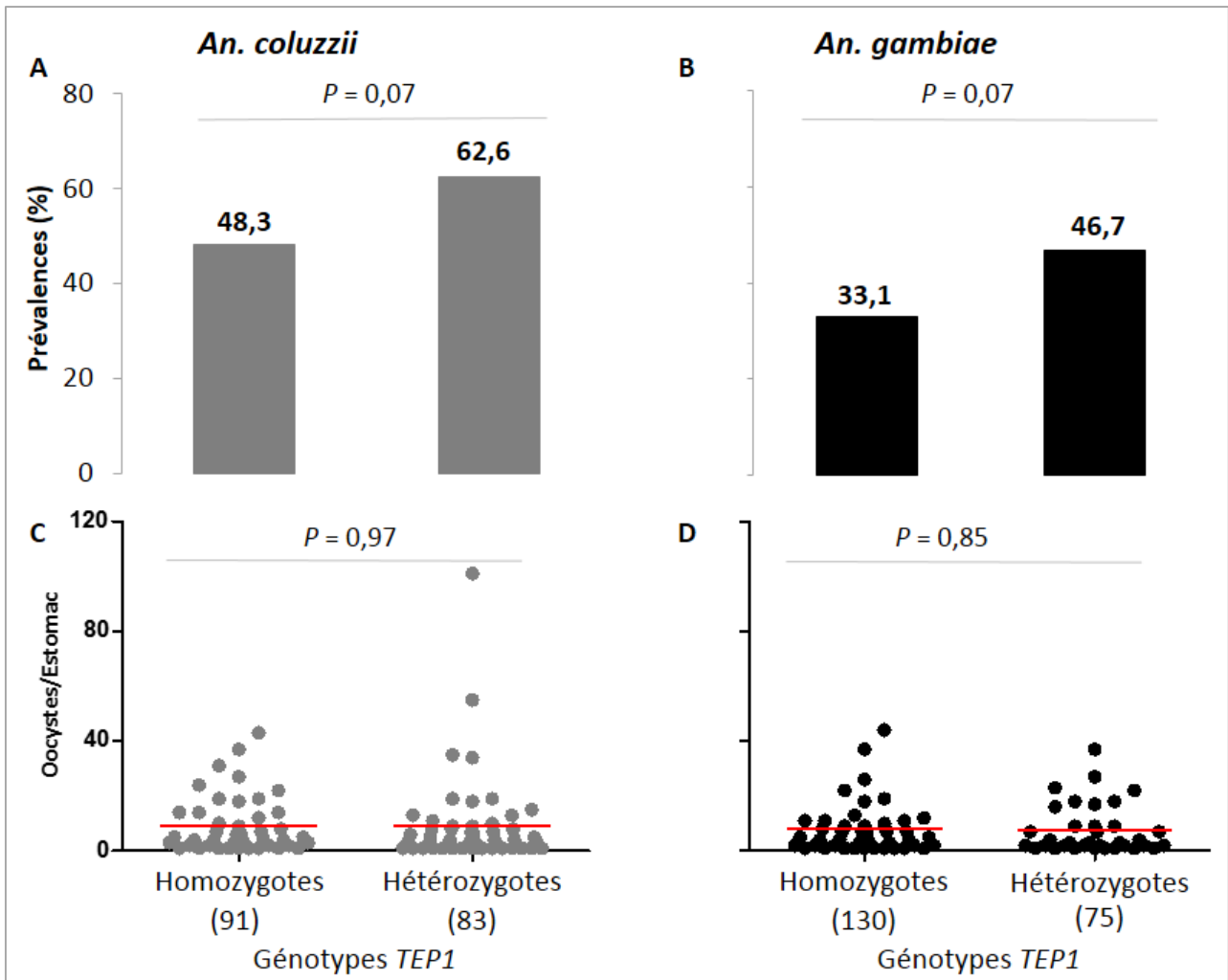


Figure 376 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) chez les moustiques *An. coluzzii* (A et C) et *An. gambiae* (B et D) homozygotes/hétérozygotes pour *TEP1*. Les nombres de moustiques homozygotes/hétérozygotes sont indiqués entre parenthèses. Sur les histogrammes l'axe des Y représente les prévalences en % des différents génotypes. Sur les nuages de points l'axe des Y représente les nombres d'oocystes retrouvés chez les moustiques infectés, et les barres horizontales rouges matérialisent les moyennes. Les axes des X représentent les moustiques homozygotes/hétérozygotes. Le test T de Fisher a permis de comparer les prévalences observées. Et les niveaux d'infections chez les moustiques homozygotes vs hétérozygotes sont comparés à l'aide du test de Welch.

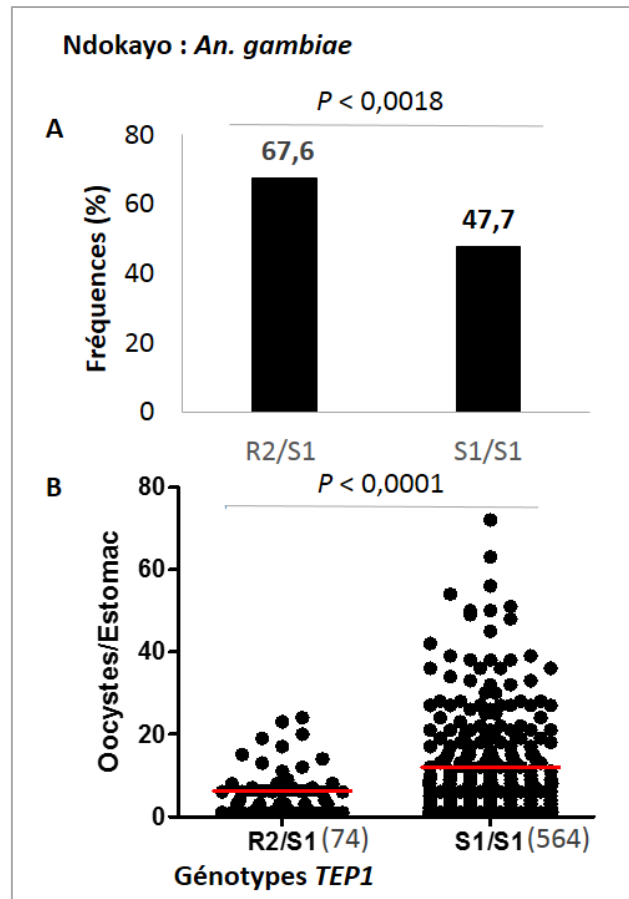


Figure 387 : Prévalences (A) et niveaux d'infections (B) des génotypes *TEPI* chez Ndokayo (*An. gambiae*). Les nombres de moustiques pour chaque génotype sont indiqués entre parenthèses. Sur l'histogramme l'axe des Y représente les prévalences en % des génotypes infectés. Sur les nuages de points l'axe des Y représente les nombres d'oocystes retrouvés chez les moustiques infectés, et les barres horizontales rouges matérialisent les moyennes. Les axes des X représentent les génotypes *TEPI* les plus retrouvés. Le test T de Fisher a permis de comparer les prévalences observées. Et les niveaux d'infections chez les moustiques **R2/S1* vs **S1/S1* sont comparés à l'aide du test de Welch.

Discussion et conclusion :

Les données présentées dans ce chapitre sont le résultat de plusieurs mois de collectes larvaires, durant trois saisons d'expérimentation (Mars-Mai et Septembre-Novembre 2013, et Mars-Mai 2014). Les moustiques de terrain, contrairement aux colonies de laboratoire, ne sont pas adaptés au gorgement sur membrane. Seul 1/3 des moustiques obtenus après émergence (379/1136) s'est gorgé sur membrane, alors que le taux de gorgement de la colonie Ndokayo dépasse les 80%. C'est ce qui explique les faibles effectifs de moustiques gorgés dans nos expériences. D'autre part, malgré un gros effort d'échantillonnage, nous n'avons pas pu obtenir suffisamment de larves dans tous les sites de collecte pour pouvoir comparer la compétence vectorielle d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* en fonction des localités. Dans certains cas, la densité des adultes émergents au laboratoire est insuffisante, dans d'autres cas nous avons plus de mâles que de femelles après émergence.

Concernant la distribution géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* : initialement, Ahala et Mvan étaient connues comme des localités d'allopatrie à *An. coluzzii*, Nkolondom était une localité d'allopatrie à *An. gambiae*, tandis que Nkolbisson et Odza étaient sympatriques (Nsango, Morlais et Levashina, communication personnelle). C'est ce qui a justifié le choix des collectes larvaires dans ces localités afin de comparer la compétence vectorielle des deux espèces. Avec les modifications environnementales survenues dans ces zones d'urbanisation croissante, les sites allopatriques sont tous devenus sympatriques. Des observations similaires dans la localité de Simbock au sud-ouest de Yaoundé ont montré que la distribution des vecteurs et leurs niches écologiques peuvent subir des variations dans le temps (Wondji et al., 2005). *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont aussi souvent été retrouvés en sympatrie dans d'autres localités (Simard et al., 2009 ; Boissière et al., 2012). Les résultats observés dans notre étude montrent aussi qu'*An. coluzzii* est essentiellement retrouvée dans les localités urbaines du sud de la ville, *An. gambiae* est plus présente en milieu péri-urbain à l'ouest et au nord. En effet, Kamdem et collaborateurs (2012) ont montré que la répartition géographique des vecteurs *An. coluzzii* et *An. gambiae* est fortement liée à l'urbanisation du milieu. Les larves d'*An. coluzzii* sont retrouvées dans des gîtes en milieu urbain marqués par une forte pollution, vivant parfois en sympatrie avec des larves de *Culex quinquefasciatus*. Par contre les larves d'*An. gambiae* étaient retrouvées dans des gîtes larvaires en périphérie des milieux urbains et en zones rurales.

Nos résultats indiquent que la prévalence d'infection à *P. falciparum* chez *An. coluzzii* est plus élevée que chez *An. gambiae*. Mais aucune différence n'est observée sur l'intensité

d'infection entre les deux espèces. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par Boissière et collaborateurs (2013). D'autres études révèlent une sensibilité des deux espèces à *P. falciparum* variable en fonction des régions endémiques d'Afrique subsaharienne. Au Mali et au Burkina Faso, aucune différence significative n'est observée entre les deux espèces, alors qu'au Sénégal, *An. coluzzii* s'avère moins infectée qu'*An. gambiae* (Fryxell et al., 2012 ; Gnémé et al., 2013 ; Ndiath et al., 2011).

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la compétence vectorielle de ces espèces, nous pouvons citer : (1) Le génotype de certains gènes de l'immunité (Exemples : *TEPI*, *APLIA*, *Toll11*), (2) le microbiote intestinal avec des effets directs (Production de ROS nuisibles au parasite) ou indirects en stimulant la réponse immunitaire du moustique contre le parasite, (3) le génotype de certains gènes de virulence chez le parasite tels que *Pfs47*. Dans ce travail, nous avons analysé en détail la corrélation entre le génotype des moustiques pour le gène antiparasitaire *TEPI* et la prévalence, avec le niveau d'infection, des moustiques de terrain sans prendre en compte les autres paramètres. En effet, une étude précédente avait montré que, dans une lignée isolée au Mali, les moustiques *TEPI***R1*/*S1* étaient plus résistants au parasite ND37 que les moustiques *TEPI***S1*/*S1* (White et al., 2010). Au Cameroun, l'allèle **S1* est majoritaire, avec des fréquences de 0,76 et 0,56 chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* respectivement. L'allèle **S2* est plus fréquent chez *An. coluzzii* et l'allèle **R2* chez *An. gambiae*, tandis que l'allèle *TEPI***R1* est très rare dans les deux espèces. Nous avons testé les déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour les 2 espèces afin de mettre en évidence des déséquilibres éventuels entre fréquences alléliques et génotypiques. Nous observons un écart à la panmixie significatif, uniquement chez *An. coluzzii*, qui pourrait s'expliquer par le *fitness cost* des génotypes minoritaires **R2*/*R2*, **R1*/*S2*, **R1*/*S1*, **R1*/*R2* et **R1*/*R1* chez les moustiques, et l'avantage sélectif qu'auraient les génotypes majoritaires **S1*/*S2*, **S1*/*S1*, **S2*/*S2*, **R2*/*S1* et **R2*/*S2* sur l'expansion démographique de l'espèce dans son aire de distribution. Cette hypothèse est en accord avec les études récentes qui montrent qu'*An. coluzzii* s'est adaptée pour coloniser les gîtes larvaires urbanisés (Kamdem et al., 2012). Mais nous ne disposons pas encore de plus de données pour confirmer cette hypothèse. Un effort supplémentaire d'échantillonnage assorti d'analyses de génétique de populations, à plus large échelle et sur plusieurs loci, devrait nous permettre de mieux comprendre les forces évolutives qui s'exercent sur les deux espèces jumelles *An. coluzzii* et *An. gambiae* dans nos sites d'étude.

Afin de tester si le polymorphisme de *TEP1* peut affecter la compétence vectorielle des deux espèces, nous avons comparé les prévalences et les niveaux d'infections des génotypes les plus représentés ($N > 10$) **S1/S1*, **S1/S2*, **S2/S2* (chez *An. coluzzii*), et **S1/S1*, **S1/S2*, **S1/R2* (chez *A. gambiae*). Nos résultats suggèrent que les individus homozygotes, quel que soit l'allèle (**S1* ou **S2*) sont moins sensibles (en terme de prévalence) aux isolats naturels de *P. falciparum* que les individus hétérozygotes **S1/S2* ou **R2/S1*. De même, nos résultats obtenus avec la souche de laboratoire Ndokayo montrent que les homozygotes **S1/S1* ont une prévalence moindre que celle des hétérozygotes **S1/R2*. Par contre, la charge oocystique des **S1/S1* est 2 fois supérieure à celle des **S1/R2*. La moindre prévalence des homozygotes par rapport aux hétérozygotes est à rapprocher des résultats précédemment publiés qui montrent que l'allèle *TEP1*R1* perd en partie son potentiel de résistance vis-à-vis de *P. berghei* quand il est exprimé en présence de *TEP1*S1* (Blandin et al., 2009 ; Volohonsky et al., 2017). Des études complémentaires avec un nombre plus important de moustiques de terrain seraient nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires, y compris sur le plan fonctionnel. A noter, la collection de moustiques qui a été assemblée pendant cette étude permettra en outre de tester le polymorphisme d'autres gènes impliqués dans le contrôle du développement du parasite.

Enfin, vu les différences importantes entre les gîtes larvaires des deux espèces (Gimmoneau et al., 2012 et 2014), il serait essentiel de mesurer l'impact de la flore bactérienne, retrouvée dans les gîtes larvaires, sur le développement du moustique et la réponse immunitaire basale chez l'adulte, en terme de sélection de certains génotypes plutôt que d'autres ou bien d'expression différentielle de gènes de l'immunité.

Références Bibliographiques :

- Akono Ntonga P., C. Tonga, J.A. Mbida Mbida, O. E. Ngo Hondt, P. Awono Ambene, C. Ndo, G. Tamdem Magne, M. F. Peka, R. Ngaha, L.G. Lehman (2015). *Anopheles gambiae*, vecteur majeur du paludisme à Logbessou, zone péri-urbaine de Douala (Cameroun). Bulletin de la Société de pathologie exotique ; Volume 108, pp 360–368
- Gnémé Awa, Wamdaogo M Guelbéogo, Michelle M Riehle, Antoine Sanou, Alphonse Traoré, Soumanaba Zongo, Karin Eiglmeier, Gustave B Kabré, N’Falé Sagnon, and Kenneth D Vernick (2013). Equivalent susceptibility of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *Anopheles arabiensis* to *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. *Malaria Journal* 2013; 12: 204
- Ayala D, Costantini C, Ose K, Kamdem GC, Antonio-Nkondjio C, Agbor JP, Awono-Ambene P, Fontenille D, Simard F. (2009). Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon. *Malar J.* ; 8:307. Doi : 10.1186/1475-2875-8-307.
- Baxter R. H., Steinert S., Chelliaha Y., Volohonsky G., Levashina E. A., Deisenhofer J. (2010). A heterodimeric complex of the LRR proteins LRIM1 and APL1C regulates complement-like immunity in *Anopheles gambiae*. *PNAS*, 107 (39): 16817-22.
- Binh V. Le., Marni Williams., Shankar Logarajah, Richard H. G. Baxter (2012). Molecular Basis for Genetic Resistance of *Anopheles gambiae* to Plasmodium : Structural Analysis of TEP1 Susceptible and Resistant Alleles. *PLoS Pathog* 8(10): e1002958. Doi:10.1371/journal.ppat.1002958.
- Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae* : targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep.* 3(9):852-6. Doi : 10.1093/embo-reports/kvf180.
- Blandin S. A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E. A., Steinmetz L. M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science* 2009, 326(5949):147-150.
- Blandin S., Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, Levashina E. A. (2004). Complement-Like Protein TEP1 is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116, 661–670.
- Boissiere A., Gimonneau G., Tchioffo M.T., Abate L., Bayibéki A., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Morlais I. (2013). Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. *PLoS ONE* 8(1): e54820. doi:10.1371/journal.pone.0054820.
- Bradley J. White, Mara K. N. Lawniczak, Changde Cheng, Mamadou B. Coulibaly, Michael D. Wilson, N’Fale Sagnon, Carlo Costantini, Frederic Simard, George K. Christophides, and Nora J. Besansky (2010). Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to Plasmodium.

Coetzee M., Hunt R. H., Wilkerson R., DellaTorre A., Coulibaly M. B. & Besansky, N. J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619, 246–274.

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.

Eldering M, Morlais I, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer M, Graumans W, Siebelink-Stoter R, Vos M, Abate L, Roeffen W, Bousema T, Levashina EA, Sauerwein RW (2016). Variation in susceptibility of African *Plasmodium falciparum* malaria parasites to TEP1 mediated killing in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports*, 6:20440 ; Doi : 10.1038/srep20440.

Fanello C., Santolamazza F., Della Torre A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular form of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*.16, 461-464.

Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W., Hoffmann J.A., Blandin S.A., Levashina E.A., (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of *Plasmodium*. *Cell Host Microbe* 5, 273–284.

Frédéric Simard, Diego Ayala, Guy Colince Kamdem, Marco Pombi, Joachim Etouana, Kenji Ose, Jean-Marie Fotsing, Didier Fontenille, Nora J Besansky and Carlo Costantini, (2009). Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. Available from <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/9/17>.

Fryxell R., Nieman C., Fofana A., Lee Y., Traoré S., Cornel C., Luckhart S., Lanzaro G. (2012). Differential *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles gambiae* s.s. molecular and chromosomal forms in Mali. *Malaria Journal* 2012, 11: 133.

Garrett P. League, Tania Y. Estévez-Lao, Yan Yan, Valeria A. Garcia-Lopez and Julián F. Hillyer (2017). *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults : evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasites & Vectors* 10:367 Doi : 10.1186/s13071-017-2302-6.

Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabiré RK, Simard F. (2012). Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *An. gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol.* ; 26(1):9-17. Doi : 10.1111/j.1365-2915.2011.00957.x.

Kamdem C., Tene Fossog B., Simard F., Etouana J., Ndo C., Kengne P., Bousses P., Etoa F.X., Awono-Ambene P., Fontenille D. et al. (2012). Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One* 2012, 7(6):e39453.

Le BV, Williams M, Logarajah S, Baxter RH. (2012). Molecular basis for genetic resistance of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium* : Structural analysis of TEP1 susceptible and resistant alleles. *PLoS Pathog.* ; 8(10):e1002958. Doi : 10.1371/journal.ppat.1002958.

League GP, Estévez-Lao TY, Yan Y, Garcia-Lopez VA, Hillyer JF. (2017). *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults: evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasit Vectors.* ; 10(1):367. Doi : 10.1186/s13071-017-2302-6.

Lehmann T, Diabate A. (2008). The molecular forms of *Anopheles gambiae* : A phenotypic perspective. *Infect Genet Evol.* ; 8(5):737-46. Doi : 10.1016/j.meegid.2008.06.003. Review.

Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend G., Lagueux M., Kafatos, F.C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709–718.

Majoline T. Tchioffo, Anne Boissière, Luc Abate, Sandrine E. Nsango, Albert N. Bayibéki, Parfait H. Awono-Ambéné, Richard Christen, Geoffrey Gimonneau and Isabelle Morlais (2016). Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia. *Epithelia. Front. Microbiol.* 6:1500. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01500.

Mamadou O Ndiath, Anna Cohuet, Ablaye Gaye, Lassana Konate, Catherine Mazonot, Ousmane Faye, Christian Boudin, Cheikh Sokhna and Jean-François Trape (2011). Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal* 2011, 10:269.

Mike A. Osta, George K. Christophides, Dina Vlachou and Fotis C. Kafato (2004). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *The Journal of Experimental Biology.* Doi:10.1242/jeb.01066.

Obbard DJ, Callister DM, Jiggins FM, Soares DC, Yan G, Little TJ (2008). The evolution of TEP1, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8 : 274. Doi : 10.1186/1471-2148-8-274.

Tchioffo MT, Boissière A, Churcher TS, Abate L, Gimonneau G, Nsango SE, Awono-Ambéné PH, Christen R, Berry A, Morlais I. *Modulation of malaria infection in Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS One* ; 8(12):e81663. Doi : 10.1371/journal.pone.0081663.

Wondji C., Simard F., Petrarca V., Etang J., Santolamazza F., Della Torre A., Fontenille D. (2005). Species and Populations of the *Anopheles gambiae* Complex in Cameroon with Special Emphasis on Chromosomal and Molecular Forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J. Med. Entomol.* 42(6): 998-1005.

Discussion générale et Conclusion

Les travaux sur la compétence vectorielle des anophèles ont permis d'identifier des gènes pro/antiparasitaires chez le moustique, gènes dont le rôle est déterminant pour la survie/l'élimination du parasite chez le moustique. La plupart de ces gènes ont été identifiés pour leur activité antiparasitaire contre *P. berghei*, parasite murin utilisé comme modèle d'étude de la réponse immunitaire chez le moustique. Mais leur activité reste encore mal connue lors d'une infection avec le parasite humain *P. falciparum* chez les moustiques *An. gambiae* et *An. coluzzii*, les vecteurs majeurs du paludisme en Afrique sub-saharienne. Les mécanismes de la réponse immunitaire à l'origine de l'activation de ces gènes et de l'expression des protéines pro/antiparasitaires ne sont pas encore complètement élucidés (Severo and Levashina, 2014). En conditions naturelles, il a été montré que l'efficacité de *TEPI* à réduire l'infection par *P. falciparum* dépend de l'isolat de parasites et qu'elle est moindre pour les isolats de forte complexité génétique (MOI > 2) (Nsango et al., 2012). D'autres travaux ont rapporté par ailleurs des mécanismes élaborés par le parasite pour échapper à la réponse antiparasitaire chez le moustique : ainsi le gène *Pfs47* exprimé à la surface des ookinètes les protégerait au moment de la traversée de l'épithélium intestinal en empêchant la nitration des parasites, nécessaire pour déclencher la réponse immunitaire *TEPI*-dépendante du moustique (Molina-cruz et al., 2013 ; Ramphul et al., 2015).

C'est dans ce contexte que s'est effectué mon projet de thèse. Nous sommes partis du constat que (1) le phénotype d'infection chez *P. berghei* observé lors de l'inactivation de certains gènes antiparasitaires, dont *TEPI*, *LRIMI* et *APLIC*, n'est pas toujours conservé avec *P. falciparum* (Cohuet et al., 2006 ; Mitri et al., 2009 ; Nsango et al., 2012 ; Eldering et al., 2016) ; (2) le polymorphisme de *TEPI* est un déterminant majeur de la résistance/sensibilité des moustiques aux parasites murins et humains (Blandin et al., 2009 ; White et al., 2010) ; (3) en conditions naturelles de transmission, les interactions *Anopheles-Plasmodium* sont complexes, multifactorielles.

Mon projet avait pour objectifs (1) d'étudier les bases génétiques de la résistance/sensibilité des moustiques *An. gambiae* et *An. coluzzii* et la virulence des isolats naturels de *P. falciparum*, (2) de tester si les facteurs génétiques qui déterminent la compétence vectorielle sont conservés lors d'infections avec *P. berghei* et *P. falciparum*, et (3) d'identifier des corrélations entre génotypes des moustiques, génotypes des parasites et phénotypes (prévalences et niveaux d'infection) après infections expérimentales sur le terrain avec des isolats de *P. falciparum*. En amont du plan expérimental, nous avons comparé les densités de

gamétocytes du sang veineux vs sang capillaire afin d'évaluer l'effet que pourrait avoir l'origine du sang sur l'infectivité des échantillons de parasites prélevés pour les infections expérimentales et la transmission du paludisme chez le moustique. Enfin, les criblages pour détecter des porteurs de gamétocytes nous ont permis d'assembler des données épidémiologiques sur les localités prospectées.

I- Données épidémiologiques

Les infections liées à cette thèse ont été réalisées de 2013 et 2016, pendant les 3 premiers (Mars-Mai) et les 3 derniers (Septembre-Novembre) mois de la saison des pluies par année. La prévalence de l'infection à *P. falciparum* chez les enfants asymptomatiques de 4 à 15 ans en saison des pluies dans les localités prospectées de l'arrondissement de Mfou était de 55,1%, avec un indice gamétocytaire de 8,9%. Ces données sont relativement variables d'une année à une autre (De 51,3% en 2013 à 61,3% en 2016), avec une augmentation des infections mixtes à *P. falciparum* et/ou *P. malariae/P. ovalae* (De 4,9% en 2013 à 21,7% en 2016). Toutefois la prévalence de l'infection à *P. falciparum* varie peu dans les localités de Mfou, car en 2012 une étude réalisée dans le même arrondissement avait observé des données similaires (51,9% d'infection à *P. falciparum* et 8,9% d'indice gamétocytaire) chez les enfants de 4 à 15 ans (Sandeu et al., 2017). De plus, en 2017, les enquêtes parasitologiques réalisées dans ces mêmes villages rapportent toujours une prévalence de 51,3% d'enfants asymptomatiques porteurs de stades asexués de *P. falciparum*, et 9,6% de porteurs de gamétocytes (Morlais et Nsango, données non-publiées). Le portage asymptomatique des stades asexués et sexués est fortement lié à la prémunition de l'hôte vertébré et il varie en fonction de l'âge (Drakeley et al., 2000 ; Bousema et al., 2004 ; Eksi et al., 2006 ; Goncalves et al., 2017). Les groupes d'âge les plus affectés par le portage asymptomatique représentent les enfants de moins de 15 ans ; ils constituent un important réservoir de parasites et participent, à une large part, dans la transmission du paludisme (Bonnet et al., 2003 ; Ouédraogo et al., 2015). L'élimination de ce réservoir devra être prise en compte dans les stratégies de contrôle. Des mesures telles que le traitement de masse durant les périodes de plus faible transmission sont actuellement en cours d'essais cliniques (Dicko et al., 2018 ; Newby et al., 2015).

Nous avons observé dans notre étude que les densités en trophozoïtes variaient significativement d'un village à un autre, allant de 574 à 9179 parasites/ μ L de sang capillaire à Ekoko et Nkolnda respectivement. Le portage de gamétocytes varie de la même manière, passant de 6,2% à 12,2% d'Ekoko à Koumou. Cette hétérogénéité reflète probablement une

exposition différente aux piqûres. En effet, des hotspots de transmission ont fréquemment été décrits, même sur des petites échelles géographiques (Bousema et *al.*, 2012 ; Mogeni et *al.*, 2017 ; Platt et *al.*, 2018). Il serait intéressant de mesurer les paramètres parasitologiques sur une plus longue période et durant les différentes saisons de transmission pour vérifier la stabilité de ces hotspots, ces zones devront être les cibles privilégiées des programmes de lutte contre le paludisme.

II- Comparaison de la densité parasitaire et de l'infectivité des gamétocytes du sang veineux et du sang capillaire :

L'étude de la compétence vectorielle d'*An. gambiae*, la mise en place de nouvelles approches thérapeutiques et l'évaluation de candidats vaccins se fait soit par les techniques de SFA (*Skin Feeding Assay*) ou de MFA (*Membrane Feeding Assay*). Pour des raisons éthiques, il n'est pas envisageable d'effectuer des SFAs avec de multiples répliques. Une étude rétrospective réalisée avec des données issues de quatre pays endémiques (Cameroun, Gambie, Mali, Sénégal) a montré que la méthode SFA produit un taux d'infection des moustiques plus élevé que les MFAs (Bousema *al.*, 2012). Les auteurs ont suggéré que cette variation pourrait être due à la différence de densités parasitaires entre les différentes sources de sang. Nous avons donc entrepris de comparer les charges parasitaires selon les sources de prélèvement des parasites, sang veineux (SV) vs sang capillaire (SC) prélevé au doigt. Et notre étude a été réalisée sur 137 échantillons prélevés chez des sujets asymptomatiques. Nous avons observé, par microscopie, que les densités de parasites asexués et sexués ne diffèrent pas entre les types de prélèvement SV vs SC. D'autres études avaient indiqué que les frottis sanguins réalisés à partir du sang capillaire étaient plus sensibles pour la détection des stades asexués que ceux du sang veineux (Ouedraogo et *al.*, 1991 ; Njunda et *al.*, 2013). Mais la réalisation de frottis minces pour le dépistage et la quantification des parasites, ainsi que l'absence de répliques constituaient une limite dans ces études ; en effet le seuil de détection des parasites sur frottis mince est d'environ 150 à 200 parasites/ μ L de sang (El Ghouszi et Garraud, 2006). Dans notre étude, l'identification et le comptage des stades asexués et sexués de parasites s'est fait sur goutte épaisse, avec un seuil de détection d'environ 10 à 20 parasites/ μ L de sang (El Ghouszi et Garraud, 2006), et trois répliques par source de prélèvement (SV et SC) ont été confectionnées. De plus, les comparaisons dans notre étude ont été faites à l'aide de modèles d'ajustements cumulatifs, afin de prendre en compte le caractère apparié des données, ainsi que l'âge, le sexe et le village des participants.

Notre étude n'a pas montré de différence dans les densités de gamétocytes entre le sang veineux et le sang capillaire. Les données d'infections expérimentales obtenues dans notre dispositif de MFA utilisant du sang veineux suggèrent donc qu'elles auraient été similaires avec du sang capillaire. Il ne nous a cependant pas été possible de réaliser des infections avec du SC pour des raisons pratiques, notamment à cause de la difficulté de prélèvement qui favorise la coagulation du sang. En conclusion, cette validation était importante car nous mettons en série plusieurs (jusqu'à 12) cellules de gorgement avec du sang provenant d'un même porteur de gamétocytes et il ne serait pas possible d'utiliser du sang capillaire pour de tels essais.

III- Répartition géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* dans la ville de Yaoundé et détermination de leur compétence vectorielle :

La répartition géographique d'*An. coluzzii* et *An. gambiae* est hétérogène dans la ville de Yaoundé. Au sud de la ville (Ahala, Mvan, Odza), on retrouve majoritairement (84,66%) *An. coluzzii*, alors qu'au nord (Nkolondom) et à l'ouest (Nkolbisson) *An. gambiae* est l'espèce dominante (73,82%). Ces données sont différentes des celles obtenues lors des prospections antérieures ; car en 2010 nous avons observés qu'Ahala, Mvan et Nkolondom étaient toutes des localités allopatriques, respectivement à *An. coluzzii* (Ahala et Mvan) et *An. gambiae* (Nkolondom) (Nsango et Morlais, non publié). Des observations similaires dans la localité de Simbock au sud-ouest de Yaoundé avaient déjà été rapportées, montrant que la distribution des vecteurs et leurs niches écologiques peuvent subir des variations dans le temps (Wondji et al., 2005). Nos résultats correspondent certainement à des niveaux d'anthropisation ou d'urbanisation différents dans les localités prospectées de la ville. En effet, *An. coluzzii* est reconnue pour coloniser des habitats plus densément urbanisés, alors qu'*An. gambiae* colonise les milieux en zone rurale ou du péri-urbain (Kamdem et al., 2012). En accord avec cette observation, dans notre étude, *An. coluzzii* est moins présente dans les quartiers les plus périphériques. Toutefois, nos collectes larvaires ont été réalisées pendant les saisons pluvieuses, lorsque les densités sont à leur maximum, et l'abondance relative des deux espèces pourrait être différente en saison sèche. En effet, il a été rapporté que ces espèces restreignent l'étendue de leur habitat lorsqu'elles sont moins abondantes (Kamdem et al., 2012).

Nous avons évalué la susceptibilité à l'infection des femelles collectées dans les 5 localités avec des isolats naturels de *P. falciparum*. Les moustiques *An. coluzzii* sont plus infectés qu'*An. gambiae* (prévalence), mais aucune différence statistique n'est observée sur les charges oocystiques des deux espèces. Ces résultats sont en accord avec les observations de

Boissière et collaborateurs (2013), qui avaient rapporté des prévalences d'infection plus élevées chez des populations sympatriques et allopatriques d'*An. coluzzii* collectées dans des gîtes environnants au Cameroun. Dans notre étude, la plus forte compétence vectorielle d'*An. coluzzii* pourrait être liée à l'écologie des stades larvaires, stades du développement où l'immunité basale est induite par les bactéries des gîtes de collectes. En effet, nous avons montré dans des études précédentes que la composition des communautés bactériennes varie selon les gîtes larvaires et qu'au sein d'un même gîte la distribution de ces communautés bactériennes diffère entre le biofilm et les couches d'eau plus profondes (Gimonneau et al., 2014 ; Tchioffo et al., 2016).

La différence de compétence vectorielle entre *An. coluzzii* et *An. gambiae* pourrait aussi s'expliquer par l'effet du polymorphisme de *TEPI*. L'activité antiparasitaire de *TEPI* est fortement liée aux différents allèles, résistants (*R1 et *R2) et sensibles (*S1 et *S2) (Blandin et al., 2004 ; Baxter et al., 2007 ; Blandin et al., 2009 ; White et al., 2010). Dans cette étude, nous avons recherché le polymorphisme de *TEPI* chez les moustiques non-gorgés et gorgés afin d'étudier (1) la répartition géographique des allèles résistants/sensibles en fonction des espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae*, et (2) l'effet du polymorphisme de *TEPI* sur leur compétence vectorielle. Les 4 allèles *R1, *R2, *S1 et *S2 ont été retrouvés chez les 2 espèces, avec *S1 et *S2 majoritaires chez *An. coluzzii* (92,03%) et *S1 et *R2 plus représentés chez *An. gambiae* (89,93%). L'allèle *S1 est le plus représenté chez les 2 espèces (56,53% chez *An. coluzzii* et 76,21% chez *An. gambiae*). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude précédente réalisée à Yaoundé en 2009 et 2010 (Boissière, Morlais et Levashina, données non-publiées). La distribution des génotypes présente elle aussi des différences entre les 2 espèces : les génotypes *S1/S1* et *R2/S1* sont plus représentés chez *An. gambiae*, alors que *S1/S1* et *S1/S2* sont majoritaires chez *An. coluzzii*. Nous avons observé chez *An. coluzzii* un écart à la panmixie en faveur des génotypes *S1/S1*, *S1/S2* et *S2/S2*, ce qui pourrait suggérer une expansion démographique de l'espèce sur son aire de distribution. *An. coluzzii* a une aire de distribution plus limitée qu'*An. gambiae* mais elle s'adapte dans les environnements plus urbanisés (Simard et al., 2009 ; Kamdem et al., 2012). Notons que l'avantage hétérozygote pourrait permettre le maintien d'un fort polymorphisme de *TEPI* dans les populations naturelles de moustiques. Des analyses de génétique de populations, à plus large échelle, sur plusieurs saisons et sur plusieurs loci, seront poursuivies afin de nous permettre de mieux comprendre la dynamique de population de ces 2 vecteurs majeurs dans nos sites d'étude.

Les associations entre le génotype des moustiques pour *TEPI* et leur phénotype lors d'une infection n'ont pu être menées que sur les génotypes les plus représentés du fait du nombre limité d'individus. Nous avons observé que, chez les 2 espèces, les moustiques homozygotes (**SI/SI*) sont moins infectés que les hétérozygotes (**R2/SI* et **SI/S2* chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* respectivement). De même, dans la colonie de moustiques Ndokayo (*An. gambiae*), les moustiques homozygotes *TEPI*SI/SI* étaient moins infectés que les hétérozygotes **R2/SI* au niveau de la prévalence, mais avec des charges oocystiques supérieures. White et collaborateurs (2010) ont également montré que les moustiques hétérozygotes **R1/SI* sont porteurs de moins d'oocystes que les homozygotes **SI/SI*. Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats et évaluer l'importance du statut homozygote vs hétérozygote, et du rôle de chaque allèle dans le contrôle de la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis de *P. falciparum*.

En conclusion, nos données confirment certaines observations faites sur le terrain et nous proposons de nouvelles pistes à explorer avec un échantillonnage plus important pour permettre de détecter une association entre génotypes pour *TEPI* et phénotype d'infection sur le terrain. La collection de moustiques de terrain assemblée pourra également être utilisée pour évaluer le polymorphisme d'autres gènes d'intérêt et leur corrélation avec la sensibilité des moustiques à *P. falciparum*, ainsi que l'adaptation des vecteurs dans leur environnement.

IV- D'autres facteurs génétiques que *TEPI* déterminent la charge oocystique des Ngouso lors d'une infection avec *P. berghei* :

Afin d'identifier de nouveaux facteurs génétiques contrôlant la compétence vectorielle des moustiques, nous avons isolé deux lignées de moustiques S1high et S1low par sélections successives à partir d'une lignée parentale portant l'allèle « sensible » de *TEPI* (*TEPI*SI*) lors d'infections avec *P. berghei*.

La différence des charges oocystiques, qui n'est pas observée sur la prévalence, indique que les facteurs génétiques qui déterminent ces 2 traits sont, au moins en partie, différents. Et l'impossibilité d'isoler des différences en terme de prévalence suggèrent que la lignée parentale serait dépourvue des polymorphismes requis pour limiter la prévalence, ou bien que nous les avons perdus au cours des sélections, chose d'autant plus simple si ce trait est déterminé par plusieurs loci non liés. Notons enfin que la différence entre les charges oocystiques des deux lignées augmente au fur et à mesure des sélections (iso3, iso5 et iso6), contre *P. berghei* et *P. falciparum*.

Certaines études rapportent que l'application de DBH (Dibenzoylhydrazine), une forme synthétique de l'hormone stéroïdienne 20E (20-hydroxyecdysone) qui est transférée aux femelles par les mâles pendant l'accouplement, réduit significativement la sensibilité des moustiques femelles à l'infection à *P. falciparum* (Gabrieli et al., 2014 ; Childs et al., 2016) tandis que d'autres suggéraient que l'absence d'accouplement avant infection diminuait la prévalence (Mara Lawnizack, données non publiées). Nos données préliminaires suggèrent que la différence de charge oocystique chez les moustiques S1high vs S1low n'est pas due au statut d'accouplement.

Des croisements entre ces lignées ont été réalisés afin de cartographier les régions génomiques qui déterminent la différence de charge oocystique entre les S1high et les S1low (*QTLmapping*, en cours).

V- Conservation partielle des facteurs génétiques qui contrôlent la compétence vectorielle des moustiques :

Afin d'évaluer le degré de conservation des facteurs génétiques qui déterminent la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis de différents parasites, nous avons infecté les lignées L3-5 et NG (respectivement résistante et sensible à *P. berghei*), et S1low vs S1high avec des isolats naturels de *P. falciparum* prélevés sur des porteurs de gamétocytes durant plusieurs saisons de transmission. Quelle que soit la lignée, on observe une plus grande variabilité des phénotypes lors d'infections avec des isolats naturels de *P. falciparum* que lors d'infections avec *P. berghei*, certainement à cause de la diversité des isolats d'un point de vue complexité génétique (MOI), gamétocytémie, sex-ratio, stade de développement des gamétocytes, génotypes (Nsango et al., 2012 ; Morlais et al., 2015 ; Da et al., 2015 ; Bradley et al., 2018).

Nos travaux montrent que les L3-5 sont globalement plus résistants au parasite humain *P. falciparum* par rapport aux Nguosso, ce qui suggère que certains facteurs génétiques impliqués dans la réponse immunitaire contre *P. berghei* chez *An. coluzzii* sont en partie conservés avec *P. falciparum*. C'est le cas notamment de *TEPI* dont l'activité antiparasitaire est démontrée contre *P. berghei* (Blandin et al., 2004, 2009) et *P. falciparum* (White et al., 2010). Des études antérieures ont montré que les polymorphismes de *APLIA* (Mitri et al., 2009) et *Toll11* (Redmond et al., 2015) contribueraient à déterminer la résistance des moustiques contre *P. falciparum*. Nous avons collecté des moustiques individuels pour chacune des expériences de la dernière saison d'infection (Septembre 2015-Mars 2016) afin de comparer les génomes des L3-5 plus infectés vs L3-5 non-infectés (travaux en cours). Ces données nous

permettront d'une part d'évaluer le degré de polymorphisme dans les gènes candidats cités plus haut, mais également de mener une étude d'association afin d'identifier sans a priori d'autres régions du génome liées à la résistance des L3-5 vis-à-vis de *P. falciparum*.

La diversité génétique des isolats de parasite contribue à la variabilité des mécanismes d'activation et de régulation de la réponse antiparasitaire. Cette observation a été reportée dans les travaux de Molina-cruz et collaborateurs (Molina-cruz et *al.*, 2012) qui montrent que chez *An. coluzzii* l'inactivation de *LRIM1* et *APLI* par RNAi atténue considérablement la résistance des moustiques vis-à-vis de la souche 7G8 provenant d'Amérique du sud, ce qui n'est pas le cas avec la souche NF54 d'origine Africaine avec laquelle on n'observe pas l'implication de *LRIM1* dans la réponse contre le parasite. Par ailleurs cette étude rapporte que l'activité antiparasitaire de *TEP1* varie en fonction de la souche de parasite ; contre la souche 7G8, *TEP1* participe largement à l'élimination des parasites par lyse et mélanisation ainsi qu'au contrôle de l'intensité d'infection, ce qui n'est pas le cas contre la souche NF54. Le groupe du Dr. Barillas Mury a de plus identifié le gène *Pfs47* dont le polymorphisme chez *P. falciparum* détermine la capacité des parasites à infecter les moustiques L3-5 dans un contexte d'infection de laboratoire (Molina-cruz et *al.*, 2013 ; Ramphul et *al.*, 2014 ; Molina-cruz et *al.*, 2017). Nos données indiquent au contraire une absence de corrélation entre le génotype des isolats de parasites pour *Pfs47* et leur capacité à infecter les L3-5. Cette observation est aussi reportée par Eldering et collaborateurs qui n'ont pas trouvé de corrélation entre les génotypes de *Pfs47* dans deux souches de laboratoire (NF165 et NF166) et leur sensibilité à la réponse antiparasitaire TEP1-dépendante (Eldering et *al.*, 2016). Dans nos travaux, les échantillons collectés individuellement sont analysés pour comparer les génotypes des isolats virulents vs avirulents chez les L3-5 à partir des isolats de gamétocytes, et si possible, comparer les génotypes des parasites qui ont infecté les NG et ceux qui ont infectés les L3-5 à partir des intestins (porteurs d'oocystes) disséqués individuellement (Selective Whole Genome Amplification en développement au *Sanger institut*, collaboration avec l'équipe de Mara Lawniczak).

Enfin, nous avons comparé le phénotype des moustiques S1high vs S1low vis-à-vis de *P. falciparum*. De façon inattendue, nous avons observé un phénotype opposé à celui sélectionné avec *P. berghei*, avec des charges oocystiques plus importantes chez les S1low que chez les S1high. Le fait que les différences de charges oocystiques entre lignées s'accroissent au fil des sélections, que ce soit lors d'infections avec *P. berghei* ou avec *P. falciparum*, suggère que les facteurs génétiques que nous avons sélectionnés comme antagonistes pour *P. berghei*

pourraient être agonistes pour *P. falciparum* (ou réciproquement), même si on ne peut pas exclure que des facteurs indépendants influençant le développement de *P. falciparum* aient ségrégué par hasard, par effet fondateur, lors des étapes de sélection des S1high et S1low. Toutefois, l'inversion des phénotypes avec *P. berghei* et *P. falciparum* corrobore avec des études antérieures qui ont montré que certains médiateurs de la réponse contre le parasite murin (LRIM1, APL1C, CTL4, CTLMA2) ne seraient pas impliqués dans la réponse contre le parasite humain (Cohuet et al., 2006 ; Mitri et al., 2009). Et les voies de signalisation impliquées dans les interactions contre *P. berghei* seraient, au moins en partie, différentes de celles retrouvées contre *P. falciparum* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*. Des travaux antérieurs ont démontré que la voie Toll est induite dans la réponse contre *P. berghei* (Frolet et al., 2006), alors la voie Imd est fortement impliquée dans la réponse contre *P. falciparum* (Mitri et al., 2009 ; Garver et al., 2009).

En conclusion, nos données illustrent la complexité des interactions moustiques parasites et suggèrent une conservation partielle des polymorphismes qui déterminent la compétence vectorielle des moustiques, avec potentiellement des effets opposés vis-à-vis des parasites murin *P. berghei* et humain *P. falciparum*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

- 1- **Abeku T.A., Kristan M., Jones C., Beard J., Mueller D.H., Okia M., Rapuoda B., Greenwood B., Cox J. (2008).** Determinants of the accuracy of rapid diagnostic tests in malaria case management : evidence from low and moderate transmission settings in the East African highlands. *Malaria Journal*. 7:202.
- 2- **Akogbeto M., Romano R. (1999).** Infectivity of *Anopheles melas* vis-a-vis *Plasmodium*
- 3- **Antonio Nkondjio C. (2003).** *Anopheles moucheti* Evans, 1925 au Cameroun : Biologie, morphologie, structure génétique et implication dans la transmission du paludisme. Yaoundé (CMR) ; Montpellier : Université de Yaoundé 1 ; IRD, 16 p.
- 4- **Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Kengne P., Mukwaya L., Awono-Ambene P., Fontenille D., Simard F. (2008).** Population structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in the equatorial forest region of Africa. *Malar J.* ; 7:120.
- 5- **Antonio-Nkondjio C., Simard F. (2013).** Highlights on *Anopheles nili* and *Anopheles moucheti*, Malaria Vectors in Africa. In: Manguin S, editor. *Anopheles Mosquitoes: New Insights into Malaria Vectors. InTech* : Chapter 8.
- 6- **Antonio-Nkondjio C., Sonhafouo-Chiana N., Ngadjeu C.S., Doumbe-Belisse P., Talipouo A., Djamouko-Djonkam L., Kopya E., Bamou R., Awono-Ambene P., Wondji C.S. (2017).** Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasit Vectors* ; 10(1):472. Review.
- 7- **Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois A.C., Khim N., Kim S., Duru V., Bouchier C., Ma L., Lim P., Leang R., Duong S., Sreng S., Suon S., Chhor C.M., Bout D.M., Ménard S., Rogers W.O., Genton B., Fandeur T., Miotto O., Ringwald P., Le Bras J., Berry A., Barale J.C., Fairhurst R.M., Benoit-Vical F., Mercereau-Puijalon O., Ménard D. (2014).** A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* ; 505(7481):50-5.
- 8- **Awono-Ambene H.P., Kengne P., Simard F., Antonio-Nkondjio C., Fontenille D. (2004).** Description and bionomics of *Anopheles (Cellia) ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *J Med Entomol.* ; 41(4):561-8.
- 9- **Ayala D., Costantini C., Ose K., Kamdem G.C., Antonio-Nkondjio C., Agbor J.P., Awono-Ambene P., Fontenille D., Simard F. (2009).** Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon. *Malar J.* ; 8:307.
- 10- **Babiker H.A., Abdel-Wahab A., Ahmed S., Suleiman S., Ranford-Cartwright L., Carter R., Walliker D. (1999).** Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* ; 99(1):143-8.
- 11- **Babiker H.A., Ranford-Cartwright L.C., Walliker D. (1999).** Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* ; 93 Suppl 1:11-4. Review.

- 12- **Barillas-Mury C., Han Y.S., Seeley D., Kafatos F.C. (1999).** *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* ; 18(4):959-67.
- 13- **Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J.A. and Kafatos, F.C. (1996).** Immune factor Gambifl, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* ; 15, 4961-4701.
- 14- **Barry A.E., Arnott A. (2014).** Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol.* ; 5:359. Review.
- 15- **Bassene H., Kengne P., Ndiath M.O., Sokhna C., Dupressoir T., Fontenille D., Trape J.F. (2009).** Comparison of PCR, ELISA-CSP and direct microscopic observation methods for the detection of *Plasmodium falciparum* sporozoites in *Anopheles gambiae* M in Senegal. *Bull Soc Pathol Exot* ; 102(4):233-7.
- 16- **Baxter Richard H. G., Chung-I Chang, Yogarany Chelliah, Stéphanie Blandin, Elena A. Levashina, and Johann Deisenhofs (2007).** Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *PNAS.0704967104* ; 11615–11620.
- 17- **Beadle C., Long G.W., Weiss W.R., McElroy P.D., Maret S.M., Oloo A.J., Hoffman S.L. (1994).** Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* ; 343(8897):564-568.
- 18- **Beier J.C. (1998).** Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* ; 43:519-43.
- 19- **Beier J.C., Perkins P.V., Wirtz R.A., Koros J., Diggs D., Gargan T.P., Koech D.K. (1988).** Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol.* ; 25(1):9-16.
- 20- **Beier M.S., Pumpuni C.B., Beier J.C., Davis J.R. (1994).** Effects of paraaminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* ; 31: 561–565.
- 21- **Bigoga J.D., Manga L., Titanji V.P., Coetzee M., Leke R.G. (2007).** Malaria vectors and transmission dynamics in coastal south-western Cameroon. *Malar J.* ; 1475-2875-6-5.
- 22- **Billingsley P.F., Hecker H. (1991).** Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) : activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol.* ; 28(6):865-71.
- 23- **Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A.E., Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R.E., Morris H.R. (1998).** Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* ; 392(6673):289-92.
- 24- **Blandin S. A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E. A., Steinmetz L. M. (2009).** Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science*, 326(5949):147-150.

- 25- Blandin S., Levashina E. (2004).** Mosquito immune responses against malaria parasites. *Current Opinon in Immunology* ; 16:16-20.
- 26- Blandin S., Moita L.F., Köcher T., Wilm M., Kafatos F.C., Levashina E.A. (2002).** Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep.* 3, 852–856.
- 27- Blandin S., Shin-Hong Shiao, Luis F. Moita, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Fotis C. Kafatos, Levashina E.A. (2004).** Complement-Like Protein TEPI is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell* ; 116, 661–670.
- 28- Blandin S.A., Levashina E.A. (2007).** Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunol Rev.* ; 219:8-16. Review.
- 29- Boissiere A., Gimonneau G., Tchioffo M.T., Abate L., Bayibéki A., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Morlais I. (2013).** Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. *PLoS One* 8(1): e54820.
- 30- Boissière 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(5):e1002742.
- 31- Boudin C., Diop A., Gaye A., Gadiaga L., Gouagna C., Safeukui I. Bonnet S. (2005).** *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity in three areas with perennial or seasonal endemicity and different levels of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ; 73 (6), 1090-1095.
- 32- Boudin C., Robert V., Verhave J.P., Carnevale P., Meuwissen J.H. (1988).** The ELISA technic in the screening of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Bull World Health Organ.* ; 66(1):87-97.
- 33- Boudin C., Van Der Kolk M., Tchuinkam T., Gouagna C., Bonnet S., Safeukui I., Mulder B., Meunier J.Y., Verhave J.P. (2004).** *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunol.* ; 26(2):105-10.
- 34- Bousema Teun, Rhoel R. Dinglasan, Isabelle Morlais, Louis C. Gouagna, Travis van Warmerdam, Parfait H. Awono-Ambene et al. (2012).** Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected *Plasmodium falciparum* Gametocyte Carriers. *PLoS One* 7(8): e42821.
- 35- Brengues J. & Coz J. (1973).** Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (SP. A.) et d'*Anophe funestus* Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest.
- 36- Brown M.R., Paskewitz S.M., Collins F.H., Lea A.O. (1989).** Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*. *J Parasitol.* ; 75(4):594-600.

- 37- Brunhes J., Le Goff G., Geoffroy B. (1999).** Afro-tropical anopheline mosquitoes. III. Description of three new species : *Anopheles carnevalei* sp. nov., *An. hervyi* sp. nov., and *An. dualaensis* sp. nov., and resurrection of *An. rageaui* Mattingly and Adam. *J Am Mosq Control Assoc.* ; 15(4):552-8.
- 38- Bryant W.B., Michel K. (2014).** Blood feeding induces hemocyte proliferation and activation in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* Giles. *J Exp Biol.* ; 217(Pt 8):1238-45.
- 39- Burkot T.R., Williams J.L., Schneider I. (1984).** Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* ; 33(5):783-8.
- 40- Burkot T.R., Zavala F., Gwadz R.W., Collins F.H., Nussenzweig R.S., Roberts D.R. (1984).** Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* ; 33(2):227-31.
- 41- Carnevale P. et Robert V. (2009).** Les anophèles. Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. *Marseille ; France.*392p.
- 42- Carnevale P., (1974).** Variations saisonnières d'une population d'*Anopheles nili* (Theobald) 1904 en République populaire du Congo. *Cah. Orstom, sér. Ent. Méd.*, XII : 165-174.
- 43- Carnevale P., Bitsindou P., Diomandé L., Robert V. (1992).** Insecticide impregnation can restore the efficiency of torn bed nets and reduce man-vector contact in malaria endemic areas. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* ; 86(4):362-4.
- 44- Castillo J.C., Robertson A.E., Strand M.R. (2006).** Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* ; 36(12):891-903.
- 45- Castillo Julio César, Ana Beatriz Barletta Ferreira, Nathanie Trisnadi, and Carolina Barillas Mury (2017).** Activation of mosquito complement antiplasmodial response requires cellular immunity. *Sci Immunol.* 1505.
- 46- Castillo Julio, Mark R. Brown, Michael R. Strand (2011).** Blood Feeding and Insulin-like Peptide 3 Stimulate Proliferation of Hemocytes in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 7(10): e1002274.
- 47- Choumara Bailly H., Adam J.P. (1959).** Additional notes on the morphology, taxonomic positions and biology of *Anopheles* (*Neomyzomyia*) *maliensis* Bailly-Choumara and Adam, 1959. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* ; 53:110-9.
- 48- Christophides G., Zdobnov E., Barillas Mury C., Birney E., Blandin S., Blass C., Brey P. T., Collins F. H., Danielli A., Dimopoulos G., Hetru C., Hoa N. T., Hoffmann J. A., Kanzok S. M., Letunic I., Levashina E. A., Loukeris T., G. Lycett G., Meister S., Michel K. Moita L. F, Müller HM. Osta M. A. Paskewitz S. M. Reichhart J. M., Rzhetsky A., Troxler L., Vernick K. D., Vlachou D., Volz J., von Mering C., Xu J., Zheng L., Bork P. et Kafatos F. C. (2002).** Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.*, 298 (5591): 159-165.

- 49- Cirimotich C.M., Dong Y., Clayton A.M., Sandiford S.L., Souza-Neto J.A., et al. (2011).** Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 332: 855–858.
- 50- Cirimotich C.M., Dong Y., Garver L.S., Sim S., Dimopoulos G. (2010).** Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol.* ; 34(4):387-95.
- 51- Clayton A.M., Dong Y., Dimopoulos G. (2014).** The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. *J Innate Immun.*;6(2):169-81.
- 52- Clements A.N. (1992).** The biology of mosquitoes : Developement, nutrition and reproduction. *New York: Chapman & Hall.* 1-509.
- 53- Coetzee M., Hunt R. H., Wilkerson R., DellaTorre A., Coulibaly M. B. & Besansky, N. J. (2013).** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619, 246–274.
- 54- Cohuet A., Dia I., Simard F., Raymond M., Fontenille D. (2004).** Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. *Insect Mol Biol.*;13(3):251-8.
- 55- Cohuet A., Osta M.A., Morlais I., Awono-Ambene P.H., Michel K., Simard F., Christophides G.K., Fontenille D. and Kafatos F.C. (2006).** *Anopheles* and *Plasmodium* : from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285-9.
- 56- Cohuet A., Simard F., Toto J.C., Kengne P., Coetzee M., Fontenille D. (2003).** Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg.* ; 69(2):200-5.
- 57- Cohuet A., Simard F., Wondji C.S., Antonio-Nkondjio C., Awono-Ambene P., Fontenille D. (2004).** High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol.*;41(5):901-5.
- 58- Collins F.H., Petrarca V., Mpofu S., Brandling-Bennett A.D., Were J.B., Rasmussen M.O., Finnerty V. (1988).** Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* ; 39(6):545-50.
- 59- Collins F.H., Procell P.M., Campbell G.H., Collins W.E. (1988).** Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Plasmodium malariae* sporozoites in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* ; 38(2):283-8.
- 60- Collins F.H., Sakai R.K., Vernick K.D., Paskewitz S., Seeley D.C., Miller L.H., et al. (1986).** Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science.* 1986;234:607–10.
- 61- Coluzzi M. (1984).** Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull World Health Organ.* ; 1984;62.

- 62- Coluzzi M., Sabatini A., della Torre A., Di Deco M.A., Petrarca V. (2002).** A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science.* ; 298(5597):1415-8.
- 63- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M.A. (1979).** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;73(5):483-97. Review.
- 64- Costantini C., Ayala D., Guelbeogo W.M., Pombi M., Some C.Y., Bassole I.H., Ose K., Fotsing J.M., Sagnon N., Fontenille D., Besansky N.J., Simard F. (2009).** Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol.*;9:16.
- 65- Coutinho-Abreu I.V., Ramalho-Ortigao M. (2010).** Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 105(1):1-12. Review.
- 66- Da D.F., Churcher T.S., Yerbanga R.S., Yaméogo B., Sangaré I., Ouedraogo J.B., Sinden R.E., Blagborough A.M., Cohuet A. (2015).** Experimental study of the relationship between Plasmodium gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Exp Parasitol.*;149:74-83.
- 67- Dambach P., Schleicher M., Stahl H.C., Traoré I., Becker N., Kaiser A., Sié A., Sauerborn R. (2016).** Routine implementation costs of larviciding with *Bacillus thuringiensis israelensis* against malaria vectors in a district in rural Burkina Faso. *Malar J.* ; 15(1):380.
- 68- Dambach P., Traoré I., Becker N., Kaiser A., Sié A., Sauerborn R. (2014).** EMIRA : Ecologic Malaria Reduction for Africa - innovative tools for integrated malaria control. *Glob Health Action.* ; 7(1):25908.
- 69- Dambach P., Traoré I., Kaiser A., Sié A., Sauerborn R., Becker N. (2016).** Challenges of implementing a large scale larviciding campaign against malaria in rural Burkina Faso. *BMC Public Health.* ; 16(1):1023.
- 70- Darriet F. (2000).** Ebola and Marburg virus : entomologic hypothesis to confirm. *Med Trop* ; 60(3):303-4.
- 71- De Meillon B. (1951).** Malaria survey of South-West Africa. *Bull World Health Organ.* ; 4(3):333-417.
- 72- De Meillon B. (1951).** Species and varieties of malaria vectors in Africa and their bionomics. *Bull World Health Organ.* ; 4(3):419-41.
- 73- Della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V., Coluzzi M. (2001).** Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol.* ; 10(1):9-18.
- 74- Dennison N.J., Jupatanakul N., Dimopoulos G. (2014).** The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci.* ; 3:6-13.

- 75- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Guiguemdé R.T., Brengues C., Guillet P., Hemingway J., Hougard J.M. (2002).** First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, west Africa. *Parasitologia.* ; 44(3-4):157-8.
- 76- Diabaté A., Dabiré R. K., Kengne P., Brengues C., Baldet T., Ouari A., Simard F., Lehmann T. (2006).** Mixed Swarms of the Molecular M and S Forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Sympatric Area from Burkina Faso. *Population and Community Ecology* ; 43:480-483.
- 77- Dimopoulos G., Christophides G.K., Meister S., Schultz J., White K.P., BarillasMury C. and Kafatos, F.C. (2002).** Genome expression analysis of *Anopheles gambiae* : responses to injury, bacterial challenge and malaria infection. *PNAS* ; 99, 8814-8819.
- 78- Djogbénu L. (2009).** Vector control methods against malaria and vector resistance to insecticides in Africa. *Med Trop.* 2;69(2):160-4.
- 79- Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A.P., Tarning J., Lwin K.M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S.J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S.S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N.P., Lindegardh N., Socheat D., White N.J. (2009).** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* ; 361(5):455-67.
- 80- 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.
- 81- Dong Y., Cirimotich C.M., Pike A., Chandra R., Dimopoulos G. (2012).** *Anopheles* NF- κ B-regulated splicing factors direct pathogen-specific repertoires of the hypervariable pattern recognition receptor AgDscam. *Cell Host Microbe.* ; 12(4):521-30.
- 82- Dong Y., Manfredini F., Dimopoulos G. (2009).** Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* ; 5: e1000423.
- 83- Dong Y., Taylor H.E., Dimopoulos G. (2006).** AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* ; 4(7):e229.
- 84- Dorsey G., Kanya M.R., Singh A., Rosenthal P.J. (2001).** Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfcrt And pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala Uganda. *J Infect Dis.* ; 183:1417–20.
- 85- El Ghouzzi M. H. et Garraud O. (2006).** Parasites et transfusion sanguine: causes et conséquences. *Hématologie.* ; (12) 129-139.
- 86- Eldering M., Morlais I., van Gemert G.J., Van de Vegte-Bolmer M., Graumans W., Siebelink-Stoter R., Vos M., Abate L., Roeffen W., Bousema T., Levashina E.A., Sauerwein R.W. (2016).** Variation in susceptibility of African *Plasmodium falciparum* malaria parasites to TEP1 mediated killing in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports* ; 6:20440.
- 87- Etang J., Chouaibou M., Toto J.C., Faye O., Manga L., Samè-Ekobo A., Awono-Ambene P., Simard F. (2007).** A preliminary test of the protective efficacy of permethrin-

treated bed nets in an area of *Anopheles gambiae* metabolic resistance to pyrethroids in north Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* ; 101(9):881-4.

88- Etang J., Manga L., Toto J.C., Guillet P., Fondjo E., Chandre F. (2007). Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Cameroon. *J Vector Ecol.* ; 32(1):123-33.

89- Etang J., Pennetier C., Piameu M., Bouraima A., Chandre F., Awono-Ambene P., Marc C., Corbel V. (2016). When intensity of deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae s.l.* leads to loss of Long Lasting Insecticidal Nets bio-efficacy : a case study in north Cameroon. *Parasit Vectors.* ; 9:132.

90- Fanello C., Santolamazza F., Della Torre A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular form of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology.* 16, 461-464.

91- Favia G., Lanfrancotti A., Spanos L., Siden-Kiamos I., Louis C. (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Molecular Biology* ; 10:19-23.

92- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J.B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G., Simard F. (2003). Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data. *Med Trop.* ; 63(3):247-53. Review.

93- Foquet L., Hermsen C.C., Van Gemert G.J., Van Braeckel E., Weening K.E., Sauerwein R., Meuleman P., Leroux-Roels G. (2014). Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Invest.* ; 124(1):140-4.

94- Fossog Tenne B., Rodolphe Poupardin, Carlo Costantini, Parfait Awono-Ambene, Charles S. Wondji, Hilary Ranson, Christophe Antonio-Nkondjio (2013). Resistance to DDT in an Urban Setting : Common Mechanisms Implicated in Both M and S Forms of *Anopheles gambiae* in the City of Yaoundé Cameroon. *PLoS One* ; 8(4): e61408.

95- Fouet C., Kamdem C., Gamez S., White B.J. (2017). Extensive genetic diversity among populations of the malaria mosquito *Anopheles moucheti* revealed by population genomics. *Infect Genet Evol.* ; 48:27-33.

96- Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W., Hoffmann J.A., Blandin S.A., Levashina E.A. (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of *Plasmodium*. *Cell Host Microbe.* ; 5(3):273-84.

97- Franke-Fayard B., Trueman H., Ramesar J., Mendoza J., Van der Keur M., Van der Linden R., Sinden R.E., Waters A.P., Janse C.J. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* ; 137(1):23-33.

98- Frizzi G. (1953). Extension of the salivary chromosome method to *Anopheles claviger*, *quadrimaculatus* and *aquasalis*. *Nature.* ; 171(4363):1072.

- 99- **Frizzi G., Holstein M. (1956).** Etude cytogénétique d'*Anopheles gambiae*. *Bull World Health Organ.* ; 1956;15(3-5):425-35.
- 100- **Frolet C., Thomas M., Blandin M., Hoffman J., and Leveshina E. (2006).** Boosting *NF-kB*-Dependente Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghei* . *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg; France. Immunology* ; 25, 677-685.
- 101- **Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazekas A., Macias V.M., Bier E., James A.A. (2015).** Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(49):E6736-43.
- 102- **Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., et al., (2002).** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* ; 419, 498-511.
- 103- **Garrett-Jones C. (1964).** The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ.* ; 30:241-61.
- 104- **Garver L.S., Bahia A.C., Das S., Souza-Neto J.A., Shiao J., Dong Y., Dimopoulos G. (2012).** *Anopheles* Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-*Plasmodium* action. *PLoS Pathog.* ; 8(6):e1002737.
- 105- **Garver L.S., de Almeida Oliveira G., Barillas-Mury C. (2013).** The JNK pathway is a key mediator of *Anopheles gambiae* antiplasmodial immunity. *PLoS Pathog.* ; 9(9):e1003622.
- 106- **Garver L.S., Dong Y. and Dimopoulos G. (2009).** Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse Anopheline Species. *PLoS Pathogens* ; 5, e1000335.
- 107- **Gbédandé K., Fievet N., Viwami F., Ezinmegnon S., Issifou S., Chippaux J.P., Dossou Y., Moutairou K., Massougbojji A., Ndam N., de Jongh W.A, Søgaard T.M.M, Salanti A., Nielsen M.A., Esen M., Mordmüller B., Deloron P., Luty A.J.F. (2017).** Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC : Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine* ; 35(27):3474-3481.
- 108- **Gendrin M., Turlure F., Rodgers F.H., Cohuet A., Morlais I., Christophides G.K. (2017).** The Peptidoglycan Recognition Proteins PGRPLA and PGRPLB Regulate *Anopheles* Immunity to Bacteria and Affect Infection by *Plasmodium*. *J Innate Immun.* ; 9(4):333-342.
- 109- **Gimonneau G., Pombi M., Choisy M., Morand S., Dabiré R.K., Simard F. (2012).** 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(1):9-17.
- 110- **Gimonneau G., Tchioffo M.T., Abate L., Boissière A., Awono-Ambéné P.H., Nsango S.E., Christen R., Morlais I. (2014).** Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infect Genet Evol.* ; 28:715-24.

- 111- Gupta L., Molina-Cruz A., Kumar S., Rodrigues J., Dixit R., Zamora R.E., Barillas-Mury C. (2009).** The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium in the mosquito *Anopheles gambiae*.
- 112- Hamon J., Rickenbach A., Robert P. (1956).** 2nd Contribution on mosquitoes of Dahomey with notes on those of Togoland. *Ann Parasitol Hum Comp.* ; 31(5-6):619-35.
- 113- Hanney P.W. (1960)** The mosquitos of Zaria Province, Northern Nigeria. *Bull. ent. Res.* ; 51. pp, 145-171.
- 114- 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(1):e30849.
- 115- Hawking F., Wilson M.E., Gammage K. (1971).** Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* ; 65(5):549-59.
- 116- Hecker R., (1997).** Participatory action research as a strategy for empowering aboriginal health workers. *Aust N Z J Public Health.* ; 21(7):784-8.
- 117- Hervy J.P., G. Le Goff, B. Geoffroy, JP. Hervé, L. Manga and J. Brunhes. (1998).** Les anophles de la région Afro-tropicale. *Logiciel d'identification et d'enseignement. ORSTOM édition, série Didactique. Paris, France.*
- 118- Hillyer J.F. (2010).** Mosquito immunity. *Adv Exp Med Biol.* ; 708:218-38.
- 119- Hillyer J.F., Schmidt S.L., Fuchs J.F., Boyle J.P., Christensen B.M. (2005).** Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol.* ; 7(1):39-51.
- 120- Hillyer Juliàn F. and Michael R. Strand (2014).** Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Curr Opin Insect Sci.* ; 3: 14–21.
- 121- Holm I., Lavazec C., Garnier T., Mitri C., Riehle M.M., Bischoff E., Brito-Fravallo E., Takashima E., Thierry I., Zettor A., Petres S., Bourgoquin C., Vernick K.D., Eiglmeier K. (2012).** Diverged alleles of the *Anopheles gambiae* leucine-rich repeat gene APL1A display distinct protective profiles against Plasmodium falciparum. *PLoS One.* ; 7(12):e52684.
- 122- Horler E., Briegel H., (1995).** Proteolytic enzymes of female *Anopheles* : biphasic synthesis, regulation, and multiple feeding. *Insect Biochem. Physiol.* 28: 189–205
- 123- Imwong M., Hanchana S., Malleret B., Rénia L., Day N.P., Dondorp A., Nosten F., Snounou G., White N.J. (2014).** High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol.* ; 52(9):3303-9.
- 124- Ingabire C.M., Hakizimana E., Rulisa A., Kateera F., Van Den Borne B., Muvunyi C.M., Mutesa L., Van Vugt M., Koenraadt C.J.M, Takken W., Alaii J. (2017).** Community-based biological control of malaria mosquitoes using *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) in Rwanda: community awareness, acceptance and participation. *Malar J.* ; 16(1):399.

- 125- Kamareddine L., Nakhleh J., Osta M.A. (2016).** Functional Interaction between Apolipoproteins and Complement Regulate the Mosquito Immune Response to Systemic Infections. *J Innate Immun.* ; 8(3):314-26.
- 126- Kamau E., Tolbert L.S., Kortepeter L., Pratt M., Nyakoe N., Muringo L., Ogutu B., Waitumbi J.N., Ockenhouse C.F. (2011).** Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* ; 49(8):2946-53.
- 127- Kamdem C., Tene Fossog B., Simard F., Etouna J., Ndo C., Kengne P., Boussès P., Etoa F.X., Awono-Ambene P., Fontenille D., Antonio-Nkondjio C., Besansky N.J., Costantini C. (2012).** Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One.* ; 7(6):e39453.
- 128- Kengne P., Antonio Nkondjio C., Awono Ambene H.P., Simard Frédéric, Awolola T.S., Fontenille D. (2007).** Molecular differentiation of three closely related members of the mosquito species complex, *Anopheles moucheti*, by mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism. *Medical and Veterinary Entomology* ; 21 (2), p. 177-182.
- 129- Kengne P., Awono-Ambene H.P., Antonio-Nkondjio C., Fontenille D. (2003).** Development of a PCR (polymerase chain reaction) specific for complex *Anopheles nili* (Theobald) 1904 species in Cameroon. *Bull Soc Pathol Exot.* ; 96(3):165-7.
- 130- Kengne P., Awono-Ambene P., Antonio-Nkondjio C., Simard F., Fontenille D. (2003).** Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors. *Med Vet Entomol.* ; 17(1):67-74.
- 131- Kengne P., C. Antonio-Nkondjio, H.P. Awono-Ambene, F. Simard, T.S. Awolola and D. Fontenille. (2007).** Molecular differentiation of three closely related members of the mosquito species complex, *Anopheles moucheti*, by mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism. *The Royal Entomological Society, Medical and Veterinary Entomology* ; 21, 177–182.
- 132- King J.G., Hillyer J.F., (2012).** Infection-Induced Interaction between the Mosquito Circulatory and Immune Systems. *PLoS Pathog* ; 8(11): e1003058.
- 133- Knowles R. and Gupta B.M.D. (1932).** A study of monkey- malaria and its experimental transmission to man. *Ind. Med. Gaz.* ; 67, 301-320.
- 134- Koekemoer L.L., Kamau L., Hunt R.H., Coetzee M. (2002).** A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg.* ; 66(6):804-11.
- 135- Kwon H., Arends B.R., Smith R.C. (2017).** Late-phase immune responses limiting oocyst survival are independent of TEPI function yet display strain specific differences in *Anopheles gambiae*. *Parasit Vectors.* ; 10(1):369.
- 136- Laurens M.B., Kouriba B., Bergmann-Leitner E., Angov E., Coulibaly D., Diarra I., Daou M., Niangaly A., Blackwelder W.C., Wu Y., Cohen J., Ballou W.R., Vekemans J., Lanar D.E., Dutta S., Diggs C., Soisson L., Heppner D.G., Doumbo O.K., Plowe C.V.,**

- 137- Thera M.A. (2017).** Strain-specific *Plasmodium falciparum* growth inhibition among Malian children immunized with a blood-stage malaria vaccine. *PLoS One.* ; 12(3):e0173294.
- 138- Law Alex S.K. and Dodds Alister W. (1996).** The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science* ; 6:263-274.
- 139- Lawniczak M.K., Emrich S.J., Holloway A.K., Regier A.P., Olson M., White B., Redmond S., Fulton L., Appelbaum E., Godfrey J., Farmer C., Chinwalla A., Yang S.P., Minx P., Nelson J., Kyung K., Walenz B.P., Garcia-Hernandez E., Aguiar M., Viswanathan L.D., Rogers Y.H., Strausberg R.L., Sasaki C.A., Lawson D., Collins F.H., Kafatos F.C., Christophides G.K., Clifton S.W., Kirkness E.F., Besansky N.J. (2010).** Widespread divergence between incipient *Anopheles gambiae* species revealed by whole genome sequences. *Science.* ; 330(6003):512-4.
- 140- Le B.V., Williams M., Logarajah S., Baxter R.H. (2012).** Molecular basis for genetic resistance of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium*: structural analysis of TEP1 susceptible and resistant alleles. *PLoS Pathog.* ; 8(10):e1002958.
- 141- Levashina E.A., Moita L.F., Blandin S., Vriend G., Lagueux M., Kafatos, F.C. (2001).** Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* ; 104, 709–718.
- 142- Li Jun, Xiaohong Wang, Genwei Zhang, John I. Githure, Guiyun Yan, and Anthony A. James (2013).** Genome-block expression-assisted association studies discover malaria resistance genes in *Anopheles gambiae*. *PNAS* ; 20675–20680.
- 143- Luchavez Jennifer, Joanne Baker, Sheila Alcantara, Vicente Belizario Jr, Qin Cheng, James S McCarthy and David Bell (2011).** Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar J.* ; 10:286.
- 144- Maltha J., Gillet P., Jacobs J. (2013).** Review: malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clin Microbiol Infect* ; 2013.
- 145- Manzoni G, Briquet S, Risco-Castillo V, Gaultier C, Topçu S, Ivănescu ML, Franetich JF, Hoareau-Coudert B, Mazier D, Silvie O. (2014).** A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci Rep* ; 4:4760.
- 146- Margos G., Navarette S., Butcher G., Davies A., Willers C., Sinden R.E., Lachmann P.J. (2001).** Interaction between host complement and mosquito-midgut-stage *Plasmodium berghei*. *Infect Immun.* ; 69(8):5064-71.
- 147- Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D., (1998).** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* ; 7 : 179-184.
- 148- Meister S., Kanzok S.M., Zheng Xue-li, Luna C., Ruel L.T., Hoa, N.T., Clayton J.R., White K.P., Kafatos F.C., Christophides G.K. and Zheng L. (2005).** Immune signalling pathway regulating bacterial and malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *PNAS* ; 102, 11420-11425.

- 149- Menard S., Tchoufack J.N., Maffo C.N., Nsango S.E., Iriart X., Abate L., Tsapi M.T., Awono-Ambéné P.H., Abega Mekongo F.A., Morlais I., Berry A. (2016).** Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates. *Malar J.* ; 15(1):572.
- 150- 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.* ; 4708–4715.
- 151- 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(5):e1000069.
- 152- Menge D.M., Zhong D., Guda T., Gouagna L., Githure J., Beier J., Yan G. (2006).** Quantitative trait loci controlling refractoriness to *Plasmodium falciparum* in natural *Anopheles gambiae* mosquitoes from a malaria-endemic region in western Kenya. *Genetics.* ; 173(1):235-41.
- 153- Meshnick S.R. (2002).** Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* ; 32(13):1655-60. Review.
- 154- Michel, K., Budd, A., Pinto, S., Gibson, T.J. and Kafatos, F.C. (2005).** *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO reports* 6, 891-897.
- 155- Mitri C., Jacques J.C., Thierry I., Riehle M.M., Xu J., Bischoff E., Morlais I., Nsango S.E., Vernick K.D. and Bourgoïn, C. (2009).** Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. *PLoS Pathog* ; 5, e1000576.
- 156- Moita L.F., Wang-Sattler R., Michel K., Zimmermann T., Blandin S., Levashina E.A., Kafatos F.C. (2005).** In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity.* ; 23(1):65-73.
- 157- Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. (2014).** The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 109(5):662-7. Review.
- 158- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2017).** *Plasmodium* P47 : A key gene for malaria transmission by mosquito vectors. *Curr Opin Microbiol.* ; 40:168-174.
- 159- Molina-Cruz A., Canepa G.E., Kamath N., Pavlovic N.V., Mu J., Ramphul U.N., Ramirez J.L., Barillas-Mury C. (2015).** *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(49):15178-83.
- 160- Molina-Cruz A., Garver L.S., Alabaster A., Bangiolo L., Haile A., Winikor J., Ortega C., Van Schaijk B.C., Sauerwein R.W., Taylor-Salmon E., Barillas-Mury C.**

(2013). The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science* ; 1235264.

161- Molina-Cruz Alvaro, Randall J. DeJong, Corrie Ortega, Ashley Haile, Ekua Abban, Janneth Rodrigues, Giovanna Jaramillo-Gutierrez, and Carolina Barillas-Mury (2012). Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PNAS* ; 10.1073.

162- Morlais I., Nsango S.E., Toussile W., Abate L., Annan Z., Tchioffo M.T., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Fontenille D., Rousset F., Berry A. (2015). Plasmodium falciparum mating patterns and mosquito infectivity of natural isolates of gametocytes. *PLoS One.* ; 10(4):e0123777.

163- Mouchet J, Gariou J. (1957). Exophilia & exophagia of *Anopheles gambiae* Giles 1902, in South Cameroon. *Bull. Soc. Patb. exot.*, ; W- 446-461.

164- Müller P., Warr E., Stevenson B.J., Pignatelli P.M., Morgan J.C., Steven A., Yawson A.E., Mitchell S.N., Ranson H., Hemingway J., Paine M.J., Donnelly M.J. (2008). Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4(11) : e1000286.

165- Nakhleh J., Christophides G.K., Osta M.A. (2017). The serine protease homolog CLIPA14 modulates the intensity of the immune response in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem.* ; 292(44):18217-18226.

166- Ndo C., Kopya E., Menze-Djantio B., Toto J.C., Awono-Ambene P., Lycett G., Wondji C.S. (2016). High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays. *Parasit Vectors.* ; 9(1):341.

167- Neafsey D.E., Lawniczak M.K.N., Park D.J., Redmond S.N., Coulibaly M.B., Traoré S.F., Sagnon N., Costantini C., Johnson C., Wiegand R.C., Collins F.H., Lander E.S., Wirth D.F., Kafatos F.C., Besansky N.J., Christophides G.K., Muskavitch M.A.T. (2010). SNP genotyping defines complex gene-flow boundaries among African malaria vector mosquitoes. *Science.* ; 330(6003):514-517.

168- Ngassa Mbenda H.G., Gouado I., Das A. (2016). An additional observation of *Plasmodium vivax* malaria infection in Duffy-negative individuals from Cameroon. *J Infect Dev Ctries* ; 7554.

169- Niaré O., Markianos K., Volz J., Oduol F., Touré A., Bagayoko M., Sangaré D., Traoré S.F., Wang R., Blass C., Dolo G., Bouaré M., Kafatos F.C., Kruglyak L., Touré Y.T., Vernick K.D. (2002). Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science.* ; 298(5591):213-6.

170- Noden B.H., Kent M.D., Beier J.C. (1995). The impact of variations in temperature on early *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles stephensi*. *Parasitology* ; 539-45.

171- Nsango S.E., Luc Abate L., Thoma M., Pompon J., Malou Fraiture M., Rademacher A., Berry A., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A., Morlais I. (2012).

Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International Journal for Parasitology*. ; 42 (6): 589-95.

172- Nsango S.E., Pompon J., Xie T., Rademacher A., Fraiture M., Thoma M., Awono-Ambene P.H., Moyou R.S., Morlais I., Levashina E.A. (2013). AP-1/Fos-TGase2 axis mediates wounding-induced Plasmodium falciparum killing in *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem*. ; 288(22):16145-54.

173- Nwane P., Etang J., Chouaïbou M., Toto J.C., Koffi A., Mimpfoundi R., Simard F. (2013). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Cameroon, Central Africa. *Parasites & Vectors* ; 1756-3305-6-41.

174- 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 Evolutionary Biology* ; 8 : 274.

175- Okech B.A., Gouagna L.C., Kabiru E.W., Beier J.C., Yan G., Githure J.I. (2004). Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural Plasmodium falciparum gametocytes from human volunteers. *J Insect Sci*. ; 4:33.

176- Okech B.A., Gouagna L.C., Yan G., Githure J.I., Beier J.C. (2007). Larval habitats of *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera: Culicidae) influences vector competence to *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J*. ; 1475-2875-6-50.

177- Okell L.C., Ghani A.C., Lyons E., Drakeley C.J. (2009). Submicroscopic infection in Plasmodium falciparum-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. ; 200(10):1509-17. Review.

178- Oliveira Giselle de Almeida, Joshua Lieberman, and Carolina Barillas-Mury (2012). Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. *Science*. ; 335(6070): 856–859.

179- Oliver S.V., Brooke B.D. (2016). The Role of Oxidative Stress in the Longevity and Insecticide Resistance Phenotype of the Major Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *PLoS One*. ; 11(3):e0151049.

180- Olotu A., Fegan G., Wambua J., Nyangweso G., Awuondo K.O., Leach A., Lievens M., Lebouilleux D., Njuguna P., Peshu N., Marsh K., Bejon P. (2013). Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N Engl J Med*. ; 368(12):1111-20.

181- Onyabe D.Y., Conn J.E. (2001). The distribution of two major malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*, in Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. ; 96(8):1081-4.

182- Osta M.A., Christophides G.K., Kafatos F.C. (2004b). Effects of mosquito genes on Plasmodium development. *Science*. ; 303(5666):2030-2.

183- Osta M.A., Christophides G.K., Vlachou D., Kafatos F.C. (2004a). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae* : comparative and functional genomics. *J Exp Biol*. ; 207(Pt 15):2551-63. Review.

- 184- Padley D., Moody A.H., Chiodini P.L., Saldanha J. (2003).** Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol.* ; 000349803125002977.
- 185- Palmer William J. and Jiggins Francis M. (2015).** Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Mol. Biol. Evol.* ; 32(8):2111–2129.
- 186- Pennetier C., Chabi J., Martin T., Chandre F., Rogier C., Hougard J.M., Pages F. (2010).** New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasit Vectors.* ; 3:81.
- 187- Pennetier C., Warren B., Dabiré K.R., Russell I.J., Gibson G. (2010).** "Singing on the wing" as a mechanism for species recognition in the malarial mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr Biol.* ; 20(2):131-6.
- 188- Philippe Poirier, Cécile Doderer-Lang, Pascal S. Atchade, Jean-Philippe Lemoine, Marie-Louise Coquelin de l'Isle, Ahmed Abou-bacar Alexander W. Pfaff Julie Brunet Lydia Arnoux, Elodie Haar, Denis Filisetti, Sylvie Perrotey, Nicodeme W. Chabi, Casimir D. Akpovi, Ludovic Anani, André Bigot, Ambaliou Sanni and Ermanno Candolfi (2016).** The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malar J.* ; 570.
- 189- Povelones M., Bhagavatula L., Yassine H., Tan L.A., Upton L.M., Osta M.A., Christophides G.K. (2013).** The CLIP-domain serine protease homolog SPCLIP1 regulates complement recruitment to microbial surfaces in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* ; 9(9):e1003623.
- 190- Povelones M., Osta M.A., Christophides G.K. (2016).** The Complement System of Malaria Vector Mosquitoes. *Advances in Insect Physiology* ; 2016.06.001. Review
- 191- Povelones M., Upton L.M., Sala K.A., Christophides G.K. (2011).** Structure-function analysis of the *Anopheles gambiae* LRIM1/APL1C complex and its interaction with complement C3-like protein TEP1. *PLoS Pathog.* ; 7(4):e1002023.
- 192- Povelones M., Waterhouse R.M., Kafatos F.C. and Christophides G.K. (2009).** Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science* ; 324, 258-61.
- 193- Programme National de lutte contre le paludisme-Cameroun (2007).** Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Cameroun 2007-2010. MINSANTE.
- 194- Programme National de lutte contre le paludisme-Cameroun (2016).** MINSANTE
- 195- Ramphul U.N., Garver L.S., Molina-Cruz A., Canepa G.E., Barillas-Mury C. (2015).** *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(5):1273-80.
- 196- Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H. (2000).** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol.* ; 00209.x.

- 197- Ranson H., N'guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z., Corbel V. (2011).** Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* ; 27(2):91-8. Review.
- 198- Redmond S.N., Eiglmeier K., Mitri C., Markianos K., Guelbeogo W.M., Gneme A., Isaacs A.T., Coulibaly B., Brito-Fravallo E., Maslen G., Mead D., Niare O., Traore S.F., Sagnon N., Kwiatkowski D., Riehle M.M., Vernick K.D. (2015).** Association mapping by pooled sequencing identifies TOLL 11 as a protective factor against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics.* ; 16:779.
- 199- Renner J., Graves P.M., Carter R., Williams J.L., Burkot T.R. (1983).** Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med.* ; 158(3):976-81.
- 200- Riehle M.M., Markianos K., Lambrechts L., Xia A., Sharakhov I., Koella J.C., Vernick K.D. (2007).** A major genetic locus controlling natural *Plasmodium falciparum* infection is shared by East and West African *Anopheles gambiae*. *Malar J.* ; 6:87.
- 201- Riehle M.M., Markianos K., Niare O., Xu J., Li J., Touré A.M., Podiougou B., Oduol F., Diawara S., Diallo M., Coulibaly B., Ouatarra A., Kruglyak L., Traoré S.F., Vernick K.D. (2006).** Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science.* ; 312(5773):577-9.
- 202- Riehle M.M., Xu J., Lazzaro B.P., Rottschaefer S.M., Coulibaly B., Sacko M., Niare O., Morlais I., Traore S.F., Vernick K.D.. (2008).** *Anopheles gambiae* APL1 is a family of variable LRR proteins required for Rel1-mediated protection from the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS One.* ; 3(11):e3672.
- 203- Robert V., Molez J.F., Trape J.F., (1996).** Gametocytes, chloroquine pressure, and the relative parasite survival advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ; 55 : 350-351.
- 204- Robert V., Read A., Essong J., Tchuinkam T., Mulder B., Verhave J.P., Carnevale P., (1996).** Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med., Hyg.* ; 90 : 621-624.
- 205- Robert Vincent, (1992).** Un estomac d'anophèle avec des oocystes de *Plasmodium*, agent du paludisme. Coloration au mercurochrome. Cf : *Fiches d'actualité scientifiques* ; 194 et 277.
- 206- Rocca K.A., Gray E.M., Costantini C., Besansky N.J. (2009).** 2La chromosomal inversion enhances thermal tolerance of *Anopheles gambiae* larvae. *Malar J.* ; 8:147.
- 207- Rono M.K., Whitten M.M., Oulad-Abdelghani M., Levashina E.A., Marois E. (2010).** The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-*Plasmodium* response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* ; 8(7):e1000434.
- 208- Rougemont M., Van Saanen M., Sahli R., Hinrikson H.P., Bille J., Jatton K. (2004).** Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* ; 42(12):5636-43.

- 209- Rutledge L.C., R.A. Ward J. and D.J. Gould (1964).** Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* Vol. 24, No. 4.
- 210- Sang Woon Shin, Kokoza V., Bian G., Cheon H.M., Kim Y.J., Raikhel A.S. (2005).** REL1, a homologue of *Drosophila dorsal*, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *The journal of biological chemistry*. ; M500711200.
- 211- Santolamazza F., Mancini E., Simard F., Qi Y., Tu Z., della Torre A. (2008).** Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* ; 1475-2875-7-163
- 212- Saraiva R.G., Kang S., Simões M.L., Angleró-Rodríguez Y.I., Dimopoulos G. (2016).** Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Dev Comp Immunol.* ; 2016.01.015. Review.
- 213- Severo Maiara S. and Elena Levashina (2014).** Mosquito defenses against *Plasmodium* parasites. *Insect Science.* ; 07.007. Review
- 214- Seyoum Dinberu, Delenasaw Yewhalaw, Luc Duchateau, Patrick Brandt, Angel Rosas-Aguirre and Niko Speybroeck (2017).** Household level spatio-temporal analysis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Ethiopia. *Parasites & Vectors* ; 10:196.
- 215- Shin-Hong Shiao, Miranda M.A. Whitten, Daniel Zachary, Jules A. Hoffmann, Elena A. Levashina (2006).** Fz2 and Cdc42 Mediate Melanization and Actin Polymerization but Are Dispensable for *Plasmodium* Killing in the Mosquito Midgut. *PLoS Pathog* 2(12): e133.
- 216- Simard F., Ayala D., Kamdem G.C., Pombi M., Etouna J., Ose K., Fotsing J.M., Fontenille D., Besansky N.J., Costantini C. (2009).** Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* ; 1472-6785-9-17.
- 217- Sinden R.E. (1999).** *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parasitology* ; 41, 139-148.
- 218- Sinden R.E., Alavi Y., Raine J.D. (2004).** Mosquito--malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(7):625-9. Review.
- 219- Sinden R.E., Butcher G.A., Billker O., Fleck S.L. (1996).** Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol.* 38:53-117. Review.
- 220- Sinden R.E., Croll N.A. (1975).** Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology* ; S0031182000048861.
- 221- Sinden R.E., Croll N.A. (1975).** Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology.* ; 70(1):53-65.

- 222- Singh B., Kim Sung L., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S.S., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D.J. (2004).** A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet.* ; 363(9414):1017-24.
- 223- Smalley M.E., Sinden R.E. (1977).** Plasmodium falciparum gametocytes : their longevity and infectivity. *Parasitology.* ; 74(1):1-8.
- 224- Smith P.H., Mwangi J.M., Afrane Y.A., Yan G., Obbard D.J, Ranford-Cartwright L.C., Little T.J. (2011).** Alternative splicing of the Anopheles gambiae Dscam gene in diverse Plasmodium falciparum infections. *Malar J.* ; 1475-2875-10-156.
- 225- Smith R.C., Barillas-Mury C., Jacobs-Lorena M. (2015).** Hemocyte differentiation mediates the mosquito late-phase immune response against Plasmodium in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(26):E3412-20.
- 226- Smith R.C., Jacobs-Lorena M. (2015).** Malaria parasite Pfs47 disrupts JNK signaling to escape mosquito immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 112(5):1250-1.
- 227- Smith R.C., Vega-Rodríguez J., Jacobs-Lorena M. (2014).** The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 109:644–61.
- 228- Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. (1993).** Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* ; 58(2):283-92.
- 229- Sougoufara S., Doucouré S., Backé Sembéne P.M., Harry M., Sokhna C. (2017).** Challenges for malaria vector control in sub-Saharan Africa : Resistance and behavioral adaptations in *Anopheles* populations. *J Vector Borne Dis.* ; 54(1):4-15. Review.
- 230- Ta T.H., Hisam S., Lanza M., Jiram A.I., Ismail N., Rubio J.M. (2014).** First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J.* ; 13:68.
- 231- Talman Arthur M., Andrew M. Blagborough, Robert E. Sinden (2010).** A *Plasmodium falciparum* Strain Expressing GFP throughout the Parasite's Life-Cycle. *PLoS One* 5(2) : e9156.
- 232- Tchioffo M.T., Boissière A., Abate L., Nsango S.E., Bayibéki A.N., Awono-Ambéné P.H., Christen R., Gimonneau G., Morlais I. (2016).** Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia. *Front Microbiol.* ; 01500.
- 233- Tchioffo M.T., Boissière A., Churcher T.S., Abate L., Gimonneau G., Nsango S.E., Awono-Ambéné P.H., Christen R., Berry A., Morlais I. (2013).** Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS One.* ; 8(12):e81663.
- 234- Templeton T.J., Kaslow D.C. (1999).** Identification of additional members define a Plasmodium falciparum gene superfamily which includes Pfs48/45 and Pfs230. *Mol Biochem Parasitol.* ; 101(1-2):223-7.

- 235- Thu A.M., Phyo A.P., Landier J., Parker D.M., Nosten F.H. (2017).** Combating multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *FEBS J.* ; 284(16):2569-2578. Review.
- 236- Tibúrcio M., Niang M., Deplaine G., Perrot S., Bischoff E., Ndour P.A., Silvestrini F., Khattab A., Milon G., David P.H., Hardeman M., Vernick K.D., Sauerwein R.W., Preiser P.R., Mercereau-Puijalon O., Buffet P., Alano P., Lavazec C. (2012).** A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood.* ; 119(24):e172-80.
- 237- Tibúrcio M., Silvestrini F., Bertuccini L., Sander A.F., Turner L., Lavstsen T., Alano P. (2012).** Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol.* ; 15(4):647-59.
- 238- Ukegbu C.V., Giorgalli M., Yassine H., Ramirez J.L., Taxiarchi C., Barillas-Mury C., Christophides G.K., Vlachou D. (2017).** *Plasmodium berghei* P47 is essential for ookinete protection from the *Anopheles gambiae* complement-like response. *Sci Rep.* ; 7(1):6026.
- 239- Van Dijk Melissa R., Ben C.L. van Schaijk, Shahid M. Khan, Maaike W. van Dooren, Jai Ramesar, Szymon Kaczanowski, Geert-Jan van Gemert, Hans Kroeze, Hendrik G. Stunnenberg, Wijnand M. Eling, Robert W. Sauerwein, Andrew P. Waters, Chris J. Janse. (2010).** Three Members of the 6-cys Protein Family of *Plasmodium* Play a Role in Gamete Fertility. *PLoS Pathog* ; 6(4): e1000853.
- 240- Van Dijk Melissa R., k Chris J. Janse, k Joanne Thompson, Andrew P. Waters, Joanna A. M. Braks, Huub J. Dodemont, Henk G. Stunnenberg, Geert-Jan van Gemert, Robert W. Sauerwein, and Wijnand Eling (2001).** A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00199-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00199-4) ; p153–164.
- 241- Van Schaijk BC, van Dijk MR, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert GJ, van Dooren MW, Eksi S, Roeffen WF, Janse CJ, Waters AP, Sauerwein RW. (2006).** Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* ; 149(2):216-22.
- 242- Vernick K.D., Collins F.H., Gwadz R.W. (1989).** A general system of resistance to malaria infection in *Anopheles gambiae* controlled by two main genetic loci. *Am J Trop Med Hyg.* ; 40(6):585-92.
- 243- Vernick K.D., Fujioka H., Seeley D.C., Tandler B., Aikawa M. and Miller L. H. (1995).** *Plasmodium gallinaceum* : A Refractory Mechanism of Ookinete Killing in the Mosquito, *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology* ; 80, 583-595.
- 244- Vlachou D., Schlegelmilch T., Runn E., Mendes A., Kafatos F.C. (2006).** The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.* ; 16(4):384-91.
- 245- Vlachou D., Zimmermann T., Cantera R., Janse C.J., Waters A.P., Kafatos F.C. (2004).** Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol.* ; 6(7):671-85.
- 246- Volohonsky G., Hopp A.K., Saenger M., Soichot J., Scholze H., Boch J., Blandin S.A., Marois E. (2017).** Transgenic Expression of the Anti-parasitic Factor TEP1 in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* ; 13(1):e1006113.

- 247- Volohonsky Gloria, Stefanie Steinert, Elena Levashina (2009).** Focusing on complement in the antiparasitic defense of mosquitoes. *Trends Parasitol.* ; 10:003.
- 248- Wampfler R., Mwingira F., Javati S., Robinson L., Betuela I., Siba P., Beck H.P., Mueller I., Felger I. (2013).** Strategies for detection of Plasmodium species gametocytes. *PLoS One.* ; 8(9):e76316.
- 249- Wang P., Granados R.R. (2001).** Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch Insect Biochem Physiol.* ; 47(2):110-8.
- 250- White Bradley J., Mara K.N. Lawniczak, Changde Cheng, Mamadou B. Coulibaly, Michael D. Wilson, N’Fale Sagnon, Carlo Costantini, Frederic Simard, George K. Christophides, and Nora J. Besansky (2010).** Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to Plasmodium. *PNAS* ; 1013648108.
- 251- White G.B. 1985.** *Anopheles bwambae* Sp-N, a Malaria Vector in the Semliki Valley, Uganda, and Its Relationships with Other Sibling Species of the *An gambiae* Complex (Diptera, Culicidae). *Systematic Entomology* ; 10:501-522.
- 252- WHO :** World Health Organization. World malaria report (2016) Available: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2016
- 253- Wirtz R.A., Burkot T.R., Graves P.M., Andre R.G. (1987).** Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax sporozoites in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol.* ; 24(4):433-7.
- 254- Wondji C., Frédéric S., Petrarca V., Etang J., Santolamazza F., Della Torre A., Fontenille D. (2005).** Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol.* ; 42(6):998-1005.
- 255- Wondji C., Simard F., Lehmann T., Fondjo E., Samè-Ekobo A., Fontenille D. (2005).** Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Mol Ecol.* ; 14(12):3683-93.
- 256- Yang C, Zhang H, Zhou R, Qian D, Liu Y, Zhao Y, Li S, Xu B. (2017).** Polymorphisms of Plasmodium falciparum k13-propeller gene among migrant workers returning to Henan Province, China from Africa. *BMC Infect Dis.* ; 17(1):560.
- 257- Yassine H., Kamareddine L., Chamat S., Christophides G.K., Osta M.A. (2014).** A serine protease homolog negatively regulates TEP1 consumption in systemic infections of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Innate Immun.* ; 6(6):806-18.
- 258- Zakovic Suzana and Elena A. Levashina (2017).** NF- κ B-Like Signaling Pathway REL2 in Immune Defenses of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Front Cell Infect Microbiol.* ; 7: 258.

- 259- Zhang G., Huang H., Liu D., Cheng Y., Liu X., Zhang W., Yin R., Zhang D., Zhang P., Liu J., Li C., Liu B., Luo Y., Zhu Y., Zhang N., He S., He C., Wang H., Chen D. (2015).** N(6)-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* ; 161(4):893-906.
- 260- Zheng L., Cornel A.J., Wang R., Erfle H., Voss H., Ansorge W., Kafatos F.C. and Collins F.H. (1997).** Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* ; 276, 425-428.
- 261- Zheng L., Wang S., Romans P., Zhao H., Luna C. and Benedict M.Q. (2003).** Quantitative trait loci in *Anopheles gambiae* controlling the encapsulation response against *Plasmodium cynomolgi* ceylon. *BMC Genetics* ; 4, 16.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX :

Introduction et généralités :

Figure 1 : Distribution géographique des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i>	P10
Figure 2 : Fragments d'ADNr ciblés pour le diagnostic moléculaire des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i>	P12
Figure 3 : Cycle de vie des anophèles	P14
Figure 4 : Les différents stades sanguins de <i>Plasmodium</i> . Aspect observés sur frottis minces	P17
Figure 5 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	P19
Figure 6 : Faciès épidémiologique du paludisme au Cameroun	P24
Figure 7 : Développement de <i>Plasmodium</i> chez le moustique et réponse antiparasitaire au niveau de l'intestin.	P30
Figure 8 : Schéma d'activation et régulation de la voie JNK chez <i>An. gambiae</i>	P35
Figure 9 : Schéma d'activation et régulation de la voie Toll chez <i>An. gambiae</i>	P36
Figure 10 : Schéma d'activation et régulation de la voie Imd chez <i>An. gambiae</i>	P37
Figure 11 : Schéma d'activation et régulation des voies de signalisation JAK/STAT.	P39
Figure 12 : Structure et fonction des hémocytes chez le moustique	P44
Figure 13 : Loci associés à la résistance des moustiques contre <i>Plasmodium</i>	P46
Figure 14 : Les allèles de TEP1 forment deux groupes majeurs, TEP1*R et TEP1*S	P48

Matériel et méthodes :

Figure 15 : Carte de l'arrondissement de Mfou et localisation des écoles prospectées pour les enquêtes parasitologiques.	P57
Figure 16 : Carte de la ville de Yaoundé et localisation des différents quartiers prospectés pour les collectes larvaires.	P58
Figure 17: Intestin de moustiques 7 jours après infection avec <i>P. falciparum</i> (x20) (OCEAC).	P64
Figure 18 : Infections expérimentales des moustiques femelles sur membrane de parafilm à partir du sang de porteurs de gamétocytes (OCEAC)	P64
Figure 19 : Purification des gamétocytes de <i>P. falciparum</i> (OCEAC)	P67
Figure 20 : Infection expérimentale des moustiques sur souris (IBMC)	P68
Figure 21 : Marqueurs moléculaires utilisés pour la distinction des lignées L3-5 et Ngousso	P73
Tableau 1 : Caractères génétiques et phénotypiques des lignées de moustiques utilisées pour les infections expérimentales	P60
Tableau 2 : Plan de collecte d'échantillons après infections expérimentales	P65
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction d'ADNg utilisées pour les analyses moléculaires	P69
Tableau 4 : Protocole de PCR multiplexe avec restriction enzymatique pour le diagnostic moléculaire des espèces du complexe <i>An. gambiae s.l.</i>	P70

Tableau 5 : Protocole de PCR nichée avec restrictions enzymatiques pour le génotypage TEP1	P71
Tableau 6 : Profil de restriction pour le diagnostic des génotypes TEP1	P72
Tableau 7 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification par PCR	P74
Tableau 8 : Amorces et températures d'hybridation pour chaque marqueur	P74
Tableau 9 : Composition du milieu réactionnel pour la digestion des produits de PCR	P74
Tableau 10 : Marqueurs microsatellites utilisés pour la PCR	P75
Tableau 11 : Protocole d'amplification des marqueurs microsatellites chez <i>P. falciparum</i> (Hemi-nested PCR)	P76
Tableau 12 : Protocole de PCR Pf47 chez <i>P. falciparum</i>	P77

Chapitre 2 :

Figure 22 : Représentation des fréquences de portages des stades asexués et sexués de Plasmodium chez les enfants de 4 à 15 ans dans l'Arrondissement de Mfou de septembre 2013 à mars 2016	P87
Figure 23 : Représentation graphique des MOIs d'isolats de gamétocytes collectés sur le terrain en fonction des saisons d'infections	P87
Figure 24 : Profils d'infections avec les isolats naturels de <i>P. falciparum</i> provenant de différentes localités	P91
Figure 25 : Comparaison des prévalences chez L3-5 vs NG en fonction des expériences	P92
Figure 26 : Comparaison des prévalences (A) et des charges oocystiques (B) chez L3-5 (en ordonnées) et NG (en abscisses)	P92
Figure 27 : Comparaison des nombres moyens d'oocystes chez les moustiques infectés L3-5 vs NG en fonction des expériences	P93
Figure 28 : Prévalences (A, C) et charges oocystiques (B, D) des L3-5 (A, B) et des NG (C, D) en fonction de la gamétocytémie du porteur	P94
Figure 29 : Prévalences (A) et charges oocystiques (B) lors d'infections avec <i>P. berghei</i> (Pb-GOMO14) chez la souche de moustiques G3, en fonction de la gamétocytémie	P93
Figure 30 : Polymorphisme de Pfs47 chez les isolats naturels de <i>P. falciparum</i>	P95
Figure 31 : Représentation des prévalences d'infections à <i>P. falciparum</i> chez L3-5 (A) et NG (B) en fonction des génotypes Pfs47 en position 742	P97

Tableau 13: Effectifs (N) et fréquence (F) d'enfants de 4 à 15 ans non-infectés et infectés porteurs des stades asexués et sexués de <i>Plasmodium</i> dans l'Arrondissement de Mfou de septembre 2013 à mars 2016	P88
--	-----

Chapitre 3 :

Figure 32 : Nombres d'oocystes chez les moustiques S1high vs S1low iso3 à iso7 (A) et Moyennes des prévalences sur plusieurs infections indépendantes pour les couples S1high/S1low sélectionnés (B)	P109
Figure 33 : Moyennes des charges oocystiques des S1high (Axe des Y) vs S1low (Axe des X)	P109

Figure 34 : Charge oocystique (A) et prévalence (B) lors d'une infection avec <i>P. berghei</i> chez les S1low/S1high iso6 accouplées (<i>Mated</i>) et vierges (<i>Virgin</i>)	P110
Figure 35 : Nombres d'oocytes et prévalences chez les moustiques S1high vs S1low iso5 infectés avec la souche NF54 de <i>P. falciparum</i>	P111
Figure 36 : Comparaison des prévalences (A) et charges oocystiques (B) chez S1high (Axe des Y) et S1low (Axe des X)	P112
Figure 37 : Prévalences d'infections à <i>P. falciparum</i> chez les moustiques S1high et S1low	P114
Figure 38 : Niveaux d'infection à <i>P. falciparum</i> chez les moustiques S1high vs S1low	P115
Figure 39 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) chez les S1high (A et C) vs S1low (B et D) en fonction des charges gamétocytaires	P116

Chapitre 4 :

Figure 40 : Répartition géographique d' <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> dans les localités prospectées de la ville de Yaoundé	P127
Figure 41 : Prévalence (A) et niveau d'infection (B) chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	P128
Figure 42: Fréquences alléliques de <i>TEP1</i> chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> . Sur les diagrammes en secteurs, les valeurs observées représentent les fréquences d'allèles <i>TEP1</i>	P130
Figure 43 : Fréquences des génotypes <i>TEP1</i> chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i> . L'axe des X représente les différents génotypes <i>TEP1</i> retrouvés chez <i>An. coluzzii</i> et <i>An. gambiae</i>	P130
Figure 44 : Fréquences des allèles (A) et génotypes (B) <i>TEP1</i> chez Ndokayo. Sur le diagramme en secteurs, les valeurs observées représentent les fréquences en % d'allèles <i>TEP1</i> dans la souche Ndokayo	P131
Figure 45 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) des génotypes <i>TEP1</i> les plus retrouvés chez <i>An. coluzzii</i> (A et C) et <i>An. gambiae</i> (B et D)	P132
Figure 46 : Prévalences (A et B) et niveaux d'infections (C et D) chez les moustiques <i>An. coluzzii</i> (A et C) et <i>An. gambiae</i> (B et D) homozygotes/hétérozygotes pour <i>TEP1</i>	P133
Figure 47 : Prévalences (A) et niveaux d'infections (B) des génotypes <i>TEP1</i> chez Ndokayo	P135

LISTE DES ABREVIATIONS :

Ac	: Anticorps
ACT	: Artemisinin-based Combination Therapy
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNg	: ADN génomique
ADNr	: ADN ribosomal
Ag	: Antigène
AgCPB	: Antigène CarboxyPeptidase B
AMA	: Apical Membrane Antigen
AMPs	: AntiMicrobial Peptide
AnAPN	: <i>Anopheles gambiae</i> AminoPeptidase N
AP-1	: Activator Protein 1
APL1	: Anopheles Plasmodium-responsive Leucine-rich repeat protein 1
ARN	: Acide ribonucléique
Bam HI	: <i>Bacillus amyloquefaciens</i> HI
Bsr I	: <i>Geobacillus stearothermophilus</i> I
CSP	: CircumSporozoite Protein
CTAB	: Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide
CTLs	: C-Type Lectins
DAP	: DiAminoPimelique acide
DD	: Death Domain
DDT	: DichloroDiphénylTrichloroéthane
dFADD	: drosophila Fas-Associated Death Domain-containing protein
DIF	: Dorsal-related Immunity Factor
DMFA	: Direct Membrane Feeding Assay
Dome	: Domeless
Dredd	: Death related ced
DSFA	: Direct Skin Feeding Assay
dTAK1	: drosophila Transforming growth factor β -Activated Kinase 1
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Exp	: Exported protein
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FMP2	: Falciparum Malaria Protein
FREPs	: Fibrinogen-RElated Proteins
FS	: <i>Frottis Sanguin</i>
GE	: <i>Goutte Epaisse</i>
GFP	: Green Fluorescent Protein
GLURP	: GLUtamate Rich Protein
GSTes	: Glutathione-S-Transferases
HBsAg	: Antigène de surface du virus de l'hépatite B
Hind III	: Haepphilus influenza III
Hop	: Hopscotch

IBMC	: Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IgG	: Immunoglobuline G
IGS	: Intergenic Spacers,
I _κ B	: Inhibitor kappaB
Imd	: Immune deficiency
IRAK	: IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
JAKs	: JAnus Kinase
JNK	: c-Jun N-terminal Kinase
Kdr	: Knock down resistance
LPSs	: LipoPolySaccharides
LRIM1	: Leucine rich-repeat immune protein 1
LRR	: Leucine-Rich Repeat proteins
LSA	: Liver-Stage Antigen
MACS	: Magnetic columns
MAMPs	: Microbe-Associated Molecular Patterns
MAP3K	: Mitogen Activating Protein Kinase Kinase Kinase
MG	: Macroglobulines
MII	: Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MILDA	: Moustiquaires Imprégnées d'insecticide à Longue durée d'Action
Minsanté	: Ministère de la santé
MOI	: Multiplicity Of Infection
MSP	: Merozoite Surface Proteins
MTBVs	: Malaria Transmission-Blocking Vaccines
MVI	: Malaria Vaccine Initiative
OCEAC Centrale	: Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique
OMS	: Organisation Mondial de la Santé
PAMPs	: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PfEMP ₁	: <i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
PfHRP ₂	: <i>P. falciparum</i> Histidin-Rich Protein-2
PfSPZ	: <i>P. falciparum</i> sporozoites
PGN	: Peptidoglycane
PGRPs	: Peptidoglycan Recognition Proteins
PGRPs	: Peptidoglycane recognition receptors
PID	: Pulvérisation IntraDomiciliaire ()
pLDH	: plasmodium Lactate DesHydrogenase
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
PRBCs	: Parasitized Red Blood Cells
PRI	: Plasmodium Resistance Island
PRRs	: Pattern Recognition Receptors

QTL	: Quantitative Trait Loci
RBCs	: Red Blood Cells
RDT	: Rapid Diagnostic Test
REL	: RELish Like protein
Rel2-F	: Rel2-Full-length form
Rel2-S	: Rel2-Short form
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RHD	: Rel Homology Domain
RIP	: Receptor Interacting Protein
SOCS	: Suppressor Of Cytokine Signaling proteins
SPE	: Spätzle Processing Enzyme
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
TED	: ThioEster binding Domain
TEP1-F	: TEP1 full-length form
TEPs	: ThioEster-containing Proteins
TPI	: Traitement Préventif Intermittent
TRAP	: Thrombospondin-Related Adhesion Protein)
Udp	: cytokine Unpaired
WHO	: World Health Organisation

LISTE DES PUBLICATIONS :

- 1- **Anne Boissière, Geoffrey Gimonneau, Majoline T. Tchioffo, Luc Abate, Albert Bayibéki, Parfait H. Awono-Ambéné, Sandrine E. Nsango, Isabelle Morlais.(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 2013, 8 (1):e54820.
- 2- **Geoffrey Gimonneau, Albert N. Bayibéki, Thierry Baldet, Parfait H. Awono-Ambene and Frédéric Simard (2014).** Life history consequences of larval foraging depth differ between two competing *Anopheles* mosquitoes. Ecological Entomology, DOI: 10.1111/een.12163.
- 3- **Majoline T. Tchioffo, Anne Boissière, Luc Abate, Sandrine E. Nsango, Albert N. Bayibéki, Parfait H. Awono-Ambéné, Richard Christen, Geoffrey Gimonneau and Isabelle Morlais (2016).** Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia. Frontiers in Microbiology, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01500.
- 4- **Maurice M. Sandeu, Luc Abate, Majoline T. Tchioffo, Albert N. Bayibéki, Parfait H. Awono-Ambéné, Sandrine E. Nsango, Cédric B. Chesnais, Rhoel R. Dinglasan, Thierry de Meeûs, Isabelle Morlais (2016).** Impact of exposure to mosquito transmission-blocking antibodies on *Plasmodium falciparum* population genetic structure.
- 5- **Sandeu MM, Bayibéki AN, Tchioffo MT, Abate L, Gimonneau G, Awono-Ambéné PH, Nsango SE, Diallo D, Berry A, Texier G, Morlais I (2017).** Do the venous blood samples replicate malaria parasite densities found in capillary blood? A field study performed in naturally-infected asymptomatic children in Cameroon. Malar J. ; 16(1):345. DOI: 10.1186/s12936-017-1978-6.

ANNEXES

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2013/11/365/L/CNERSH/SP

Yaoundé, le 21 Novembre 2013

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session du 21 novembre 2013, a examiné le dossier de demande de clairance éthique pour le projet de recherche intitulé «**Malariès, genetics of resistance to malaria parasites in the mosquito anopheles gambiae**» soumis par le Docteur **Isabelle MORLAIS**, Investigateur principal, Institut de Recherche pour le Développement.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont présentés dans le document et seront minimisés par un personnel compétent. La notice d'information et le formulaire de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont incluses dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une durée de deux ans, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

Les investigateurs sont responsables du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devraient y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. Les investigateurs sont appelés à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-mentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Ampliations

- MINSANTE



LE PRESIDENT

Et Lazare KAPTUE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé individuel

Je soussigné, _____ (nom du parent/tuteur) représentant légal de _____ (nom du participant), certifie avoir donné mon consentement libre et éclairé pour la participation de mon enfant au projet de recherche *MALARES*.

J'ai bien compris la notice d'information qui m'a été remise concernant cette étude. Je comprends que mon enfant pourra ressentir un léger inconfort au moment de la piqûre et que, bien que les risques soient mineurs, des effets secondaires au traitement anti- paludisme peuvent survenir s'il est traité. Je suis conscient qu'il n'y a pas davantage de bénéfices que ceux cités dans la notice d'information, ni pour moi, ni pour mon enfant.

J'ai lu la notice d'informations, ou elle m'a été lue. J'ai eu l'opportunité de poser des questions à ce sujet et on a répondu de manière satisfaisante à toutes les questions que j'ai posé. J'ai obtenu le nom du Coordonnateur du Projet et je peux le joindre si j'ai des questions supplémentaires concernant les droits de mon enfant.

J'accepte librement que mon enfant participe à cette étude et je comprends que je peux retirer mon enfant de l'étude à tout moment sans que cela n'affecte en rien ses bénéfices en qualité que participant de l'étude.

Nom du participant et Signature du parent ou tuteur _____

Date _____

Jour/mois/année

Si illettré

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

Nom du témoin and Signature du témoin _____ **Empreinte du pouce du parent**

Date _____

Jour/mois/année

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

Nom du chercheur _____ **Signature** _____

Date _____

Jour/mois/année

Une copie de ce formulaire de consentement éclairé a été fournie au parent ou tuteur du participant _____ (initiales) par le chercheur ou un assistant.

Annexe 2 : Note de sensibilisation à l'attention des parents d'élèves

Chers parents,

Nous vous informons que dans le cadre d'une enquête sur le paludisme, effectuée en collaboration entre l'hôpital de Mfou et l'IRD- OCEAC de Yaoundé, nous passerons effectuer un prélèvement sanguin (goutte épaisse) aux enfants de l'école afin de déterminer s'ils sont atteints par la maladie.

Les enfants chez lesquels le parasite sera détecté seront traités gratuitement.

Les enfants porteurs de gamétocytes, forme de dissémination de la maladie seront sollicités pour effectuer un prélèvement à Yaoundé.

Nous assurerons dans ce cas leur transport, et ils seront accompagnés par un proche de Mfou. Il leur sera remis à Yaoundé une moustiquaire imprégnée afin d'éviter à l'enfant de nouvelles infections par le paludisme.

Si vous ne souhaitez pas que votre enfant participe à cette enquête, nous vous prions d'en informer le Directeur de l'école.

Fait à Yaoundé, le 20 mars 2014

Annexe : 3

Protocole d'extraction d'ADNg sur Carcasses de moustique _ Macherey-Nagel Kit

Les échantillons sont contenus dans un bain d'éthanol 70° et rangés à -20°C.

- Disposer les tubes d'échantillons à extraire sur la paille et les laisser à température ambiante pendant 10 à 15 min.
- Incuber le tampon d'éluion à 37°C ou 56°C.
- Nettoyer chaque tube à l'aide d'un papier absorbant.

NB : Si les tubes ne sont pas nettoyés, l'eau qui se forme sur les parois externes lors du dégivrage va effacer les identifications portées au cryomarqueur, pendant le broyage au « Precellys ».

- Reporter systématiquement tous les identifiants des échantillons à extraire sur le « master sheet ».
- Faire une petite Centrifugation des tubes contenant les échantillons à extraire.
- Se rassurer par la suite que les carcasses sont immergées dans l'éthanol.
- Ouvrir les tubes et retirer l'éthanol à l'aide d'une pipette.

NB : Laisser la carcasse dans le cul du tube lors de l'enlèvement de l'éthanol.

NB : Se rassurer autant que possible de ne pas emporter des parties de la carcasse (pattes, ailes...) lors de l'enlèvement de l'éthanol.

- Transférer le tampon de lyse selon le volume indiqué par le fabricant (Cf : MN Nucleospin Tissue XS kit).
- Ajouter des billes dans les tubes et refermer hermétiquement.

NB : La fermeture des tubes est renforcée avec des bandelettes de scotch découpées précédemment.

- Broyer les échantillons au « Precellys » suivant le programme « 2 » de l'appareil.
- Ajouter la protéinase K suivant le volume indiqué par le fabricant (Cf : MN Nucleospin Tissue XS kit).

NB1 : L'ajout de la protéinase K se fait après le broyage ! Cela permet d'éviter l'autodigestion de l'enzyme.

NB2 : L'ajout de la protéinase K se fait après que les tubes aient été ouverts à nouveau et que la mousse formée ait été dissipée.

- Homogénéiser le mélange dans chaque tube au vortex.
- Incuber les tubes à 56°C *overnight*.

NB : Une à deux heures après incubation, faire des chiquenaudes sur chaque tube.

----- Suivre ensuite le protocole indiqué par le fabricant -----
—

A l'étape d'éluion, le matériel génétique est élué dans un volume final de 50µl (25 µl * 2) du tampon d'éluion. L'éluion est faite dans des « safe-lock tubes » *Eppendorf*.

NB : Incuber les tubes à température ambiante pendant 5 min, après transfert du tampon d'éluion dans la colonne, avant la centrifugation.

- Reporter l'identification de chaque « Binding tube » sur le « safe-lock tube » correspondant après éluion.
- Homogénéiser au vortex le matériel génétique élué.
- Faire l'inventaire des identifiants et le rangement des tubes à -20°C.

Protocole d'extraction d'ADNg sur Estomacs de moustique _ QIAGEN Kit

Les échantillons sont contenus dans un bain d'éthanol 70° et rangés à -20°C.

- Disposer les tubes d'échantillons à extraire sur la paille et les laisser à température ambiante pendant 10 à 15 min.
- Incuber le tampon d'élution à 37°C ou 56°C.
- Nettoyer chaque tube à l'aide d'un papier absorbant.

NB : Si les tubes ne sont pas nettoyés, l'eau qui se forme sur les parois externes lors du dégivrage va effacer les identifications portées au cryomarqueur, pendant le broyage au « Precellys ».

- Reporter systématiquement les identifiants des échantillons à extraire sur un « master sheet ».
- Faire une petite Centrifugation des tubes contenant les échantillons à extraire.

NB : Se rassurer par la suite que les estomacs sont immergés dans l'éthanol.

NB : Si l'estomac reste collé sur la paroi du tube hors de l'éthanol, utiliser un cône fin avec l'extrémité conique imprégné d'éthanol pour le faire coulisser soigneusement jusqu'au fond.

- Transférer le tampon de lyse selon le volume indiqué par le fabricant (Cf : Qiagen blood and tissue kit).
- Ajouter des billes dans les tubes et refermer hermétiquement.

NB : La fermeture des tubes est renforcée avec des bandelettes de scotch découpées précédemment.

- Broyer les échantillons au « Precellys » suivant le programme « 2 » de l'appareil.
- Ajouter la protéinase K suivant le volume indiqué par le fabricant (Cf : Qiagen blood and tissue kit)

NB1 : L'ajout de la protéinase K se fait après le broyage ! Cela permet d'éviter l'autodigestion de l'enzyme.

NB2 : L'ajout de la protéinase K se fait après que les tubes aient été ouverts à nouveau et que la mousse formée ait été dissipée.

- Homogénéiser le mélange dans chaque tube au vortex.
- Incuber les tubes à 56°C au moins pendant 6h.

NB : Une à deux heures après incubation, faire des chiquenaudes sur chaque tube.

----- Suivre ensuite le protocole indiqué par le fabricant -----

A l'étape d'élution, le matériel génétique est élué dans un volume final de 50µl (25 µl + 25 µl) du tampon d'élution. L'élution est faite dans des « safe-lock tubes » *Eppendorf*.

- Reporter l'identification de chaque « Binding tube » sur le « safe-lock tube » correspondant après élution.
- Homogénéiser au vortex le matériel génétique élué.
- Faire l'inventaire des identifications et le rangement des tubes à -20°C.

Attention !

1- Ne pas confondre les identifiants ou faire des contaminations lors du transfert des échantillons dans les colonnes. Pour ce faire :

- Chaque « Binding tube » stérile est apparié à chaque tube d'échantillon sur le portoir.
- Chaque « Binding tube » est ouvert uniquement lors du transfert de l'échantillon correspondant.
- Reporter l'identification du tube d'échantillon sur le « Binding tube » correspondant.
- Ne pas jeter les tubes d'échantillons après le transfert. Cela permet de faire un inventaire des identifications après l'extraction.

2- L'identification des tubes comprend :

- Le nom de la lignée (Ngousso => Ng ; L3-5 =>L)
- L'ordre de l'échantillon dans la lignée (Ex : Ng1, Ng2, Ng3, Ng4, Ng5 ...)
- Le matériel biologique (Carcasses => C ; Midguts => M)
- Le code du porteur ou de l'expérience (Ex : C415)
- La charge oocystique entre parenthèses

3- Exemple d'identification :

Ng471_C	Ng471_M
C415_(46)	C415_(46)

Protocol: DNA extraction from parasites (Trophozoites_Tpf and Gametocytes_Gpf) _ QIAGEN kit

All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on the bottle.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube containing about 200 µl of sample (human parasite_Gametocytes).

2. Add 180 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s. To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

3. Incubate at 56°C for 15 min. DNA yield reaches a maximum after lysis for 15 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

4. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

5. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

8. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate. Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

10. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min. This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

12. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 50 µl Tris buffer (10mMol_Ph 8). Incubate at room temperature (15–25°C) for 2-5 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

13. Repeat centrifugation adding 25 μ l Tris in the QIAamp Mini spin column buffer (10mMol_Ph 8), and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 2 min.

Note: Incubate the Tris buffer (10mMol_Ph 8) for some time at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Protocole d'extraction d'ADNg sur moustique entier _ *CTAB

- 1- Broyer chaque moustique dans 200 ml de CTAB 2%
- 2- Mettre au Bain-Marie 65°C pendant 5 minutes
- 3- Ajouter 200 ml de chloroforme – Mélanger par inversion
- 4- Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à température ambiante
- 5- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube
- 6- Ajouter 200 ml d'Isopropanol sur ce surnageant – Bien mélanger par inversion
- 7- Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm, à température ambiante
- 8- Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 ml d'Ethanol 70%
- 9- Centrifuger 5 minutes, 12 000, température ambiante
- 10- Vider l'Ethanol
- 11- Sécher le culot 5 minutes maximum au speed-vac
- 12- Reprendre dans 20 ml d'H₂O – Ne pas vortexer – Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une 1/2 journée).

CTAB 2%

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	100 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB*	20 g	2 %
ddH ₂ O	QSP 1 L	

*CTAB : Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à température ambiante.

Extraction de l'ADNg sur moustique entier _ **Fast Grinding Buffer*

Dans une plaque 96 puits à fond plat (sur glace):

- Endormir les moustiques au CO₂ et les maintenir sur glace.
- Mettre un adulte dans chaque puits.
- Congeler les moustiques 15-20min à -20°C.
- Ajouter 100µl de *Fast Grinding Buffer* (FGB) + proteinase K (1µl de prot.K à 20mg/ml pour 100µl de FGB).
- Broyer avec l'homogénéiseur (plaque à pilons).

Dans une plaque PCR 96 puits:

- Transférer 50µl de broyat dans une plaque PCR 96 puits. *Eviter de pipeter des tissus.*
- Incuber 1 heure à 56°C, puis 5min à 95°C.
- Ajouter 100µl de Tris 10mM pH 7,5.
- Si nécessaire, rassembler 4 puits en 1 (20µl de chaque puits) dans une nouvelle plaque.

**Fast grinding buffer* : 10mM Tris pH 8,2 + 1mM EDTA + 25mM NaCl

Annexe 4 : Coordonnées GPS des points de collectes d'échantillons dans les villes de Mfou et Yaoundé.

Localités : Mfou	Coordonnées GPS	
Abang-bikok	N 03°38'09.5"	E 011°30'21.4"
Abembe	N 03°42'36.3"	E 011°41'15.7"
Adoum	N 03°52'20.8"	E 011°30'36.5"
Ebang-mengong	N 03°42'01.3"	E 011°27'01.1"
Ekali	N 03°52'07.5"	E 011°28'37.1"
Ekok	N 03°40'39.2"	E 011°41'11.8"
Ekoko II	N 03°42'19.1"	E 011°32'06.3"
Endoum	N 03°52'20.8"	E 011°30'36.5"
Essazok	N 03°40'55.1"	E 011°32'13.2"
Kamba	N 03°43'41.7"	E 011°29'13.9"
Mekomba	N 03°52'19.5"	E 011°30'36.8"
Metet	N 03°38'45.5"	E 011°35'06.0"
Mfida	N 03°40'41.9"	E 011°36'08.5"
Nkassomo	N 03°46'13.1"	E 011°36'35.0"
NkilzoK	N 03°40'40.6"	E 011°40'02.0"
Nkol-Koumou	N 03°51'43.7"	E 011°24'09.2"
Nkol-mefou	N 03°41'59.7"	E 011°33'24.6"
Nkolnda	N 03°44'51.1"	E 011°32'10.0"
Nkoumou	N 03°39'09.1"	E 011°31'31.6"
Nyomo	N 03°40'41.9"	E 011°36'08.4"

Localités : Yaoundé	Coordonnées GPS	
Ahala	N 03°48'01.2"	E 011°29'32.1"
Mvan	N 03°48'21.9"	E 011°30'28.9"
Nkolbisson	N 03°52'10.0"	E 011°27'09.4"
Nkolondom	N 03°57'16.6"	E 011°29'42.4"
Odza	N 03°47'06.5"	E 011°31'14.8"

Annexe 5 : Fréquences alléliques et génotypiques de *TEPI* chez *An. coluzzii* et *An. gambiae*.

Alleles frequencies_ <i>An. coluzzii</i>				
R1	R2	S1	S2	Total
0,01344538	0,06638655	0,56554622	0,35462185	1
Phenotypes	Observed	Expected	Chi ²	
R1/R1	1	0,10756303	7,40443803	
R1/R2	1	1,06218487	0,00364057	
R1/S1	11	9,0487395	0,42076773	
R1/S2	2	5,67394958	2,37892588	
R2/R2	7	2,62226891	7,3083769	
R2/S1	36	44,6781513	1,6856183	
R2/S2	28	28,0151261	8,1669E-06	
S1/S1	198	190,306303	0,31104057	
S1/S2	230	238,660504	0,31427208	
S2/S2	81	74,8252101	0,50956129	
Total	595	595	20,3366495	
Classes			10	
Parameters			3	
dl			7	
P-value			0,00488663	
Conclusion			Significatif	

Alleles frequencies_ <i>An. gambiae</i>				
R1	R2	S1	S2	Total
0,01679104	0,13712687	0,76212687	0,08395522	1
Phenotypes	Observed	Expected	Chi ²	
R1/R1	0	0,1511194	0,1511194	
R1/R2	1	2,46828358	1	
R1/S1	15	13,7182836	0,11975237	
R1/S2	2	1,51119403	0,15810761	
R2/R2	15	10,0788246	2,40285628	
R2/S1	104	112,032649	0,57593438	
R2/S2	12	12,3414179	0,00944512	
S1/S1	319	311,328825	0,18901858	
S1/S2	60	68,5914179	1,07611803	
S2/S2	8	3,77798507	4,71823199	
Total	536	536	10,2740072	
Classes			10	
Parameters			3	
dl			7	
P-value			0,17357018	
Conclusion			Non-Significatif	

Annexe 6 : Expériences exclues : moustiques de terrain

Expériences	Gaméto (Gpf/ μ L)	<i>An. coluzzii</i>		<i>An. gambiae</i>	
		Effectifs	Infection	Effectifs	Infection
C109	56	0	0	4	0
C111	24	7	1	40	0
C114	174	2	0	5	0
C116	113	8	0	6	0
C117	12	5	0	5	0
C120	40	1	0	16	1
C123	43	1	0	3	0
C156	97	7	1	4	0
C161	210	3	1	7	1
C181	31	1	0	1	0

Résistance des moustiques vs virulence du parasite : Etude des interactions génétiques entre le parasite humain *Plasmodium falciparum* et les vecteurs *Anopheles gambiae* et *Anopheles coluzzii* en conditions naturelles

Résumé

Les moustiques *An. coluzzii* sont des vecteurs du paludisme humain en Afrique subsaharienne (Fontenille et al., 2003). Ils s'infectent après une prise de repas de sang chez un l'hôte humain porteur de gamétocytes. Les études sur la résistance/sensibilité d'*An. coluzzii* au parasite *P. falciparum* définissent sa compétence vectorielle (Ndiath et al., 2011 ; Fryxell et al., 2012 ; Gnémé et al., 2013 ; Boissière et al., 2013). La compétence vectorielle d'*An. coluzzii* au parasite *P. falciparum* est déterminée par des gènes pro/antiparasitaires, dont *TEP1* qui montre un polymorphisme à l'origine de la résistance/sensibilité des moustiques vis-à-vis de *P. berghei*, parasite de rongeur (Baxter et al., 2007 ; Blandin et al., 2009). Dans nos travaux nous montrons que *TEP1* est un facteur antiparasitaire majeur dans la réponse contre *P. falciparum*, mais n'explique pas seul la résistance/sensibilité des moustiques vis-à-vis du parasite. D'autres facteurs génétiques pro/antiparasitaires non encore déterminés seraient impliqués dans la compétence vectorielle chez les moustiques *An. coluzzii*. Pour identifier les gènes pro/antiparasitaires impliqués dans les interactions *An. coluzzii* – *P. falciparum*, et étudier l'effet de leur polymorphisme sur la résistance/sensibilité des moustiques vis-à-vis du parasite, nous avons réalisé sur le terrain, à Mfou au Cameroun, des infections expérimentales avec des isolats naturels de *P. falciparum* chez les moustiques L3-5, S1low et S1high sélectionnés pour leur résistance/sensibilité à *P. berghei*. Les moustiques Ngouso sont utilisés ici comme contrôle de l'infectivité des parasites.

Mots clés : *An. coluzzii*, *P. falciparum*, *TEP1*, Compétence vectorielle

Résumé en anglais

Anopheles coluzzii mosquitoes are vectors of human malaria in sub-Saharan Africa. Still, even within a vector species, the ability of mosquitoes to carry malaria parasites varies extensively between individuals, with some mosquitoes that eliminate all parasites, and are therefore unable to transmit the disease. Polymorphism in the complement-like protein *TEP1* was shown to contribute to determine mosquito susceptibility to the murine malaria parasite *P. berghei* (Blandin et al., 2009) as well as to the human malaria parasite *P. falciparum* (White et al., 2010). Still, we demonstrated that *TEP1* alone could not fully explain mosquito resistance and we set up to identify additional genetic factors that determine mosquito vector competence in the Ngouso line that was recently colonised in Cameroon and whose phenotype range varies extensively when exposed to *P. berghei* infection. To be independent from variations in the *TEP1* locus, we first selected a parental line homozygous for a single *TEP1* allele, *TEP1**S1, that was previously linked to mosquito susceptibility. We then created isofemale families and selected them according to their phenotype upon infection with the murine malaria parasite *P. berghei* over several generations to create two lines carrying either many (S1high) or few (S1low) parasites. To identify the regions of the genomes that are linked to this phenotypic difference, we performed crosses and QTL mapping. To test whether the phenotypic difference selected upon *P. berghei* infections was conserved for *P. falciparum*, we subjected our two lines to blood meals infected with natural isolates of the human parasite collected in Cameroon. Results of the selection process and field infections will be presented.

Key words: Mosquito vectorial competence, *An. Coluzzii*, *P. falciparum*, *TEP1*