

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie

Formation doctorale : Parasitologie

**Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement**

présentée et soutenue publiquement

par

Zeinab ANNAN

le 12 décembre 2007

**Structure génétique des populations de *Plasmodium falciparum*, agent de la
forme grave du paludisme, chez l'homme et les anophèles vecteurs en
Afrique**

JURY

M. Richard PAUL	Directeur de Recherche Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
M. Christophe ROGIER	Professeur IMTSSA, Marseille-Armées	Rapporteur
M. Carlo SEVERINI	Directeur de Recherche Istituto Superiore di Sanità, Rome	Examineur
M. Bernard GODELLE	Professeur Université Montpellier II	Examineur
M. Didier FONTENILLE	Directeur de Recherche IRD, Montpellier	Directeur
M. Patrick DURAND	Ingénieur de Recherche CNRS, Montpellier	Co-directeur

Remerciements

Je remercie Didier Fontenille, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie en DEA puis en thèse au sein de l'UR016 à l'IRD, pour avoir patiemment suivi ce travail au cours de ces années de thèse, et pour m'avoir permis de découvrir l'Afrique. Je ne connaissais ni ce continent, ni les moustiques, ni le paludisme, avant de venir à Montpellier, et je lui dois ces découvertes passionnantes.

Je remercie François Renaud, directeur du GEMI, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pour y effectuer ma thèse, pour les discussions qui ont été sources de réflexions utiles et m'ont aidé à cadrer ce sujet, et pour toute l'aide qu'il a apportée dans la valorisation de ce travail de thèse.

Je remercie Patrick Durand, mon co-directeur de thèse, pour sa présence et sa disponibilité quotidienne dans l'élaboration et la conduite de ce travail de thèse, pour les discussions toujours éclairantes, pour son aide et pour son soutien fournis à chaque étape de ce long travail. Merci à lui.

Je suis reconnaissante aux membres du jury, et parmi eux, à Rick Paul et à Bernard Godelle, pour leur patience et leur disponibilité renouvelée. J'adresse également mes remerciements à Christophe Rogier, pour sa disponibilité à revoir ce travail comme rapporteur, et à Carlo Severini pour sa disponibilité.

Ma thèse, avant que d'évoluer vers un long travail de rédaction, a aussi été une aventure sur le terrain au Cameroun. Je remercie toute l'équipe de l'OCEAC à Yaoundé, les Frédéric Simard, les Parfait, les Antonio, les Charles Wondji, les J-P, les Sylvie, les Isaac, les Elysée, les Rose, les Serge, les Toto, les Roger. Ils m'ont accueilli au Cameroun, m'ont accompagné dans mes missions et initié aux pratiques du terrain. Ils savent l'art de la causerie joyeuse, qui fait passer plus vite les longues heures de dissection.

Un grand merci également aux habitants du village de Simbock, en pays Ewondo, et à ceux du village de Tibati, chef-lieu de la province de l'Adamaoua. Je distingue parmi eux François Enyégué et Al-Kassoum, merci à vous en leur nom à tous.

Je remercie enfin tous les membres et amis des laboratoires du LIN, du GEMI, et de l'IRD à Montpellier, ceux qui en font partie ou qui y sont passés au cours de ces années de thèse. Je ne m'aventurerai pas à citer de noms ici, ils sont nombreux. Mais je pense à chacun de ceux qui m'ont apporté leur soutien et leur amitié dans la réalisation de ce travail, sous forme d'une aide technique, de discussions éclairantes, ou de bons moments partagés : Soyez tous remerciés.

À mes parents,

À mes frères et sœurs,

À mes proches,

Merci pour votre soutien : Ce travail n'aurait pu se faire sans vous.

Sommaire

GÉNÉRALITÉS	6
1 <i>Le paludisme, une endémie africaine</i>	7
1.1 Le paludisme dans le monde et en Afrique	7
1.2 L'effort de maîtrise du paludisme	8
2 <i>Le paludisme est une interaction hôte-parasite</i>	11
3 <i>Structure génétique des populations de parasite</i>	12
LE SYSTÈME BIOLOGIQUE PALUSTRE.....	14
1 <i>Les parasites Plasmodium humains</i>	15
1.1 Systématique du genre Plasmodium	15
1.2 Brève phylogénie du genre Plasmodium.....	15
1.3 Distribution.....	16
1.4 Hôtes vertébrés	17
2 <i>Les Anophèles vecteurs</i>	17
2.1 Systématique du genre Anopheles	17
2.2 Relations phylogénétiques entre les anophèles vecteurs.....	18
2.3 Cycle de vie des anophèles.....	19
3 <i>Fonctionnement de l'interaction entre le parasite et ses deux hôtes</i>	20
3.1 Cycle de vie chez l'homme	20
3.2 Cycle de vie chez le vecteur	23
OBJECTIFS ET CONDUITE DE LA THÈSE	25
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	30
PARTIE 1 : INFECTION A PLASMODIUM FALCIPARUM ET TRANSMISSION DU PARASITE EN AFRIQUE	31
1 <i>Les vecteurs anophèles dans les contextes africains de la transmission</i>	32
1.1 Les espèces anophèles vecteurs majeurs en Afrique.....	32
1.2 Mesures de la transmission	35
1.3 Les déterminants de la capacité vectorielle des anophèles	38
1.4 Les profils africains de la transmission	55
2 <i>L'infection à P. falciparum dans les contextes africains de la transmission.....</i>	57

2.1	La multiplicité de l'infection à <i>P. falciparum</i>	57
2.2	Acquisition de l'immunité et multiplicité de l'infection	61
2.3	Multiplicité de l'infection et évolution de la virulence	65
2.4	Relation entre le taux d'inoculation entomologique (h) et l'infection à <i>P. falciparum</i>	67
2.5	Les infections mixtes : interactions et dynamiques chez les deux hôtes humain et vecteur	72
2.6	Transmission de <i>P. falciparum</i> de l'homme vers le vecteur : les gamétocytes	74
3	<i>Conclusion</i>	76
PARTIE 2 : STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> EN AFRIQUE		78
1	<i>Bases théoriques générales de l'étude de la structure des populations parasitaires</i> ..	78
1.1	Distribution de la variabilité génétique entre les différents niveaux de structure d'une population.....	78
1.2	Les F-statistiques.....	84
2	<i>Le régime de reproduction de <i>P. falciparum</i></i>	85
2.1	La reproduction asexuée dans les populations de pathogènes	85
2.2	La théorie clonale de <i>P. falciparum</i>	88
2.3	Etudes du taux de clonalité / recombinaison dans les populations naturelles de <i>P. falciparum</i>	89
3	<i>Structuration spatiale du parasite <i>P. falciparum</i> en Afrique</i>	99
4	<i>L'impact de l'hôte vecteur: la spécificité dans le système anophèle/<i>Plasmodium</i></i>	100
4.1	Spécificité des interactions Anopheles/ <i>Plasmodium</i> : facteurs intrinsèques	101
4.2	Eléments extrinsèques de la spécificité anophèles/ <i>Plasmodium</i>	105
4.3	Conclusion.....	107
MATÉRIELS ET MÉTHODES		108
1	<i>Site d'étude : le Cameroun</i>	109
1.1	Diversité biogéographique camerounaise	109
1.2	Description des deux sites camerounais.....	111
2	<i>Echantillonnage du parasite chez les deux hôtes homme et anophèle</i>	114
2.1	Stades sanguins : collecte et traitement des échantillons	114
2.2	Stades chez le vecteur : collecte et traitement des moustiques	115

2.3	Identification morphologique et moléculaire	117
2.4	Dissection des moustiques et recherche des stades infectants du parasite	117
2.5	Dissection et isolement des oocystes	117
3	<i>Caractérisation moléculaire des stades sanguins et vectoriels</i>	118
3.1	Extraction de l'ADN	118
3.2	Génotypage : les marqueurs microsatellites	118
4	<i>Analyses statistiques</i>	121
4.1	Logiciels de génétique des populations	121
4.2	Autres outils d'analyses statistiques utilisés	125
RÉSULTATS		126
1	<i>Structuration génétique de P. falciparum en Afrique : l'impact de l'hôte vecteur</i>	127
1.1	Echelles locale, régionale et continentale : le rôle des vecteurs Anopheles gambiae s.s. et Anopheles funestus	127
	Article 1	131
1.2	Echelle locale en zone de forêt africaine : le rôle des vecteurs Anopheles nili et Anopheles moucheti	138
	Article 2	140
2	<i>Comparaison de la structure génétique de P. falciparum chez l'homme et le vecteur au Cameroun</i>	171
	Article 3	172
3	<i>Résultats complémentaires</i>	196
3.1	Le système vectoriel dans les deux sites camerounais	196
3.2	L'effet des clones sur l'estimation des paramètres de génétique des populations	203
DISCUSSION GÉNÉRALE		212
1	<i>Distribution de P. falciparum dans ses hôtes homme et anophèles vecteurs en Afrique</i>	213
1.1	Impact de l'espèce vectrice sur la distribution de P. falciparum	213
1.2	Distribution de l'infection à P. falciparum chez l'homme	218
2	<i>Structuration génétique de P. falciparum en zone endémique africaine</i>	219
2.1	Régime de reproduction et structure haplotypique de P. falciparum	219
2.2	Différentiation géographique entre sous-populations	224

2.3	Impact de l'espèce anophèle vecteur sur la structuration génétique de <i>P. falciparum</i>	227
2.4	Un modèle pour la structuration globale des populations de <i>P. falciparum</i> chez ses hôtes vecteurs	230
3	<i>Conclusion</i>	233
PERSPECTIVES		235
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		239
ANNEXES		259
Annexe 1	Position GPS des sites échantillonnés sur la carte du Cameroun.....	260
Annexe 2	Informations complémentaires à l'Article 1.....	262
Annexe 3	Article 4.....	274

Généralités

1 Le paludisme, une endémie africaine

1.1 Le paludisme dans le monde et en Afrique

Le paludisme ou malaria est la plus fréquente des infections parasitaires observées dans le monde. Il se manifeste chez l'homme par de fortes poussées de fièvre survenant à intervalles réguliers, dues à l'infection des globules rouges par un pathogène parasite protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Quatre espèces du genre *Plasmodium* infectent l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. L'infection à *P. falciparum* est la seule potentiellement mortelle pour l'homme. La transmission de ce parasite d'un hôte humain vers un autre hôte se fait via la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles* en quête de leur repas de sang. La capacité des parasites *Plasmodium* de se développer aussi bien chez l'homme que chez le moustique leur permet d'utiliser cet insecte comme un vecteur pour être transmis d'hôte en hôte.

On pense que l'espèce humaine a été la victime de ce fléau depuis son origine. Les premiers témoignages écrits en font mention. Hippocrate rapporte l'observation de fièvres particulières spécialement fréquentes dans les zones marécageuses, et décrit les premiers moyens mis en place pour s'en prémunir. Il faut attendre l'invention du microscope au 19^{ème} siècle pour permettre l'identification de l'agent pathogène en 1880 par Alphonse Laveran. L'implication des moustiques dans l'acquisition de l'affection avait été pressentie dès le 18^{ème} siècle, mais la démonstration de leur rôle vecteur n'est obtenue qu'en 1895 par Ronald Ross qui observe des oocystes de *Plasmodium* sur l'estomac d'un moustique *Anopheles*.

Plus d'un siècle après la compréhension du cycle de l'agent pathogène parasite, le paludisme reste de nos jours un fléau majeur. Le tribut humain, social et économique payé à la maladie est très lourd. Selon le rapport 2005 de l'initiative Faire Reculer le Paludisme (*Roll Back Malaria*), 107 pays et territoires comptaient des zones exposées au risque de transmission palustre fin 2004 ce qui représente quelques 3,2 milliards de personnes (40% de la population mondiale). Ces zones sont réparties sur l'ensemble de la zone intertropicale chaude et humide, à l'exception de certains pays et îles (Tahiti, Antilles françaises, Ile de la Réunion et Nouvelle-Calédonie), ainsi que les grandes agglomérations d'Asie et d'Amérique du Sud (l'anophèle y étant absent). On estime que 350 à 500 millions d'épisodes palustres cliniques se produisent chaque année, la plupart dus à *P. falciparum* et *P. vivax* (Figure 1). Entre 1,5 et 2,5 millions de personnes par an décèdent du paludisme à *P. falciparum* (WHO-UNICEF 2005).

Actuellement, 90% des décès et épisodes cliniques ont lieu en Afrique sub-saharienne où c'est la première cause de mortalité des enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes

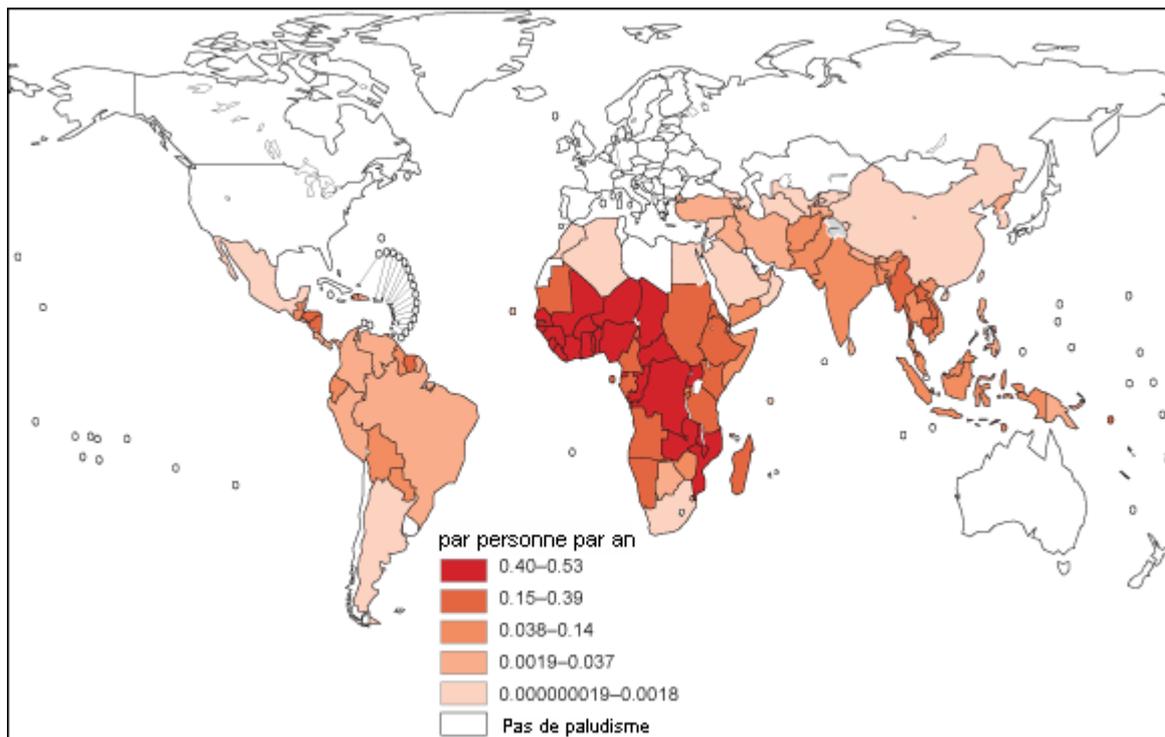


Figure 1. Distribution des cas cliniques de paludisme - causés indifféremment par les 4 espèces de *Plasmodium* humains et résultant d'une transmission locale - dans le monde par personne et par an. L'Afrique concentre la majorité des cas de paludisme. (Source : *World Malaria Report 2005*).

étant également particulièrement touchées. Chez les adolescents et les adultes qui ont acquis une prémunition contre les accès graves, les infections asymptomatiques y sont très fréquentes, *P. falciparum* représentant 90% des infections.

1.2 L'effort de maîtrise du paludisme

1.2.1 Stratégies classiques

L'effort de maîtrise du paludisme peut être orienté contre le parasite et contre le vecteur. Contre le parasite, il vise essentiellement à la stérilisation du réservoir humain, par des mesures préventives, comme la mise au point d'un vaccin et surtout la prophylaxie chimiothérapeutique préventive, et par des mesures curatives en cas d'accès palustre. La chloroquine, efficace et peu chère, a longtemps été très utilisée préventivement et en action curative, mais l'émergence de foyers de résistances multiples dans les années 1960 simultanément en Asie du Sud-Est et en Amérique latine, ont limité son efficacité (Wootton et al. 2002). L'utilisation de la sulfadoxine-pyriméthamine en remplacement dans les zones de résistance, elle aussi suivie de l'émergence de résistance, a conduit à la mise en place de politiques spécifiques de gestion des antipaludiques par associations médicamenteuses impliquant de nouvelles molécules comme l'artémisine et ses dérivés.

Ces mesures primaires de lutte contre la maladie doivent donc absolument s'accompagner de stratégies alternatives. La recherche d'un vaccin en fait partie. A l'heure actuelle, peu de vaccins efficaces existent contre les pathogènes transmis par les arthropodes (fièvre jaune, encéphalite japonaise et encéphalite à tiques) et ils n'ont pas permis d'éradiquer ces maladies. Aucun vaccin efficace n'a pu être mis au point à ce jour contre le paludisme (Snounou & Renia 2007). Les milliers d'années d'interactions coévolutives entre ce pathogène et son hôte humain ont favorisé une adaptation très fine du parasite au système immunitaire de son hôte : le cycle chez l'homme est entièrement endocellulaire (voir le cycle du parasite Figure 4) et le parasite présente une très grande diversité génétique, qui se traduit par une très grande variabilité des molécules (candidats vaccin potentiels) qu'il expose à la surface de ses cellules-hôtes.

Contre le vecteur, les méthodes de contrôle utilisent essentiellement les insecticides adulticides dans le but de réduire les deux principaux facteurs de la capacité vectorielle d'un vecteur, la longévité de sa population et la fréquence des contacts homme-vecteur (voir l'Encadré 1). Les pulvérisations d'insecticides dans les maisons et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides sont préconisées dans ces deux objectifs. Le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), composé stable, peu coûteux, et très efficace, possède un effet rémanent très prolongé et une bonne innocuité pour les manipulateurs et les habitants. Il a été largement utilisé en épandages massifs et en pulvérisations à l'intérieur des habitations à partir des années 1950 dans une politique « d'éradication du paludisme » (Molineaux & Gramiccia 1980), en association avec une large distribution de médicaments antipaludiques. Cette politique a permis d'obtenir de très bons résultats dans les zones tempérées à faible ou moyenne incidence palustre, ou dans les zones isolées géographiquement (en Europe, en Inde, en Amérique du Sud et Afrique du Sud, sur l'île de la Réunion).

1.2.2 Le cas de l'Afrique

Mais si le contrôle de la maladie a pu s'exercer avec succès dans certaines régions du globe, elle a été un échec en Afrique sub-saharienne. La très grande diversité des faciès éco-climatiques du continent africain y favorisent un système de transmission particulièrement efficace et diversifié, avec une grande variété de contextes épidémiologiques. Le comportement et l'efficacité des vecteurs africains, la longueur de la saison de transmission, l'ubiquité du paludisme sur le continent et les taux très élevés de transmission ont conduit en 1970 de nombreux pays africains à l'abandon de la politique « d'éradication » du paludisme (Mouchet et al. 2004). Depuis, l'abandon progressif des mesures de lutte mises en place au cours de ces décennies, auxquelles s'ajoutent les conséquences des conflits et déplacements

de populations, ainsi que la difficulté de l'accès aux soins, ont dégradé l'effort de maîtrise du paludisme en Afrique. La mortalité y a doublé au cours des 25 dernières années et le paludisme est réapparu dans des zones où il était maîtrisé et même éradiqué (Trape et al. 2002). Devant l'urgence de la situation, et l'absence de nouvelles alternatives, le DDT si décrié a été réintroduit récemment dans les directives de l'OMS pour le contrôle des populations de vecteurs (Mandavilli 2006).

1.2.3 Stratégies alternatives

Parallèlement cependant, d'autres types de stratégies de contrôle visant une applicabilité à plus long-terme se développent actuellement, tirant profit des séquençages complets des génomes de *P. falciparum* (Gardner et al. 2002) et de son vecteur africain majeur, *Anopheles gambiae* (Holt et al. 2002). Elles visent à remplacer la population de moustiques vecteurs par une population ayant perdu la capacité d'héberger et/ou de transmettre le parasite. Ces vecteurs génétiquement modifiés réfractaires à l'infection devront, une fois relâchés dans la nature, remplacer les populations vectrices naturelles et ainsi diminuer voir stopper la transmission (Alphey et al. 2002 ; Marrelli et al. 2007). L'efficacité d'une telle approche sur le terrain reste cependant encore un défi. En effet, une fois les gènes d'intérêts identifiés, leur transgénèse et leur expression maîtrisées, la valeur adaptative des populations génétiquement modifiées devra être au moins égale à celle des populations naturelles pour pouvoir les remplacer, et ainsi assurer efficacement la diffusion des gènes d'intérêts dans les populations naturelles de vecteurs (Marrelli et al. 2007). De plus, les recherches dans ce domaine se sont orientées jusqu'à présent vers le seul vecteur *An. gambiae*. Or, l'importance épidémiologique considérable des autres espèces vectrices dans nombre de faciès environnementaux, en particulier africains, peut suffire à assurer le maintien de la transmission palustre au dessus d'un seuil critique nécessaire pour atteindre une disparition de la prévalence parasitaire chez l'homme, si de plus il est prouvé que ces espèces transmettent bien les mêmes populations de parasites que l'espèce *An. gambiae* (Boete & Koella 2002 ; Killeen et al. 2006).

1.2.4 Et d'ici là ?

Quelle stratégie adopter en attendant ? Selon certains auteurs, le contrôle de la transmission palustre en Afrique doit être géré en tenant compte des particularités de la transmission sur ce continent. Dans les zones de grande stabilité du paludisme (c'est à dire les zones où les parasites sont transmis de façon régulière et soutenue, comme c'est le cas dans

les savanes d'Afrique de l'Ouest et les zones de forêt), les taux très élevés de piqûres infectantes entraînent chez l'homme la mise en place après l'âge de 5 ans d'une réponse immunitaire naturelle qui le protégera ultérieurement des accès perniciose mortels (voir Intro. biblio. Partie 1). Dans ces régions où les enfants de plus de 5 ans ne meurent plus du paludisme, les pulvérisations d'insecticides et les moustiquaires imprégnées ne peuvent que réduire transitoirement la capacité vectorielle sous un seuil qui restera supérieur au seuil critique (Killeen et al. 2006 ; Molineaux & Gramiccia 1980 ; Trape et al. 2002). Au contraire, dans les régions d'Afrique où le paludisme est instable (les parasites sont irrégulièrement transmis, avec des pics soudains de transmission certaines années), l'émergence d'épidémies entraîne une forte mortalité parmi toutes les classes d'âge d'une population qui n'est habituellement pas suffisamment exposée au risque palustre pour développer une immunité. La mise en œuvre du contrôle vectoriel en Afrique doit donc selon ces auteurs se focaliser sur les zones de paludisme instable où les conditions bioclimatiques sont favorables à l'émergence d'épidémies, et en tenant compte des comportements des vecteurs dans ces zones (endophilie de *An. funestus*) (Trape & Rogier 1996).

2 Le paludisme est une interaction hôte/parasite

Un parasite est un organisme qui se trouve à l'intérieur ou à l'extérieur d'un autre organisme duquel il obtient tout, ou une partie, de ses substances nutritives, généralement en utilisant des structures adaptées, et qui a un effet négatif sur l'hôte. Selon cette définition, plus de 50% des espèces existantes ont un style de vie parasitaire (Price 1977) et la plupart des animaux et des plantes sont impliqués dans une telle interaction (Combes 1995 ; de Meeus & Renaud 2002). A cause de l'association très étroite avec l'hôte, les interactions hôtes-parasites peuvent être considérées comme les plus spécifiques de toutes les interactions biotiques. Les contraintes d'infestation de l'hôte, de développement durable au sein de l'environnement hôte, et de transmission vers d'autres hôtes, entraînent la spécialisation extrême des parasites vis-à-vis de leurs espèces hôtes (Thompson 1994) via de fortes interactions génétiques entre le parasite et son hôte, à tel point que l'association « durable » entre ces deux organismes a été envisagée comme une nouvelle entité phénotypique constituée de deux génomes en interaction (Combes 1995).

La coévolution de ces deux génomes au sein des systèmes hôte/parasite est un équilibre dynamique entre des stratégies de développement du parasite aux dépens de l'hôte, et une réponse de l'hôte pour limiter le coût de ce développement. Ce processus de coévolution peut être assimilé à une « course aux armements », où chaque espèce représente

un environnement perpétuellement modifié auquel son adversaire doit s'adapter (Van Valen 1973) (bien que dans une interaction hôte/parasite, contrairement à la course aux armements réelle, les « armes » déjà utilisées ne soient pas périssables à long terme). Dans les systèmes hôte/parasite, comme les deux organismes s'adaptent perpétuellement aux modifications de l'autre, la probabilité d'extinction d'une espèce ne dépend donc pas de la durée de son existence, une espèce plus ancienne n'étant pas forcément plus adaptée qu'une espèce d'apparition plus récente (Van Valen 1973).

Le cycle de vie de *P. falciparum* est hétéroxène à deux hôtes obligatoires : l'homme est l'hôte intermédiaire, et l'anophèle vecteur est l'hôte définitif. Si *P. falciparum* est spécifique de son hôte intermédiaire, infectant exclusivement l'homme en conditions naturelles, il peut infecter en revanche plusieurs espèces de vecteurs au sein du genre *Anopheles*. Les parasites *Plasmodium* humains sont cependant très spécifiques : seule une soixantaine d'espèces appartenant toutes au même genre *Anopheles* sont de « bons » vecteurs de *Plasmodium* humains sur les quelques 500 espèces existant à travers le monde, alors que les *Plasmodium* aviaires ou sauriens sont transmis par plusieurs genres différents de *Culicidae* (voir le Système biologique palustre; Sinden 2002).

Les contextes de la transmission palustre sont de plus très hétérogènes, à la fois dans l'espace et dans le temps, avec de fortes variations saisonnières de la transmission au sein d'un même site. Le système biologique palustre présente donc une très grande variabilité, et les effets du parasitisme peuvent être très variables dans l'espace, dans le temps, et selon les hôtes infectés, les espèces hôtes et parasites évoluant au sein de paysages fragmentés et hétérogènes.

3 Structure génétique des populations de parasite

L'étude de la structure des populations de *P. falciparum*, de son régime de reproduction, et de l'impact des hôtes, homme et espèces anophèles vectrices présentes en sympatrie au sein des contextes de transmission palustres, sur la distribution de la variabilité des populations naturelles de ce parasite, nécessitent la prise en compte de la fragmentation des populations de parasites entre différentes échelles spatiales. Par cette association importante avec l'hôte, les populations de parasite sont en effet fortement subdivisées (Combes 1995). Divisées au sein d'un hôte, où elles peuvent parasiter différents tissus pour les *Plasmodium* de lézard infectant les globules rouges ou blancs d'un même hôte (Perkins 2000), divisées dans le temps, en sympatrie, si leurs cycles de transmission sont décalés (McCoy 2003), etc. La capacité des parasites à s'adapter localement aux environnements

hôtes et à évoluer en réponse aux pressions sélectives, notamment médicamenteuses et immunitaires, est affectée par le flux génique entre populations et par la dérive. L'étude de l'organisation des populations naturelles de parasites dans leur milieu naturel, pour en inférer la distribution et la taille des populations, les taux de migration et le système de reproduction, est à la base de la compréhension de la dynamique évolutive des espèces.

Pour les populations de parasite, les méthodes d'analyse indirecte par l'utilisation de marqueurs génétiques neutres permettent de mesurer la distribution de la variabilité génétique au sein et entre les populations naturelles du parasite. Le choix de l'échelle est à ce titre primordial, les populations du parasite *P. falciparum* étant distribuées de façon très hétérogène et selon plusieurs niveaux : l'individu hôte (i.e. infrapopulation parasitaire), c'est à dire l'homme ou le moustique femelle *Anopheles* ; les sous-populations locales des vecteurs d'une même espèce ; les sous-populations des différentes espèces *Anopheles* hôtes ; les populations régionales, et continentales. Les populations parasitaires sont donc fragmentées selon différents niveaux « emboîtés » les uns dans les autres, on dit qu'elles sont hiérarchisées.

Dans le cas de *P. falciparum*, et des parasites en général, la prise en compte de la structure hiérarchique des populations constitue la véritable innovation par rapport aux études de génétique des populations de ce parasite entreprises depuis l'avènement des méthodes de biologie moléculaire. Les processus évolutifs mis en place à l'échelle intra-hôte microgéographique sont en effet fondamentaux dans la compréhension du fonctionnement évolutif des populations de ce parasite. Par exemple, le système de reproduction et la structure des populations de *P. falciparum*, clonale ou panmictique, fait l'objet d'un débat depuis plusieurs décennies (Tibayrenc & Ayala 2002). La fécondation a lieu dans le vecteur, seule étape où il est possible d'avoir accès aux stades diploïdes issus du zygote. Or jusqu'à très récemment (Annan et al. 2007 ; Mzilahowa et al. 2007 ; Razakandrainibe et al. 2005) aucune étude n'avait été menée avec des marqueurs neutres sur les infrapopulations de parasite diploïdes présentes chez les vecteurs.

Ces études sont un préalable à la compréhension et au contrôle des maladies parasitaires d'intérêt médical. Dans le cadre de la mise en place d'un vaccin notamment, objectif essentiel en ce qui concerne le parasite *P. falciparum*, l'étude des processus de coévolution entre populations naturelles d'hôtes et de parasites contribue en effet à une meilleure compréhension des conséquences de sa mise en place sur le terrain (Gandon et al. 2001).

Le système biologique palustre

1 Les parasites *Plasmodium* humains

1.1 Systématique du genre *Plasmodium*

Les agents du paludisme sont des protozoaires de la classe des sporozoaires, embranchement des Apicomplexa, appartenant au sous-ordre *Haemosporida*, famille des *Plasmodidae*, genre *Plasmodium*. Ce genre a été distingué des autres sur la base de sa capacité à infecter d'autres types cellulaires que les érythrocytes, et par sa capacité à être transmis par des vecteurs diptères (Gilles 1993 cité par (Bruce-Chwatt 1980). Il comprend environ 80 espèces réparties en dix sous-genres, dont trois sont spécifiques de mammifères (primates et rongeurs), quatre des oiseaux et trois des reptiles. Des trois sous-genres de mammifères, seuls *Plasmodium* et *Laverania* sont spécifiques des primates (Figure 2).

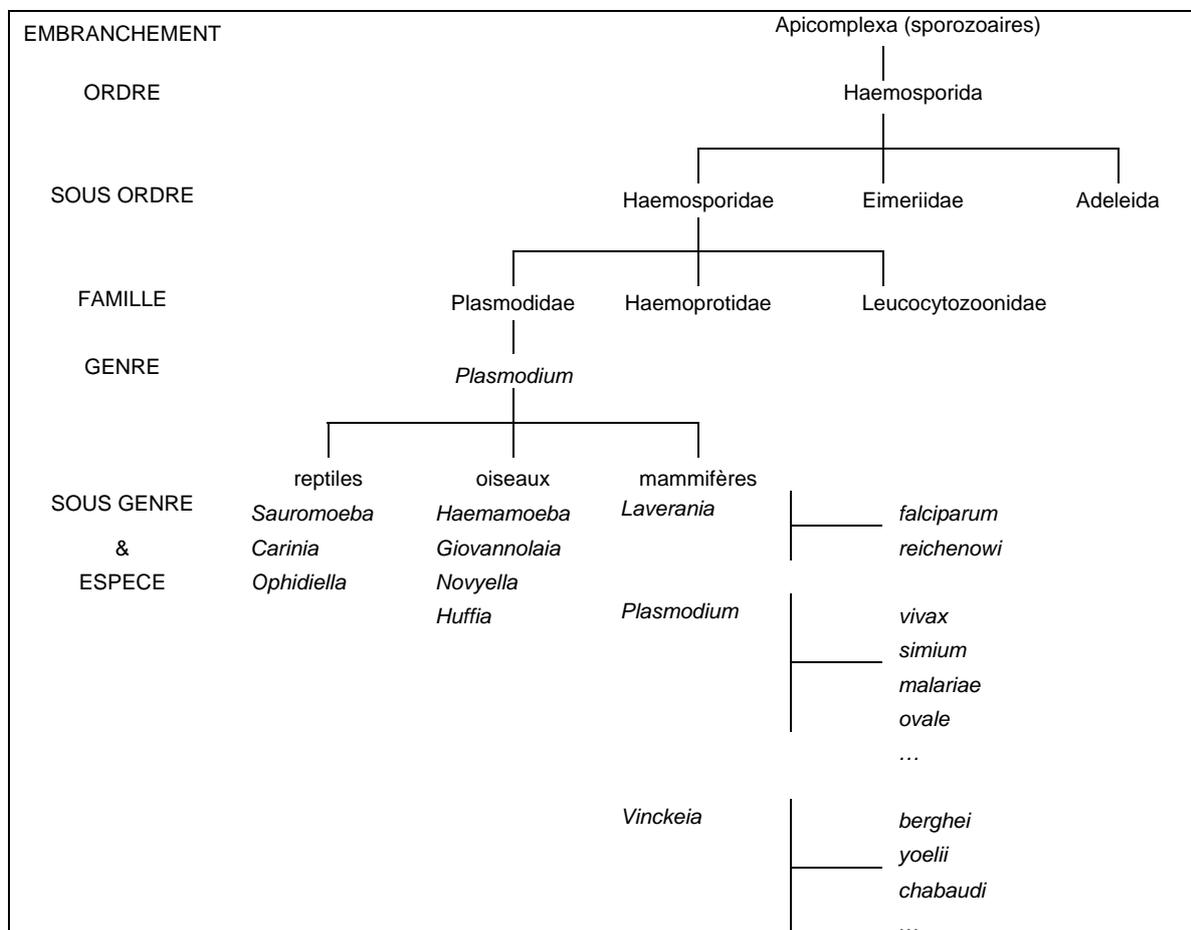


Figure 2. Classification partielle des *Plasmodium*. D'après Bruce-Chwatt (1980).

1.2 Brève phylogénie du genre *Plasmodium*

Les histoires évolutives du genre *Plasmodium* et de l'espèce la plus dangereuse pour l'homme, *P. falciparum*, ont fait l'objet de nombreuses études, d'abord basées sur la morphologie, la biologie et l'affiliation des parasites pour leurs hôtes. Le séquençage complet

du génome de *P. falciparum* a permis l'avènement de nouvelles techniques de phylogénies moléculaires et d'analyses de la structure du génome à l'échelle globale, précisant ainsi le débat dont font l'objet les nombreuses théories élaborées sur le sujet (Das et al. 2007).

Les quatre parasites humains, *P. falciparum* (Welsh 1897), *P. malariae* (Laveran 1881), *P. ovale* (Stephens 1892), et *P. vivax* (Grassi & Feletti 1890 cités par (Bruce-Chwatt 1980 ; Garnham 1966) sont très distants phylogénétiquement l'un de l'autre, leur divergence évolutive étant antérieure à l'origine des hominidés. Les trois derniers appartiennent à un même clade comprenant l'ensemble des autres plasmodies de mammifères. *P. malariae* serait apparu le plus tôt, avec l'apparition du premier primate pro-simien (lémurien) il y a 55 millions d'années. Il est le seul parasite commun à l'homme et au chimpanzé. *P. vivax* et *P. ovale* seraient ensuite apparus il y a 35 millions d'années à la séparation des premiers simiens. Plusieurs de ces parasites se seraient retrouvés associés à l'homme par transfert latéral à partir d'autres espèces d'hôtes vertébrés (Garnham 1966). *P. reichenowi*, parasite de chimpanzés et de gorilles, est le seul proche parent connu de *P. falciparum*. Ces deux plasmodies sont classées à part dans le sous-genre *Laverania*. Les études de biologie moléculaire ont confirmé cette relation phylogénétique (Ayala et al. 1999). De plus, *P. malariae* n'est pas distinguable génétiquement de *P. brasilianum*, ni *P. vivax* de *P. simium*, deux parasites de singes du Nouveau Monde (Ayala et al. 1999).

Deux théories pour la phylogénie de *P. falciparum* ont été avancées : celle d'une origine aviaire du parasite, avec passage à l'homme par transfert latéral à partir des *Plasmodium* aviaires très récemment (moins de 5000 ans) (Waters et al. 1991), et celle d'une origine plus ancienne de *P. falciparum* (10000 ans), rattaché aux primates depuis l'origine, avec *P. reichenowi* en parasite du chimpanzé, les deux espèces ayant divergé au moment de la divergence de l'ancêtre commun aux hommes et aux singes (Escalante & Ayala 1995). Les conclusions contradictoires des analyses de la diversité génétique du parasite ont également alimenté le débat concernant l'origine du parasite, le défaut de diversité génétique neutre retrouvé dans certaines études étant expliqué par la théorie de la « *Malaria's Eve* » (Rich et al. 1998 ; Volkman et al. 2001) : les populations actuelles de *P. falciparum* sont issues de une ou quelques souches ancestrales africaines ayant disséminées sur le reste du globe avec l'homme après l'avènement de l'agriculture.

1.3 Distribution

Parmi les quatre espèces de parasites responsables des paludismes humains, deux sont communes, *P. falciparum* et *P. vivax* ; les deux autres espèces, *P. malariae* et *P. ovale*, ont été moins recherchées (Mueller et al. 2007). *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue dans les

zones tropicales et subtropicales, bien qu'il puisse également être transmis dans certaines régions tempérées. *P. vivax* possède la plus large distribution, présent dans nombre de zones tempérées, mais également en zones intertropicale. En dehors de certaines régions colonisées par des peuples d'origines différentes (Ethiopiens sémites, Malgaches indonésiens, mais aussi Bushmen), il est absent de la zone afrotropicale, parce que les Africains ne possèdent pas l'antigène Duffy nécessaire à la pénétration de *P. vivax* dans les érythrocytes. Il y est remplacé par *P. ovale*. *P. malariae* est présent de façon plus dispersée sur la même zone géographique que *P. falciparum*.

1.4 Hôtes vertébrés

P. falciparum, *P. vivax* et *P. ovale* sont des espèces infectant exclusivement l'homme. *P. malariae* infecte l'homme et les grands singes africains. Hormis les chimpanzés d'Afrique tropicale, aucun autre réservoir animal naturel et non accidentel n'est connu pour ces espèces plasmodiales.

2 Les Anophèles vecteurs

2.1 Systématique du genre Anopheles

Tous les vecteurs de *Plasmodium* de mammifères sont des moustiques (*Diptera*) appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae* (Figure 3). La sous-famille *Anophelinae* est sous-divisée en trois genres : *Anopheles*, *Bironella*, *Chagasia*. Le genre *Anopheles* est le genre le plus riche en espèces ; il est sous-divisé en six sous-genres, dont *Anopheles* (distribution cosmopolite) et *Cellia* (distribution restreinte à l'Ancien Monde) (Harbach 1994 ; Harbach 2004). Les quatre autres sous-genres sont spécifiques d'Amérique du Sud. Les six sous-genres seraient monophylétiques, le sous-genre *Stethomyia* ayant divergé le premier, l'autre lignée évoluant en deux clades, dont l'un comprend *Anopheles* et *Cellia* (Krzywinski & Besansky 2002).

Les vecteurs du paludisme humain et mammifère en général appartiennent tous au genre *Anopheles*, qui regroupe au total quelques 484 espèces réparties sur l'ensemble de la planète à l'exception de l'Antarctique. Seules 70 à 80 de ces espèces sont considérées comme des vecteurs, et parmi elles, 40 sont considérées comme des vecteurs d'importance (Service 1993 cité par Bruce-Chwatt 1980). Outre les protozoaires, les anophèles transmettent également des nématodes (*Wuchereria bancrofti*) et des arbovirus.

Très peu d'espèces anophèles sont vecteurs des *Plasmodium* humains et d'autres mammifères en conditions naturelles, alors que les *Plasmodium* aviaires et sauriens sont

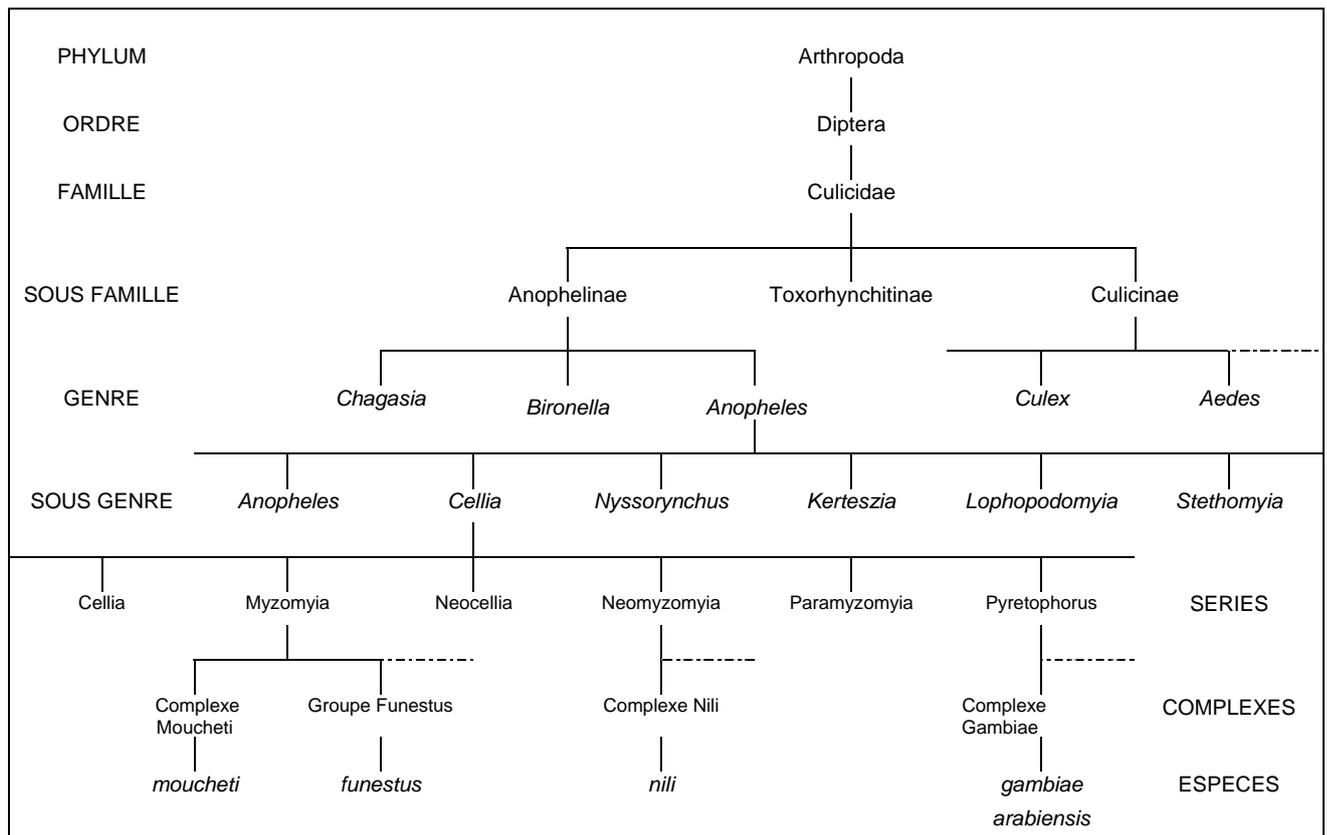


Figure 3. Classification partielle des anophèles (Bruce-Chwatt 1980 ; Harbach 1994 ; Harbach 2004).

transmis par un large éventail de genres de moustiques et même par les phlébotomes (Sinden et al. 2002). Or, la plupart des espèces anophèles sont en fait compétentes pour la transmission des parasites *Plasmodium* humains, mais elles ne sont pas vecteurs dans la nature pour deux raisons majeures : d’une part parce que leur comportement non-anthropophile ferme le filtre de rencontre entre le parasite et ses espèces ; et/ou, d’autre part, parce que ces espèces ne sont pas capables de survivre assez longtemps pour permettre le développement total du parasite, et ne transmettent donc jamais les stades infectants en conditions naturelles.

2.2 Relations phylogénétiques entre les anophèles vecteurs

La Figure 3 met en exergue les cinq espèces majoritairement impliquées dans la transmission des parasites *Plasmodium* en Afrique : *Anopheles gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. Cette classification a été élaborée sur le modèle de Service (1993, cité par Bruce-Chwatt 1980), et actualisée selon les modifications de Harbach (1994), selon des critères essentiellement morphologiques et de répartition biogéographique. Elle indique imparfaitement les relations phylogénétiques existant entre les espèces. De plus, elle est encore très imprécise, puisque bon nombre des noms définis pour le classement (sous-

genre, séries, etc.) ne sont pas reconnus par la nomenclature officielle. Les cinq vecteurs majeurs appartiennent tous au sous-genre *Cellia*, et sont répartis en différentes séries dont les relations phylogénétiques restent encore obscures, souvent basées sur un seul critère, moléculaire ou morphologique.

Ces vecteurs majeurs sont caractérisés par une forte anthropophilie, qui leur assure un contact répété et très fréquent avec le parasite *P. falciparum*, et une espérance de vie élevée. Comprendre l'origine de cette association entre le parasite et ses hôtes vecteurs est primordial pour mieux comprendre le fonctionnement des foyers palustres africains actuels. Très souvent, plusieurs de ces espèces vectrices sont sympatriques et assurent la transmission des différentes espèces plasmodiales simultanément ou en relais. Déterminer la paraphylie ou la monophylie de ces espèces, et l'origine de leur association étroite avec le parasite *P. falciparum* - plusieurs événements indépendants pour chaque espèce, ou bien propriété d'un ancêtre commun ? - permettrait de mieux comprendre les associations actuelles entre le parasite et ses vecteurs, et notamment les déterminants de la forte spécificité existant entre *P. falciparum* et ses vecteurs africains (Billingsley & Sinden 1997). Une seule étude intègre les deux espèces *An. nili* et *An. moucheti* dans une analyse des relations phylogénétiques entre ces quatre vecteurs majeurs africains. L'analyse du polymorphisme de séquences mitochondriales et nucléaires (Marshall et al. 2005) concluent à une relation paraphylétique entre les quatre espèces (*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* ensembles), et à l'acquisition indépendante pour *An. funestus*, *An. moucheti*, *An. nili*, et pour le complexe *An. gambiae/arabiensis* de l'association avec le parasite *P. falciparum*. Ces conclusions en faveur d'une coévolution indépendante du parasite dans chacun de ses hôtes vecteurs majeurs, permettent de s'interroger sur d'éventuels processus de spécialisation et d'adaptation réciproques mis en place par le parasite et ses différents vecteurs.

2.3 Cycle de vie des anophèles

Les trois premiers stades de développement de l'anophèle - œuf, larve, nymphe - sont aquatiques. La durée du développement larvaire est très variable suivant les espèces. Les larves d'*An. gambiae* se développent rapidement en 10 jours dans des mares ensoleillées à découvert, donc accessibles aux prédateurs, alors que les gîtes de *An. funestus* se développent en 20 à 30 jours dans des gîtes ombragés avec végétation, cachés aux prédateurs (voir l'illustration 2). De façon générale, les gîtes larvaires sont situés dans des eaux calmes (anses) et non polluées. Sept à 30 jours en moyenne (selon la température) s'écoulent entre l'œuf et l'émergence de l'insecte adulte. La production d'œufs par la femelle anophèle est issue d'un accouplement unique, à l'issue duquel le sperme du mâle est stocké dans ses spermathèques.

Pour chaque production d'œufs (100 ou plus), la femelle doit prendre un repas de sang: elle peut se nourrir, comme le fait le mâle, de nectar ou du jus des fruits, mais le sang est indispensable pour la production des œufs. La ponte a lieu 2 à 3 jours après le repas. Les anophèles femelles prennent en général deux repas de sang avant leur première ponte. L'ensemble des processus débutant par la recherche de l'hôte, puis la prise du repas de sang, sa digestion concomitante au développement des ovocytes, et se terminant par la ponte constitue le *cycle gonotrophique*. Pour les espèces tropicales, sa durée est de 4 à 5 jours pour le premier cycle et de 2 à 3 jours pour les cycles suivants.

A température élevée, le potentiel reproductif de la femelle anophèle est donc considérable. Elle doit cependant avoir survécu à 4 ou 5 cycles de production d'œufs avant de pouvoir devenir infectante, à l'issue du cycle sporogonique du *Plasmodium* chez les moustiques. Ce cycle qui dépend de la température est d'environ 13 jours à 25°C pour *P. falciparum*. Il est possible de déterminer le taux quotidien de survie d'une population d'anophèle, à partir du taux de parturité des femelles et de la durée du cycle sporogonique. Ce paramètre est crucial pour estimer la potentialité vectrice d'une population d'anophèle. La longévité des anophèles varie suivant les espèces et le climat. En Afrique, pour *An. gambiae*, elle est de 3 à 4 semaines.

3 Fonctionnement de l'interaction entre le parasite et ses deux hôtes

L'homme, le moustique anophèle et le parasite *Plasmodium* responsable du paludisme humain sont les trois éléments d'une interaction réciproque durable, dont le bon déroulement nécessite des conditions environnementales, climatiques et écologiques, particulières aux diverses espèces de parasites et d'anophèles. Le cycle des *Plasmodium* est hétéroxène à deux hôtes (Figure 4) : il comporte obligatoirement un passage alterné par un vertébré (hôte intermédiaire) et un moustique anophèle (hôte définitif, puisque la reproduction sexuée du parasite y a lieu).

3.1 Cycle de vie chez l'homme

3.1.1 Déroulement du cycle

- **Inoculation des stades infectieux :**

Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre de l'anophèle femelle lors de la prise de son repas sanguin. Les stades infectieux sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires

sont alors injectés avec la salive dans la circulation sanguine. Environ 10 à 50 sporozoïtes sont injectés au cours du repas sanguin (Beier 1998 ; Rosenberg & Rungsiwongse 1991 ; Sinden 2002). Les sporozoïtes, formes très mobiles, disparaissent rapidement de la circulation sanguine (1/2 heure) et sont retrouvés dans le foie. Chaque sporozoïte pénètre dans un hépatocyte où il devient une forme incapable de se déplacer. Le parasite est à ce moment obligatoirement endocellulaire chez l'hôte intermédiaire.

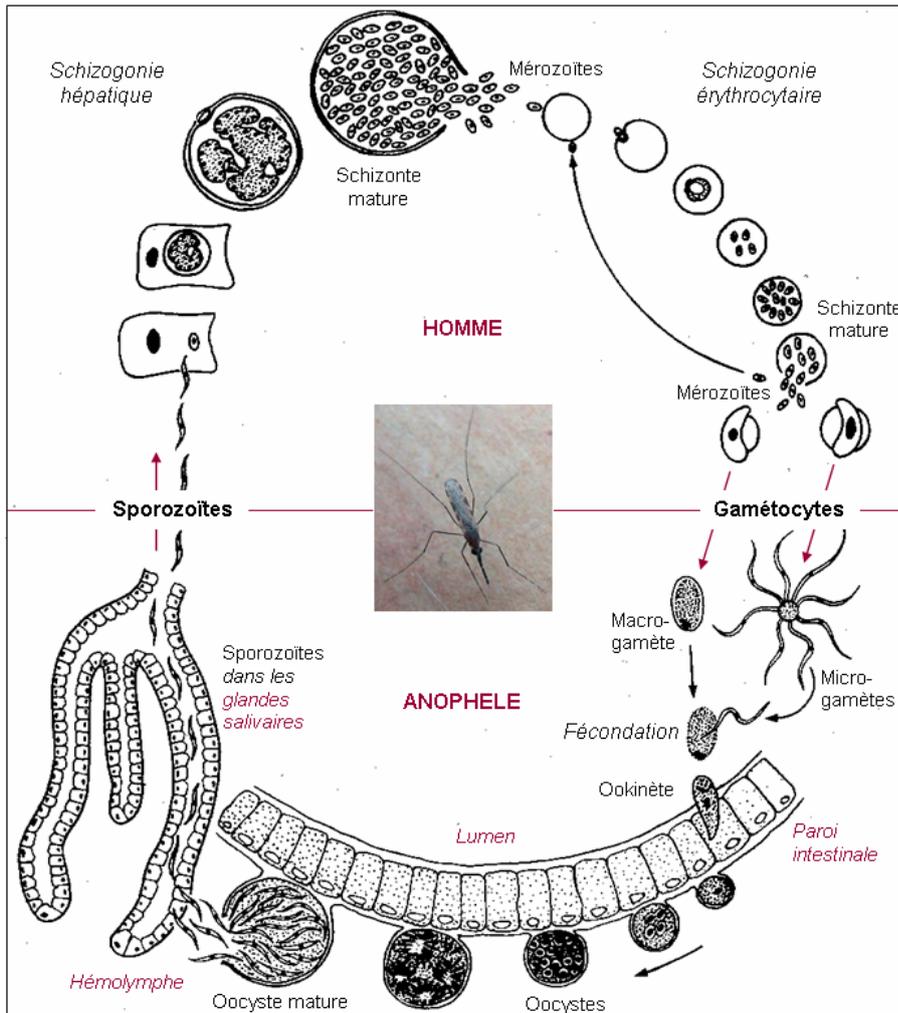


Figure 4. Illustration des grandes étapes du cycle de vie des *Plasmodium* spp. dans les deux hôtes homme et moustique anophèle.

▪ **Schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire :**

C'est le cycle de reproduction asexuée qui a lieu dans les hépatocytes parasités. Le sporozoïte s'est transformé en un trophozoïte endocytosomique qui grossit et dont le noyau se divise de nombreuses fois. Après une durée moyenne de 6 à 15 jours le cytoplasme de l'hépatocyte est envahi par une masse contenant plusieurs milliers de mérozoïtes, le schizonte. A maturité, il éclate libérant les mérozoïtes dans la circulation sanguine, où chacun va pénétrer dans une hématie. Chaque schizonte libère de 10000 à 30000 mérozoïtes chez *P.*

falciparum, et entre 2000 et 15000 pour les trois autres *Plasmodium* humains. La schizogonie se déclenche immédiatement dans tous les hépatocytes parasités pour les espèces *P. malariae* et *P. falciparum* alors qu'elle peut être retardée dans certains hépatocytes qui restent en attente (hypnozoïtes) entre un et 18 mois pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale* (*P. malariae* infecte les érythrocytes de façon latente).

▪ **Schizogonie érythrocytaire ou intra-érythrocytaire :**

Les signes cliniques ne sont observés qu'à partir du moment où le cycle intra-érythrocytaire est en place. L'attachement et la pénétration de l'érythrocyte par le mérozoïte mettent en jeu des mécanismes d'interactions fines hôte-parasite de type récepteurs-ligands présents à la surface des cellules hôte et parasite. Dans chaque hématie envahie par un mérozoïte se déroule le cycle de reproduction asexuée passant par les formes suivantes : trophozoïte jeune (forme en anneau), trophozoïte âgé, schizonte jeune (nombre variable de noyaux), schizonte mûr à nombre de noyaux défini. A l'issue de chaque cycle, les hématies parasitées éclatent de façon généralement synchrone (fièvre) et les mérozoïtes libérés envahissent des hématies saines. La durée du cycle de reproduction asexuée et le nombre de mérozoïtes obtenus sont caractéristiques de chaque espèce : 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae*. Plusieurs cycles se succèdent ainsi.

▪ **Différenciation des stades sexués transmissibles :**

Certains mérozoïtes se différencient après environ une semaine en une forme sexuée transmissible et infectante pour le moustique, le gamétocyte, entamant ainsi le cycle sexué du parasite. Les mérozoïtes d'un même schizonte deviennent tous des gamétocytes soit mâles, soit femelles, les proportions d'allocation pour chaque sexe étant soumises à sélection et adaptatives. Ces cellules restent en attente dans leurs hématies circulantes et ne se divisent plus. Elles ont la capacité de persister ainsi plusieurs mois dans la circulation périphérique du malade après sa guérison tout en restant infectantes pour le vecteur (Nassir et al. 2005).

3.1.2 Le paludisme grave

Le paludisme à *P. falciparum* est particulièrement dangereux. Outre les fièvres et l'anémie dues à l'infection des hématies, il engendre d'autres symptômes caractéristiques des accès graves : l'anémie sévère est due aux fortes parasitémies provoquées par l'infection de tous les types de globules rouges par *P. falciparum*, alors que les autres espèces se contentent des érythrocytes les plus âgés (*P. malariae*), ou plus jeunes (les réticulocytes pour *P. vivax*).

De plus, l'évolution de l'infection en paludisme cérébral est due à la capacité particulière des hématies infectées par ce parasite de s'agglutiner entre elles (auto-agglutination), aux autres hématies saines (formation de rosettes), ou de se lier aux parois endothéliales des capillaires sanguins (cytoadhérence). *P. falciparum* produit à la surface des hématies infectées un récepteur, *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP-1) qui se lie aux récepteurs de surface des cellules sanguines et endothéliales de l'hôte (Vogt et al. 2006).

3.2 Cycle de vie chez le vecteur

3.2.1 Cycle sporogonique

Le cycle sporogonique chez le vecteur (Figures 4 et 5) débute par l'ingestion de gamétocytes mâles et femelles matures circulants dans le sang périphérique de l'hôte lors du repas de sang pris sur l'hôte par la femelle anophèle. Un haplotype clonal particulier présent chez l'hôte humain peut donner des gamétocytes mâle et femelle. Les gamétocytes mâles et femelles ingérés s'échappent rapidement de l'enveloppe érythrocytaire et se différencient respectivement en microgamètes et macrogamètes. Dans les 15 minutes suivant l'ingestion, le gamétocyte mâle subit trois cycles de mitoses, formant 4 à 8 gamètes rendus très mobiles par exflagellation.

La fécondation entre gamètes mâles et femelles a lieu moins d'une heure après l'ingestion. Le zygote diploïde issu de la fécondation subit la méiose, au sein de l'enveloppe nucléaire qui ne se divise pas. Les quatre produits haploïdes des deux divisions méiotiques sont donc contenus au sein du noyau. Le zygote se différencie en ookinète mobile, migre du bol alimentaire en cours de digestion et franchit la matrice péritrophique, 19 à 36 heures après l'ingestion du repas sanguin par la femelle anophèle. L'ookinète se glisse ensuite à travers ou entre les cellules épithéliales de la membrane de l'estomac de l'anophèle, processus d'invasion qui déclenche les réponses immunitaires du moustique (Dimopoulos et al. 2002). Le contact avec la membrane basale inhibe l'activité mobile et le cycle cellulaire reprend au sein du zygote.

L'ookinète se différencie alors en oocyste sphérique, dont le noyau polyploïde se divise, et subit des mitoses successives, aboutissant à la formation de sporoblastes contenant plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes (2000-8000). Pendant sa maturation, qui dure de 4 à 21 jours suivant la température pour *P. falciparum*, la taille de l'oocyste passe d'environ 8 µm à environ 60-80 µm. Ce stade contenant les produits haploïdes de la méiose, très visible sur la membrane de l'estomac, peut être disséqué et isolé individuellement (Ranford-Cartwright et al. 1991) et offre une opportunité unique pour l'étude des proportions en

hétérozygotes au sein d'un cycle majoritairement haploïde. A maturité, les sporozoïtes perforent activement la capsule de l'oocyste et la lame basale et sont libérés dans l'hémolymph (Wang et al. 2005). Ils migrent ensuite majoritairement vers les glandes salivaires, d'où ils seront injectés vers l'hôte vertébré avec la salive lors de la piqûre. Les sporozoïtes restent infectants dans les glandes salivaires pendant toute la durée de vie du moustique.

3.2.2 Facteurs influençant la durée du cycle sporogonique

La durée du cycle sporogonique est un facteur clé dans la transmission des *Plasmodium* par les vecteurs, qui intervient dans le calcul de la capacité vectorielle (Encadré 1). En effet, selon la température et l'espèce plasmodiale considérée, le temps de développement du parasite jusqu'à production de sporozoïtes infectants dans les glandes salivaires sera plus ou moins long ; si ce temps excède la durée de vie du moustique, celui-ci ne sera pas vecteur. La durée du cycle s'allonge lorsque la température diminue, et à température égale, elle est plus courte chez *P. vivax* que chez *P. falciparum*. *P. malariae* et *P. ovale* ont les cycles les plus longs, entre 18 et 25 jours à 25°C. A 18°C, *P. falciparum* cesse pratiquement d'être transmis. La température optimale permettant à *P. falciparum* le développement le plus rapide est de 30°C. Ces contraintes de développement conditionnent la distribution des différentes espèces plasmodiales dans le monde, *P. vivax* supportant l'amplitude maximale de température de développement étant le plus largement réparti.

La durée de vie du moustique est donc cruciale pour la transmission du parasite à l'homme : si l'espérance de vie du moustique est faible, le parasite qu'il héberge n'aura pas le temps d'effectuer son développement. A 30°C, sur une population de femelles anophèles infectées, 70% doivent survivre chaque jour pour qu'au moins 1% soient encore en vie au bout des 10 jours nécessaires à l'accomplissement du cycle du parasite chez le moustique.

Objectifs et conduite de la thèse

Le but général de ce travail de thèse a été de comprendre, grâce aux marqueurs génétiques neutres et aux outils de la génétique des populations, les relations entre les populations naturelles de *Plasmodium falciparum* et ses populations hôtes humaines et vectorielles, en zones de forte transmission en Afrique, tant à l'échelle locale (échelle d'un site de transmission) que régionale et continentale (plusieurs sites de transmission).

L'étude de la variabilité génétique neutre des populations naturelles de ce parasite a été entreprise au niveau des infrapopulations de parasite présentes chez les individus hôtes humains et chez les individus hôtes moustiques appartenant à l'ensemble des espèces vectrices présentes localement au sein d'un site de transmission. La distribution de cette variabilité a été analysée à l'échelle du site de transmission au sein et entre les individus hôtes humains et vecteurs, au sein et entre les sous-populations des différentes espèces vectrices, et entre les sites de transmission à l'échelle régionale et continentale.

▪ **Plusieurs questions ont orienté la mise en œuvre de la recherche :**

- Le régime de reproduction et la structuration génétique de *P. falciparum* en zone endémique africaine :

Plasmodium falciparum est un parasite hermaphrodite capable d'alterner des cycles de reproduction asexuée et sexuée dans le vecteur, au sein duquel la question de la stratégie de reproduction privilégiée reste controversée : dans les contextes où la diversité parasitaire est suffisamment élevée au sein des infrapopulations de gamétocytes recrutées par les vecteurs pour permettre un croisement entre génotypes distincts (zones endémiques africaines), le taux d'autofécondation privilégié dans les populations naturelles de *P. falciparum* reste peu exploré.

L'autofécondation entraîne un déficit en hétérozygote dans la population. Tout l'objet de notre étude sur les oocystes de *P. falciparum* a été de se donner les moyens matériels, grâce à un échantillonnage adéquat à tous les niveaux de structure des populations naturelles de *P. falciparum*, et à l'utilisation de marqueurs multilocus sélectivement neutres, d'estimer ce taux d'autofécondation dans les populations naturelles de ce parasite en zones de forte transmission en Afrique. Grâce à l'étude des stades sexués du parasite, nous avons eu accès à deux paramètres clés qui permettent de mesurer la proportion d'autofécondation dans le régime de reproduction : l'existence d'un déficit en hétérozygote à tous les locus étudiés, et la présence d'un déséquilibre de liaison.

L'échantillonnage individuel des stades oocystes présents chez le vecteur permet également l'analyse de la distribution de la variabilité génétique neutre du parasite aux

échelles locales et régionales, en prenant en compte l'effet de l'individu, moustique et homme, sur la structuration de la diversité génétique à ces échelles supérieures. La grande majorité des études de la structuration spatiale des populations naturelles de *P. falciparum* ont été menées sur les haplotypes sanguins et ont montré que l'essentiel de la diversité était distribuée au sein des sites en Afrique, e.g. dans les zones de forte transmission, avec une structuration spatiale régionale beaucoup plus faible. D'autres études menées à l'échelle locale dans d'autres contextes ont mis en évidence un impact significatif du site sur la structuration (foyers de transmission urbains versus ruraux). Mais aucune étude n'a pris en compte l'impact de l'individu hôte sur la distribution de la diversité génétique aux échelles supérieures.

- Les modalités de la distribution de *P. falciparum* dans les espèces anophèles vectrices au sein des sites de transmission :

Les différents génotypes et espèces de parasites *Plasmodium* en Afrique sont transmis par plusieurs espèces anophèles vectrices très souvent présentes en sympatrie, simultanément ou en relais au cours de l'année, au sein de la majorité des foyers de transmission. Or les différentes espèces des complexes d'anophèles qui transmettent les *Plasmodium* varient beaucoup dans leur capacité vectorielle.

Nous nous interrogeons sur les déterminants biologiques, du comportement, et génétiques, qui constituent un « bon vecteur », et essayons de mettre en lumière des différences pour ces facteurs entre les quatre espèces anophèles vectrices majeures en Afrique considérées dans notre étude, nommément, *Anopheles gambiae* s.s, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. De telles différences entre les espèces vectrices sont en effet susceptibles de laisser envisager la pertinence de la dimension « espèce anophèle vecteur » dans la structuration des populations naturelles de *P. falciparum* en Afrique, et sont primordiales pour l'implantation d'un contrôle vectoriel efficace sur ce continent, notamment par l'utilisation de vecteurs modifiés génétiquement. Quel est exactement l'impact de l'espèce hôte vecteur sur la distribution et la transmission des parasites *Plasmodium* et des génotypes de *P. falciparum* à l'échelle locale en Afrique ?

En plus des variations interspécifiques des différents paramètres écologiques et de comportement, affectant la capacité vectorielle et le recrutement parasitaire des différentes espèces d'anophèles, les éventuelles différences dans leur capacité intrinsèque à permettre le développement complet du parasite font de la dimension « espèce hôte vectrice » un facteur essentiel à prendre en compte dans l'étude de la structure de *P. falciparum* dans les foyers de transmission africains.

En effet, la résistance spécifique de certaines souches et espèces de moustiques à certaines souches ou espèces de parasites, qu'elle soit active ou passive, est un des mécanismes d'isolement écologique qui contribuent à définir les limites des niches écologiques des parasites. En ce sens, la définition précise des taxons vecteurs et non-vecteurs, et la compréhension des modalités qui gouvernent cette capacité, est primordiale pour la mise en place de politiques de lutte anti-vectorielle efficace.

▪ **Conduite du travail de thèse :**

Pour répondre à ces différentes problématiques, nous avons réalisé plusieurs échantillonnages ponctuels des populations naturelles du parasite *P. falciparum* chez l'homme et chez les vecteurs dans deux sites de transmission intense au Cameroun (trois semaines de collecte par échantillonnage au maximum). Le Cameroun par sa situation géographique cumule sur son territoire une grande variété de paysages éco-climatiques, qui conditionnent la variabilité des vecteurs présents et ainsi la diversité des contextes de la transmission palustre. Nous avons échantillonné le parasite *P. falciparum* chez ses deux hôtes humain et vecteur dans deux villages au Cameroun, l'un au Sud en zone de forêt équatoriale dégradée proche d'une zone urbaine, Simbock, l'autre au Nord, en zone rurale de transition forêt-savane, Tibati. Le paludisme est endémique dans ces deux sites et la transmission y est intense et pérenne.

A chaque niveau de la hiérarchisation des populations de parasite tel que nous l'avons défini correspond une problématique spécifique de notre travail :

- (i) Au niveau de l'individu homme ou moustique anophèle :
 - Infrapopulations humaines : analyse des proportions d'infections multiples et de la multiplicité des infections chez l'homme
 - Infrapopulations vectorielles : analyse de la distribution du parasite chez ses hôtes moustiques, analyse du polymorphisme et de la distribution de la variabilité génétique entre hôtes, pour en inférer le régime de reproduction du parasite et la structure des infrapopulations de parasites entre hôtes moustiques
 - Comparaison des infrapopulations humaines et vectorielles
- (ii) Echelle locale i.e. au sein du site :
 - Sous-populations du parasite chez l'homme : analyse des prévalences, du polymorphisme allélique et de la diversité génétique de la population parasitaire humaine au sein du site. Détermination de la structure des populations de *P. falciparum* chez l'homme au sein des sites.

- Sous-populations du parasite chez le vecteur : analyse des prévalences et de l'abondance parasitaire, et de la distribution de la variabilité neutre entre les espèces vectrices : quel est l'impact de l'espèce vectrice sur la population de parasite au sein d'un site ? Toutes les espèces vectrices au sein des sites transmettent-elles les mêmes populations parasitaires, et comment ?
- Comparaison de la diversité génétique et de la structure des populations de *P. falciparum* chez l'homme et chez le vecteur
- (iii) Echelles régionale et continentale, i.e. entre sites : analyse de l'impact du site sur la variabilité des populations de parasite chez l'homme et chez le vecteur.

▪ **Plan de la thèse :**

Nous présentons dans une Première partie de l'Introduction les acteurs et les caractéristiques de la transmission et de l'infection à *P. falciparum* en Afrique : les modalités de l'infection à *P. falciparum* chez ses deux hôtes homme et vecteur dans les contextes de la transmission palustre africaine sont analysés pour mettre en évidence les facteurs majeurs susceptibles d'influencer la distribution du parasite dans ses deux hôtes et la structuration génétique locale et régionale de *P. falciparum*.

Nous présentons dans la Deuxième partie de l'Introduction les outils théoriques de l'analyse de la structure génétique des populations parasitaires, et un état des lieux des études menées sur la diversité génétique de *P. falciparum* et les modalités de sa distribution dans les populations naturelles du parasite en Afrique.

Les Articles publiés ou en préparation complétés de Résultats complémentaires présentent les résultats principaux obtenus au cours de cette thèse. Les résultats obtenus sur les oocystes chez le vecteur font progresser un débat ancien sur la nature clonale ou panmictique des populations de *P. falciparum*, et présentent des résultats originaux sur l'impact de l'hôte vecteur sur la structure génétique du parasite à l'échelle locale. D'autre part, l'analyse des stades sanguins chez l'homme permet de faire le lien avec les approches massivement utilisées jusqu'à présent, i.e. sur les isolats sanguins.

Les conclusions nous permettent de suggérer une vision globale de la structure des populations naturelles du parasite *P. falciparum* chez ses deux hôtes homme et vecteur en zones de forte transmission en Afrique. Elles nous permettent également de souligner la très grande variabilité des contextes de la transmission, y compris au sein d'un site, pour lequel de grandes variations d'intensités de transmission peuvent exister entre saisons, et de mesurer l'effet de ces variations sur la structure des populations du parasite.

Introduction bibliographique

PARTIE 1 : INFECTION A PLASMODIUM FALCIPARUM ET TRANSMISSION DU PARASITE EN AFRIQUE

Le paludisme est endémique dans toute l'Afrique au sud du Sahara. L'épidémiologie du paludisme en Afrique pourrait apparaître simple dans la mesure où les quatre espèces de parasites du genre *Plasmodium* infectant l'homme lui sont spécifiques, et sont transmises uniquement par des culicidés du seul genre *Anopheles*. Cependant, les très grandes diversités génétiques observées chez le vecteur et chez le parasite, associées au sein de contextes éco-climatiques africains très diversifiés, engendrent une grande variabilité des contextes épidémiologiques sur ce continent (Mouchet et al. 2004 ; Rodhain & Perez 1985). Ainsi, la transmission palustre en Afrique est caractérisée par son extrême variabilité, qui est le reflet de celle des paysages éco-climatiques du continent, eux-mêmes déterminant la présence et la dynamique des différentes espèces anophèles vectrices.

Le taux d'inoculation entomologique, mesure de la transmission palustre, varie donc considérablement d'une région à une autre, d'un pays à l'autre, et d'un village à son voisin, parfois distants d'un ou deux kilomètres seulement. Le nombre de piqûres infectantes peut varier de 1000 par personne et par an à moins de une par an, *P. falciparum* représentant plus de 90% des infections (Greenwood & Mutabwina 2002). Selon les sites, la transmission dure toute l'année, ou se réduit à 2 ou 3 mois dans l'année. Les vecteurs responsables de la transmission du parasite varient beaucoup d'un site à l'autre, plusieurs vecteurs assurant la transmission en sympatrie dans la grande majorité des contextes épidémiologiques, soit en même temps, soit en relais au cours de l'année en fonction des saisons (Fontenille & Simard 2004).

L'extrême diversité des situations épidémiologiques rencontrées va fortement influencer les interactions entre le parasite et ses hôtes. (Anderson et al. 2000b) ont ainsi récemment montré que la structure des populations de *P. falciparum* variait avec l'intensité de la transmission. C'est donc un élément clé à prendre en compte dans toute étude des interactions entre le parasite et ses deux hôtes en le caractérisant aussi précisément que possible. L'objet de cette Première partie introductive est donc de présenter les caractéristiques de la transmission palustre et de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme et chez les vecteurs en zone endémique africaine, afin de mettre en exergue les éléments clés de l'épidémiologie et de la transmission à prendre en compte pour mieux comprendre la structure du parasite chez ses deux hôtes, objet de la Deuxième partie introductive.

1 Les vecteurs anophèles dans les contextes africains de la transmission

1.1 Les espèces anophèles vecteurs majeurs en Afrique

Le vecteur, hôte définitif, est le pivot de l'épidémiologie du paludisme. Pour entretenir le paludisme dans une région il faut : (i) des vecteurs anophèles compétents, anthropophiles, à grande longévité, pour l'accomplissement complet du cycle sporogonique du parasite ; (ii) des gîtes larvaires productifs de ces espèces vectrices en grand nombre (densité critique) ; (iii) des sujets humains porteurs de gamétocytes infectants. En Afrique, cinq espèces d'anophèles sont considérées comme des vecteurs d'importance majeure dans la transmission des *Plasmodium* humains : *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. Ils appartiennent tous à des complexes ou groupes d'espèces.

Nous présentons ci-dessous les principales avancées réalisées dans la systématique de quatre de ces cinq principales espèces vectrices de la région afrotropicale, *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*, illustrant leur grande diversité et capacité d'adaptation. Nous présentons ensuite les facteurs déterminants qui font de ces espèces les vecteurs majeurs de la transmission palustre africaine. Ces quatre espèces étaient toutes présentes en sympatrie dans l'un des deux sites camerounais étudiés, Simbock, situé en périphérie urbaine dans la région forestière équatoriale du Sud-Cameroun. Pour chacune d'entre elles, nous avons échantillonné et analysé les parasites *P. falciparum*. Nous décrivons enfin brièvement les divers contextes africains de la transmission palustre, en adoptant la notion de faciès épidémiologique forgée pour caractériser un ensemble de lieux où le paludisme présente les mêmes caractéristiques de transmission, de développement de l'immunité, et de manifestations pathologiques (Mouchet et al. 2004).

1.1.1 Le complexe *Anopheles gambiae*

Anopheles gambiae s.l. est un complexe de sept espèces identifiées à ce jour, différant totalement dans leur potentiel vecteur, leur comportement, et leur adaptation à l'environnement. Cinq espèces du complexe, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* A, *An. quadriannulatus* B n'ont qu'un rôle limité dans la transmission des *Plasmodium*, à cause d'une distribution géographique restreinte et/ou de préférences trophiques zoophiles. Les deux espèces restantes *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont les deux vecteurs les plus efficaces au monde, largement répandus sur le continent africain, coexistant sur de vastes zones, le premier étant plus adapté aux zones humides, et le second aux

environnements secs. D'abord différenciées grâce à des techniques de cytogénétiques (Coluzzi et al. 1979), elles sont à présent identifiables par PCR multiplexe (Scott et al. 1993).

La variabilité génétique au sein de l'espèce *An. gambiae* est considérable et continue de faire l'objet de nombreuses études, préalable essentiel à l'application sur le terrain des méthodes de contrôle des populations vectrices, par transformation génétique ou autres. Sur des critères cytogénétiques et écologiques, *An. gambiae* a été scindé en cinq formes chromosomiques en Afrique de l'Ouest : « Savana », « Bamako », « Mopti », « Bissau », « Forest » (Coluzzi et al. 1985). Ces formes sont identifiables par PCR (Favia et al. 2001), et correspondent à des inversions chromosomiques formant des cytotypes adaptés à un environnement particulier. Les formes « Bissau » et surtout « Forest » sont associées aux régions forestières et savanes humides, la forme « Mopti » est particulièrement adaptée aux savanes sèches et arides, capable de persister tout au long de la saison sèche dans les champs irrigués. Ces inversions ont été impliquées dans le processus de spéciation (Noor et al. 2001), mais chez *An. gambiae*, les différences écologiques et chromosomiques ayant suggéré un isolement reproductif entre ces formes peuvent également être expliquées par une sélection différentielle s'exerçant sur les inversions, conférant à une même espèce *An. gambiae* polymorphe mais panmictique une capacité d'adaptation pour l'exploitation de niches écologiques alternatives (della Torre et al. 2002).

Récemment, *An. gambiae* a été subdivisée en deux formes moléculaires distinctes, M et S, basées sur une variation nucléotidique au niveau de la séquence IGS de l'ADN ribosomal (della Torre et al. 2001). Ces deux formes sont distribuées sur tout le continent africain à l'exception de l'Afrique de l'Est et Madagascar où seule la forme S est présente, et ne se recoupent pas avec les formes cytogénétiques. Les hybrides M/S, viables en laboratoire, sont cependant très rarement observés dans la nature, ce qui suggère un isolement reproductif entre ces deux formes, et a conduit à une nouvelle hypothèse de spéciation en cours au sein de l'espèce *An. gambiae*, phénomène qui serait associé aux changements environnementaux telles que la déforestation et les cultures irriguées (della Torre et al. 2002). Une étude menée au Sud-Cameroun au sein d'une population d'*An. gambiae* de la forme chromosomique « Forêt », où les deux formes moléculaires M et S étaient présentes en sympatrie, a montré une différenciation génétique significative entre ces deux formes (Wondji et al. 2002). Les particularités écologiques, biologiques et leurs conséquences sur les capacités vectorielles de ces deux formes M et S sont en cours d'étude pour inférer ou non cette suspicion.

1.1.2 Le groupe *Anopheles funestus*

Anopheles funestus est un groupe de plusieurs espèces morphologiquement très semblables : *An. funestus*, *A. confusus*, *A. lesoni*, *A. rivulorum* et *A. brucei* sont difficilement identifiables au stade larvaire, alors que les espèces du sous-groupe *funestus*, *An. funestus*, *An. parensis*, *An. aruni* et *An. vaneedeni* le sont au stade adulte (Gillies & Coetzee 1987). À l'exception d'*An. funestus*, toutes les espèces du groupe sont principalement zoophiles et sans rôle vecteur, différenciables aisément par PCR (Cohuet et al. 2003 ; Koekemoer et al. 2002). *An. funestus* est répandue dans toute l'Afrique intertropicale, et présente une grande variabilité biologique et génétique.

De même que chez *An. gambiae*, au moins 11 inversions chromosomiques ont été identifiées, également corrélées à des différences de comportement et écologie, et de capacité vectorielle (Lochouart et al. 1998). Sur la base de la présence et d'associations particulières de certaines inversions, deux formes chromosomiques distinctes ont été identifiées au Burkina-Faso chez *An. funestus*, « Kiribina » et « Folonzo », et l'hypothèse d'une spéciation en cours avancée (Costantini et al. 1999). Mais la mise en évidence de flux géniques possibles entre ces deux formes dans d'autres contextes écoclimatiques (Cohuet et al. 2005), ont initié d'autres études visant à préciser l'intensité des flux de gènes entre ces deux formes dans différents contextes écoclimatiques (Michel et al. 2005), ainsi que le rôle des pressions sélectives environnementales dans les processus d'adaptation des populations de ce vecteur. Les résultats suggèrent l'existence d'une pression sélective environnementale exercée sur les inversions elles-mêmes (ou les gènes qu'elles contiennent), plutôt qu'une éventuelle spéciation en cours. Si on observe bien un flux de gènes entre les différentes formes chromosomiques d'*An. funestus*, les karyotypes hybrides obtenus ne sont viables que sous certaines conditions environnementales (Fontenille & Simard 2004).

Les études de génétique des populations des deux vecteurs africains les plus importants ont ainsi permis de mettre en évidence la grande variabilité et l'extrême plasticité de leurs génomes. Cette exceptionnelle capacité d'adaptation leur permet de coloniser la grande variété des faciès écoclimatiques africains, et de faire face ainsi aux changements environnementaux, notamment induits par l'action de l'homme (déforestation et agriculture).

1.1.3 Le groupe *Anopheles nili*

Le groupe *Anopheles nili* est composé de quatre espèces distinctes, *An. nili*, *An. carnevalei*, *An. ovengensis* et *An. somalicus* (Brunhes et al. 1999). Les trois premières espèces sont des vecteurs efficaces du parasite *Plasmodium*, largement distribuées dans la zone

intertropicale humide et en Afrique équatoriale, la dernière étant une espèce exophile et zoophile non vectrice encore peu connue. Une PCR a été développée d'après des variations de séquences nucléotidiques de l'ADN ribosomal, permettant l'identification rapide et spécifique des membres du groupe (Kengne et al. 2003). Des différenciations significatives mesurées entre les espèces *An. nili*, *An. carnevalei* et *An. ovengensis* à l'aide de marqueurs isoenzymes confirme leur statut taxonomique de « bonnes espèces » au sein du groupe *An. nili* (Awono-Ambene et al. 2006).

1.1.4 Le groupe *Anopheles moucheti*

Les moustiques du groupe *Anopheles moucheti* sont forestiers. De par sa distribution plus localisée à l'échelle du continent africain, l'espèce est restée peu étudiée depuis les années 1960. Des observations morphologiques et comportementales sur les populations naturelles suggèrent que le groupe *An. moucheti* est composé de trois taxons, *An. moucheti moucheti* sensu stricto, *An. moucheti nigériensis* et *An. moucheti bervoetsi* en République Démocratique du Congo. Des données plus récentes (isoenzymes et croisements) ont montré que ces différentes formes ne devaient être considérées que comme des variants morphologiques d'une même espèce, au moins au Cameroun (Antonio-Nkondjio et al. 2002). D'autres résultats, basés sur l'analyse de marqueurs microsatellites (Annan et al. 2003), voir l'Annexe 3), vont dans le sens d'une absence de flux de gènes entre les spécimens camerounais et congolais, suggérant l'existence de deux espèces distinctes au sein du groupe *An. moucheti* (Antonio-Nkondjio et al. 2007).

1.2 Mesures de la transmission

1.2.1 Mesures parasitologiques

L'endémicité et l'infection palustre dans un contexte donné peuvent être estimées directement (méthodes parasitologiques, indicateurs parasitaires) ou indirectement (méthodes basées sur l'immunologie, indicateurs sérologiques : recherche d'anticorps).

Les indicateurs parasitaires les plus communément mesurés sont (i) la prévalence parasitaire, c'est à dire la proportion de sujets porteurs de *Plasmodium* dans un contexte donné pour une population précise (classe d'âge particulière, etc.) ; (ii) la densité parasitaire (nombre de parasites par microlitre de sang) ; et (iii) l'indice gamétocytaire (proportion de porteurs de gamétocytes du parasite dans une population donnée) qui permet d'estimer le réservoir infectant d'une population à un moment donné pour la population d'anophèles vecteurs. Les indicateurs sérologiques visent à mesurer l'exposition antérieure des sujets au

parasite par la mise en évidence d'anticorps dirigés contre certains antigènes de surface du parasite. Elle peut être spécifique d'espèce. L'acquisition des anticorps anti-*Plasmodium* est liée à la fréquence des contacts entre l'homme et le parasite. Ces mesures sérologiques peuvent être utilisées comme indicateur des niveaux de transmission, surtout dans les zones non-endémiques ou de faible endémie, lorsque la parasitémie est faible, et le taux d'inoculation entomologique difficile à estimer, ou pour l'évaluation de l'impact des mesures de lutte (confirmation d'un arrêt de la transmission) (Mouchet 2004).

Au Cameroun et dans de nombreuses régions d'Afrique, la situation épidémiologique est celle d'une endémie, c'est à dire que l'incidence palustre y est à peu près constante durant plusieurs années successives. Les niveaux d'endémicité sont plus classiquement évalués par la mesure de la prévalence du parasite (*PR*), sur les enfants entre 2 et 9 ans, ou par la mesure de l'indice splénique, c'est à dire le pourcentage de rates palpables.

Les techniques de biologie moléculaire des parasites permettent de mesurer d'autres paramètres de l'infection palustre. Le génotypage multilocus des infections parasitaires chez l'homme et chez le vecteur permet la mesure du nombre de génotypes parasitaires clonaux distincts présents au sein des individus hôtes. Le génotypage des populations de parasite du sang périphérique chez l'homme a été largement entrepris ces dernières années dans le cadre d'études de l'épidémiologie moléculaire du parasite *P. falciparum*. La diversité et la dynamique de l'infection en fonction de divers paramètres des populations hôtes (âge, statut immunitaire), ainsi que l'interaction des génotypes ou haplotypes au sein des infrapopulations hôtes peuvent être analysées grâce à ces méthodes. Nous verrons plus loin comment la multiplicité clonale est corrélée au nombre de piqûres reçues et à l'intensité de la transmission, ainsi qu'au statut immunitaire de l'hôte (lui-même dépendant de cette intensité).

1.2.2 Mesure entomologique

Les critères de parasitologie ne prennent pas en compte la composante vectorielle et mal l'acquisition d'une immunité avec l'âge qui diminue la prévalence parasitaire (O'Meara et al. 2007). La mesure entomologique de la transmission, à travers le calcul de la fréquence des piqûres reçues, est donc utilisée préférentiellement. Le paramètre considéré comme le plus fiable car le mieux corrélé à l'intensité réelle de transmission du parasite par une population anophélienne est le taux d'inoculation entomologique (*h*) dans le contexte éco-épidémiologique donné, c'est à dire le nombre de piqûres d'anophèles infectés reçues par l'homme par unité de temps (en anglais, *EIR* pour *Entomological Inoculation Rate*). Seuls deux paramètres interviennent dans le calcul de *h*, la densité anophélienne et l'indice sporozoïtique, *h* étant le produit du nombre de piqûre reçues par homme et par unité de temps

(*ma*) par le pourcentage de moustiques porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires
(*s*):

$$h = ma \cdot s \quad (\text{Macdonald 1957})$$

Sur le terrain, la méthode la plus directe et la plus adaptée à la mesure de ce taux, bien que contraignante, est la méthode de capture nocturne sur appât humain, que nous avons utilisée avec l'accord du comité d'éthique au Cameroun pour échantillonner les anophèles dans nos deux sites. C'est la seule méthode permettant l'accès simple et directe à la fraction de la population anophélienne agressive pour l'homme, seule fraction qui intéresse la mesure de la transmission. La méthode est détaillée dans le Matériel & Méthodes, ainsi que ses biais possibles dans l'estimation de *h*. D'autres inconvénients liés à la mesure de l'intensité de la transmission par le calcul de *h* peuvent être soulignés (Filion et al. 2006) :

- (i) Dans la pratique, *h* est souvent moyenné sur un an, ce qui efface toute variation saisonnière de l'intensité de la transmission, pourtant essentielle à la compréhension du développement immun chez les hommes dans un site. Pour un même *h*, les réponses immunes vont en effet différer radicalement entre un individu qui reçoit par exemple 12 piqûres infectantes en un mois (zones de savane sèche) et celui qui reçoit 1 piqûre infectante par mois pendant 12 mois (zones de forêt).
- (ii) Le taux *h* prend en compte les piqûres des anophèles avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires, c'est à dire les « piqûres infectées », mais pas les piqûres réellement « infectantes », c'est à dire générant chez l'homme une infection. Une piqûre « infectée » ne serait « infectante » qu'une fois sur deux pour des personnes non-immunes (Rickman et al. 1990), ce ratio diminuant avec le taux d'endémicité.
- (iii) Le taux *h* est une moyenne, calculée à partir d'un échantillon de captureurs et de moustiques. Cependant, de grandes différences dans le taux de piqûres sont observées en fonction de l'attractivité individuelle, du comportement et de l'âge du captureur, du type d'habitat, de la proximité aux gîtes larvaires, etc. Ce choix non-aléatoire de l'hôte par les anophèles est responsable parfois de grandes disparités dans les effectifs récoltés par différents captureurs placés dans des situations analogues (Dye & Hasibeder 1986).
- (iv) La fréquence des repas interrompus n'est pas prise en compte par la méthode de capture, et peut contribuer à sous-estimer le taux effectif de piqûres réellement

reçues par un dormeur (sans compter d'éventuelles différences d'attractivité pour les anophèles entre un dormeur et un captureur éveillé) (Burkot et al. 1988).

- (v) Enfin, on peut souligner l'imprécision de la mesure de h quand la transmission est faible : dans ces conditions, le taux de sporozoïtes est faible dans les vecteurs, et la mesure de h imprécise avec de forts intervalles de confiance en fonction du nombre de moustiques disséqués.

1.3 Les déterminants de la capacité vectorielle des anophèles

Les parasites *Plasmodium* humains sont transmis par une soixantaine d'espèces parmi les 500 espèces du seul genre *Anopheles*. Mais tous les moustiques anophèles ne sont pas pour autant des vecteurs. La capacité à transmettre les *Plasmodium* est souvent dénommée de façon interchangeable « capacité vectorielle » ou « compétence vectorielle ». La capacité vectorielle est définie de façon quantitative (voir la définition de l'Encadré 1) et est influencée par un grand nombre de variables qui prennent en compte les facteurs environnementaux, comportementaux, cellulaires et biochimiques qui influencent l'association entre un vecteur, un pathogène transmis par ce vecteur, et l'hôte auquel ce pathogène est transmis.

La capacité vectorielle implique donc chez l'espèce anophèle la capacité de (i) recruter le parasite ; (ii) permettre son développement complet ; et (iii) transmettre le parasite à l'hôte vertébré. La capacité vectorielle comprend donc deux dimensions de facteurs qui définissent le pouvoir vecteur d'un moustique :

- (i) Les facteurs extrinsèques, environnementaux et liés à la biologie des vecteurs (e.g. distribution, longévité et abondance des populations), et à leur comportement (e.g. comportements trophiques et de repos) gouvernent les modalités du contact homme-vecteur, c'est-à-dire la fréquence des piqûres, et donc les modalités du recrutement des parasites par les moustiques et, dans l'autre sens, du recrutement des parasites par l'hôte humain c'est-à-dire la transmission du parasite par l'anophèle ;
- (ii) Les facteurs génétiques intrinsèques au moustique qui lui permettent d'assurer ou non le cycle sporogonique complet du parasite définissent la compétence vectorielle de ce moustique. Ce sont les caractéristiques de la résistance et de l'immunité de l'espèce vectrice vis-à-vis des parasites recrutés. Cette deuxième dimension du pouvoir vecteur d'un anophèle reflète donc plus directement les aspects de la spécificité des interactions dans le système anophèle-*Plasmodium* et le rôle des phénomènes éventuels d'adaptation locale et de coévolution

Encadré 1. La capacité vectorielle.

Tous les anophèles ne sont pas vecteurs. Plusieurs conditions, de biologie, écologie et comportement doivent être réunies pour qu'une femelle anophèle s'infecte sur un hôte humain et transmette le parasite à un autre hôte. Le concept de capacité vectorielle regroupe les différents facteurs définissant l'infectivité d'un anophèle et donc le risque de transmission palustre. La capacité vectorielle est **la composante entomologique du taux basique de reproduction du paludisme R_0** , c'est à dire le nombre moyen d'inoculations à partir d'un cas unique de paludisme par unité de temps, en général un jour.

Elle est exprimée comme suit :

$$C = (ma^2p^n) / (-\ln p) \quad \text{formule de Garrett-Jones (1964)}$$

Où :

m : nombre de vecteurs par homme = densité vectorielle relative ;

a : nombre de repas de sang pris sur l'homme par un vecteur en un jour = anthropophilie.

En un jour, un individu est piqué par ma vecteurs ;

p : probabilité de survie du vecteur en un jour ;

n : durée du cycle sporogonique du parasite dans le vecteur.

Une fraction p^n de vecteurs survit au cycle sporogonique.

Si une personne est piquée ma fois par jour, et qu'une proportion p^n de la population de vecteurs survit à la période d'incubation du parasite dans le moustique, et si cette proportion de vecteur survivants survit encore pendant $(1/-\ln p)$ jours, où elle peut piquer encore une autre personne a fois par jour, alors on peut estimer le taux de piqûres potentiellement infectieuses, c'est à dire mesurer la transmission (Gilles 1993 cité par Bruce-Chwatt 1980).

C est donc fonction du temps et représente **le nombre de piqûres que les moustiques ayant piqué un individu le jour t font à l'homme pendant le restant de leur vie, une fois achevé le cycle sporogonique de durée n .**

C mesure donc le nombre de contacts potentiellement infectants qu'un individu peut avoir par l'intermédiaire de la population vectrice par unité de temps (Molineaux & Gramiccia 1980).

On note que C dépend de variables entomologiques et de la durée du cycle sporogonique du parasite considéré, mais est indépendant de la prévalence sporozoïtaire, c'est à dire de la présence ou de l'absence de parasites dans une population vectrice particulière.

Pour être un **vecteur**, un anophèle devra donc être **anthropophile**, être **compétent** pour permettre le développement complet du parasite, et **survivre assez longtemps** pour transmettre les stades infectants. C a été estimée pour les complexes *An. gambiae* et *An. funestus* entre 0.006 et 22.25 (Bruce-Chwatt 1980).

hôte-parasite, car elle met en jeu les mécanismes de l'interaction hôte-parasite de la « course aux armements » entre les deux génomes du parasite et de son hôte. Il faut noter que la compétence vectorielle peut être également fortement influencée par des facteurs environnementaux, qui vont jouer sur la durée du cycle sporogonique, ou les interactions vecteur-parasite (Ferguson & Read 2002 ; Lambrechts et al. 2006).

Nota bene : Remarquons que les éléments du comportement (préférence et comportement trophiques) étant déterminés génétiquement, ils peuvent également être inclus dans la deuxième dimension « compétence vectorielle », mais nous les incluons dans la première car ils déterminent les modalités du recrutement et de la transmission parasitaire de façon extrinsèque (filtre de recrutement externe), alors que les éléments génétiques intrinsèques de la compétence vectorielle liés au développement parasitaire intra-moustique constituent un filtre de compatibilité interne au vecteur.

1.3.1 Influence des facteurs extrinsèques sur la capacité vectorielle et la transmission palustre

La transmission et le risque palustre au niveau local est très hétérogène, affectée par de nombreux facteurs environnementaux qui influencent la capacité vectorielle des populations de moustiques. Les différentes espèces vectrices sympatriques, l'hétérogénéité spatiale de l'habitat larvaire, le statut immunitaire des populations d'hôtes humains et les mesures de contrôle contribuent à la variabilité du risque de transmission, mesuré comme on l'a vu par le paramètre h . Les paramètres liés à l'écologie des vecteurs vont donc avoir un impact sur les populations de parasites recrutées et transmises, notamment dans les zones où plusieurs espèces de moustiques sont présentes en sympatrie, comme c'est le cas dans une grande majorité des foyers africains de la transmission.

Les facteurs extrinsèques d'importance varient avec l'échelle considérée : au niveau continental, à l'échelle la plus large, le climat est le facteur majeur gouvernant la distribution et l'abondance relative des moustiques, et donc l'intensité de la fréquence des piqûres infectées h et du risque palustre. Par exemple, la distribution des différentes espèces du complexe *An. gambiae* dépend majoritairement du climat (*An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. sont sympatriques sur une large fraction du territoire sub-saharien, excepté dans les zones plus arides où *An. arabiensis* est mieux adapté). De la même façon, la distribution des différentes formes chromosomiques des espèces *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* sur différentes zones écologiques en Afrique de l'Ouest est gouvernée par le climat (hygrométrie de l'air).

Au niveau régional, les effets climatiques locaux et la disponibilité des hôtes vertébrés vont gouverner la distribution des espèces et le risque palustre. Par exemple, une espèce héliophile et anthropophile comme *An. gambiae* ne sera pas trouvée en forêt, à cause du couvert forestier et de la rareté de l'homme.

Au niveau local, de nombreux facteurs environnementaux et liés à la disponibilité des hôtes vont gouverner la distribution des vecteurs et l'intensité de la transmission en fonction de leurs caractéristiques biologiques et comportementales. L'utilisation des sols, la proximité des gîtes larvaires aux hôtes vertébrés, les mesures locales de contrôle vectoriel, vont déterminer l'hétérogénéité du taux d'inoculation entomologique localement.

Les facteurs extrinsèques influencent ainsi la capacité vectorielle des anophèles africains et la transmission palustre. Pour les quatre espèces vectrices majeures plus spécifiquement étudiées au cours de cette thèse, nous avons détaillé quelques éléments de l'environnement, de la biologie (longévité, densité et distribution des populations) et du comportement (anthropophilie, endophilie /exophilie) des quatre espèces vectrices majeures *An. gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* qui vont influencer la capacité vectorielle de ces espèces de façon extrinsèque, et en faire les vecteurs les plus efficaces pour la transmission des parasites *Plasmodium* à l'échelle du continent africain.

▪ **Taux d'infection naturels des vecteurs majeurs africains :**

Les taux d'infection sporozoïtiques sont très variables dans les populations naturelles. Les indices sporozoïtiques (*IS*) observés chez *An. gambiae* et *An. funestus* en Afrique sont compris entre 1 et 5%, approchant les 10-30% à certaines périodes de l'année (Beier 1998 ; Mouchet 2004). L'importance du vecteur *An. funestus* est considérable en Afrique, les *IS* observés étant supérieurs à ceux d'*An. gambiae* dans certains contextes où les deux vecteurs sont sympatriques (régions d'Afrique de l'Ouest et Centrale) (Fontenille et al. 1997). Ces deux vecteurs assurent ainsi l'essentiel de la transmission dans une majorité de contextes écoclimatiques africains, les *IS* rapportés variant de 22% et 23% rapportés en Afrique du Sud, et 11% en Tanzanie, à 2,6% à 14,6% en Afrique de l'Ouest et 5% au Cameroun (Antonio-Nkondjio et al. 2002 ; Coetzee & Fontenille 2004).

Les deux vecteurs *An. nili* et *An. moucheti* sont parfois considérés comme des vecteurs d'importance locale, voire parfois même des vecteurs secondaires. Cependant, dans des contextes écoclimatiques particuliers où ils sont présents en abondance (Afrique Centrale et/ou de l'Ouest pour *An. nili*), les taux d'infection naturels de ces deux espèces sont élevés. Les enquêtes entomologiques rapportent des taux d'infections des glandes salivaires de l'ordre de 3% au Cameroun et au Sénégal, et des taux *h* élevés pour *An. nili* (Carnevale et al.

1992 ; Dia et al. 2003) et *An. moucheti* (Antonio-Nkondjio et al. 2002) (56-100 piqûres infectantes/homme/an).

▪ **Distribution des vecteurs et gîtes larvaires :**

Anopheles gambiae et *An. funestus* sont les deux espèces les plus largement répandues en Afrique au sud du Sahara. Leurs aires de distribution se chevauchent sur la majeure partie du continent, où ils sont présents en sympatrie dans une grande variété de contextes de transmission palustre : en zones de savanes d'Afrique de l'Ouest, en zone forestière équatoriale d'Afrique Centrale (Cameroun, Congo, etc.), en Afrique du Sud, et sur les hauts-plateaux d'Afrique de l'Est.

La nature des gîtes larvaires d'*An. gambiae* s.s, issus d'un environnement marqué par l'action de l'homme (trous d'eau créés par le bétail, flaques, rizières, zones d'irrigation, étangs de pisciculture, etc.) signent son anthropisation. La pénétration par l'homme des zones de forêt denses, jusque-là interdites à un vecteur comme *An. gambiae* dont les larves sont très héliophiles et ne se développent pas sous le couvert forestier, aurait favorisé la spéciation de ce taxon très anthropisé au sein du complexe *An. gambiae* s.l. originel (Coluzzi 1999). L'ouverture de la forêt et la grégarisation des premières communautés humaines auraient favorisé l'évolution de ce taxon domestique en fournissant les gîtes et le couvert appropriés.

Les gîtes larvaires d'*An. funestus* sont moins inféodés aux environnements humains, puisque ses larves se développent dans des étendues d'eau avec végétation dressée (lacs, zones marécageuses herbacées, rizières) à l'abri des prédateurs, mais la forte anthropophilie de ce vecteur suggère un processus évolutif semblable à celui d'*An. gambiae* s.s. (Coluzzi 1999).

Les spécificités d'adaptation à l'environnement de ces deux espèces leur permettent donc dans certaines zones à transmission saisonnière de se relayer pour assurer la transmission du parasite plus avant dans la saison sèche : *An. gambiae* s.s. étant inféodé aux gîtes temporaires, dont la présence est très dépendante du degré d'humidité des sols, et donc des précipitations, les densités de ce vecteur augmentent fortement aux premières pluies, et se maintiennent jusqu'à l'assèchement des sols au début de la saison sèche. *Anopheles funestus* étant inféodé aux gîtes permanents, la densité de ses populations est donc moins directement soumise aux aléas des précipitations, voir pas du tout dans le cas des gîtes situés en bordure de lacs (comme c'est le cas pour *An. funestus* à Tibati). Celles-ci se maintiennent donc plus en avant voire pendant toute la durée de la saison sèche, relayant la transmission du parasite après le déclin des populations d'*An. gambiae*. Les populations d'*An. funestus* seraient ainsi plus stables que celles d'*An. gambiae*, avec de possibles conséquences sur la transmission et

la structure des populations de *Plasmodium* (Czeher et al. 2006 ; Fontenille et al. 1997 ; Gillies & De Meillon 1968 ; Minakawa et al. 2002).

Anopheles nili est largement distribué dans une très grande partie de la zone d'Afrique tropicale (Hamon et al. 1963), surtout présent dans les zones de savane humides. Les larves d'*An. nili* sont inféodées aux anses calmes des cours d'eau rapides. *Anopheles moucheti* est distribué plus localement en Afrique, où il est le vecteur naturel du paludisme dans le bloc forestier centrafricain. Les larves se développent dans les larges rivières à courants lents, au lit encombré par la végétation flottante, en Afrique équatoriale, de la Guinée à l'Ouganda et au sud du Soudan, en passant par la Namibie (Gillies & De Meillon 1968).

Il est à noter que, si la distribution géographique de ces deux espèces est plus restreinte en Afrique que celle de *An. gambiae* et *An. funestus*, leur importance au sein des foyers palustres dans la transmission des *Plasmodium* est très loin d'être négligeable, les densités et *IS* mesurés étant parfois bien supérieurs à ceux de *An. gambiae* dans certains sites en bord de rivière. Dans ces conditions, n'orienter la lutte que vers les espèces vectrices dites majeures dans les zones où la transmission est assurée par d'autres espèces n'aura qu'une très faible incidence sur la réduction de la transmission (Boete & Koella 2002).

▪ **Longévité :**

L'espérance de vie des populations vectrices des deux espèces majeures *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* leur permet d'autre part d'assurer la totalité du développement du parasite *P. falciparum* qui varie de deux à cinq semaines en fonction de la température et de l'espèce. Des différences dans la longévité des populations de vecteurs peuvent être à l'origine de différences de portage parasitaire entre les espèces. Ainsi, les espèces plasmodiales à cycle long, comme *P. malariae*, seront transmises préférentiellement par des espèces à longévité élevée. En ce qui concerne les deux vecteurs majeurs, une longévité plus élevée d'*An. funestus* par rapport à *An. gambiae* a été observée au Kenya (Chege & Beier 1990).

▪ **Préférence trophique :**

Les deux vecteurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* se nourrissent très majoritairement sur l'homme. Le comportement trophique très anthropophile d'*An. gambiae* s.s. signe encore une fois son adaptation aux environnements anthropisés. L'adaptation à la prise de repas sur l'homme aurait évolué de la même façon en forêt, puisque le bétail est absent des zones forestières infestées de trypanosomiase. En région forestière, la forme « Forêt » seule présente se nourrit en effet sur l'homme à 90% (Coluzzi et al. 2002). Dans les zones de savane (formes

« Forêt » et « Savane » mêlées), la zoophilie d'*An. gambiae* s.s. augmente avec la densité du bétail, et on y retrouve les autres espèces du complexe, plus zoophiles (Mouchet & Gariou 1957). L'espèce *An. funestus* est également très anthropophile et surtout très endophile, ces comportements ayant également peut-être évolué comme pour *An. gambiae* s.s. dans un environnement forestier modifié par la présence et l'action de l'homme (Coluzzi 1999).

En zone forestière au Cameroun, les adultes *An. nili* et *An. moucheti* sont très anthropophiles, et exophiles (Carnevale et al. 1992). Le parcours entre le village et le lieu de ponte (3 km), peut allonger le cycle gonotrophique jusqu'à 4 jours (Njan Nloga et al. 1993), et l'espérance quotidienne de survie (supérieure à 0,9). L'exophilie est donc plus marquée pour les deux vecteurs « forestiers » *An. nili* et *An. moucheti* que pour les deux vecteurs plus domestiques *An. gambiae* et *An. funestus*. Ce comportement pourrait avoir un impact sur le recrutement des parasites, et on peut imaginer qu'un vecteur de forêt comme *An. moucheti*, plus exophile, aura peut-être moins tendance à répéter ses repas de sang dans la même case, et à disperser plus à l'échelle du village qu'un vecteur très anthropophile et très endophile comme *An. funestus*.

▪ **Fréquence des contacts homme-vecteur :**

Les repas multiples (plusieurs repas sanguins pris au cours d'un même cycle gonotrophique), ou interrompus (plusieurs hôtes sont piqués au cours d'un même repas de sang) augmentent significativement la probabilité de l'infection ou de la surinfection pour un vecteur, et donc sa capacité vectorielle. De nombreuses études ont montré que ces comportements étaient sans doute sous-estimés dans les populations vectrices naturelles (Burkot et al. 1988 ; Klowden & Briegel 1994 ; Lemasson et al. 1997 ; Wekesa et al. 1997). Divers mécanismes ont été suggérés qui peuvent entraîner cette augmentation de la fréquence et/ou de la durée des contacts homme-vecteurs: manipulation de l'hôte vecteur par le parasite, les vecteurs infectés au niveau des glandes salivaires étant plus tenaces (augmentation de la durée du temps passé sur l'hôte lors du repas sanguin, repas interrompus, (Anderson et al. 2000a), et manipulation parasitaire de l'hôte humain, les hôtes infectés et/ou malades étant plus attirants pour les vecteurs (Ferguson & Read 2004 ; Lacroix et al. 2005 ; McCall et al. 2001). Il a été également montré que dans certaines zones, des espèces endophiles pouvaient se passer de jus sucré et le remplacer par le sang humain afin de limiter la fréquence des vols à l'extérieur de la case durant la saison sèche notamment (risques de dessiccation accrus) (Beier 1996 ; Straif & Beier 1996). Un tel comportement augmenterait également significativement la fréquence des contacts homme-vecteur, et donc les taux d'infection et la capacité vectorielle de l'anophèle.

1.3.2 Influence des facteurs intrinsèques : la compétence vectorielle

- **Le développement de *Plasmodium* dans l'anophèle :**

- Réduction parasitaire au cours du cycle sporogonique :

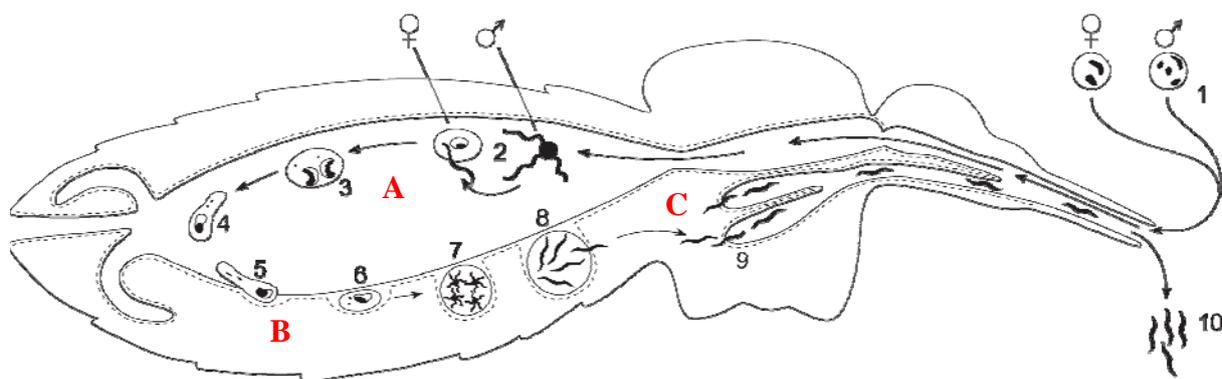
Vaughan (2007) décrit la sporogonie en termes de dynamique des populations : ce sont les changements dans l'abondance et dans la distribution des stades morphologiquement différenciés successifs qui distinguent les trois phases du déroulement de ce cycle complexe (la Figure 5a illustre les différentes étapes du cycle sporogonique de *Plasmodium* dans le moustique anophèle) :

- (i) La phase de la sporogonie précoce (étapes 1 et 2 de la Figure 5a) dure environ 2 jours, et correspond à l'ingestion du repas de sang contenant les gamétocytes matures, l'activation des gamétocytes (gamétogenèse), la fécondation, la différenciation du zygote en ookinète, l'invasion de l'épithélium de l'estomac par les ookinètes, et leur encystement sous la lame basale pour former les oocystes.
- (ii) La deuxième phase dure environ une semaine, et correspond à la maturation des oocystes. Leur nombre reste à peu près stable.
- (iii) La sporogonie tardive correspond à l'invasion de l'hémolymphes par les stades sporozoïtes issus des oocystes, puis à leur invasion des glandes salivaires, environ 10 à 16 jours après l'ingestion du repas de sang infectieux.

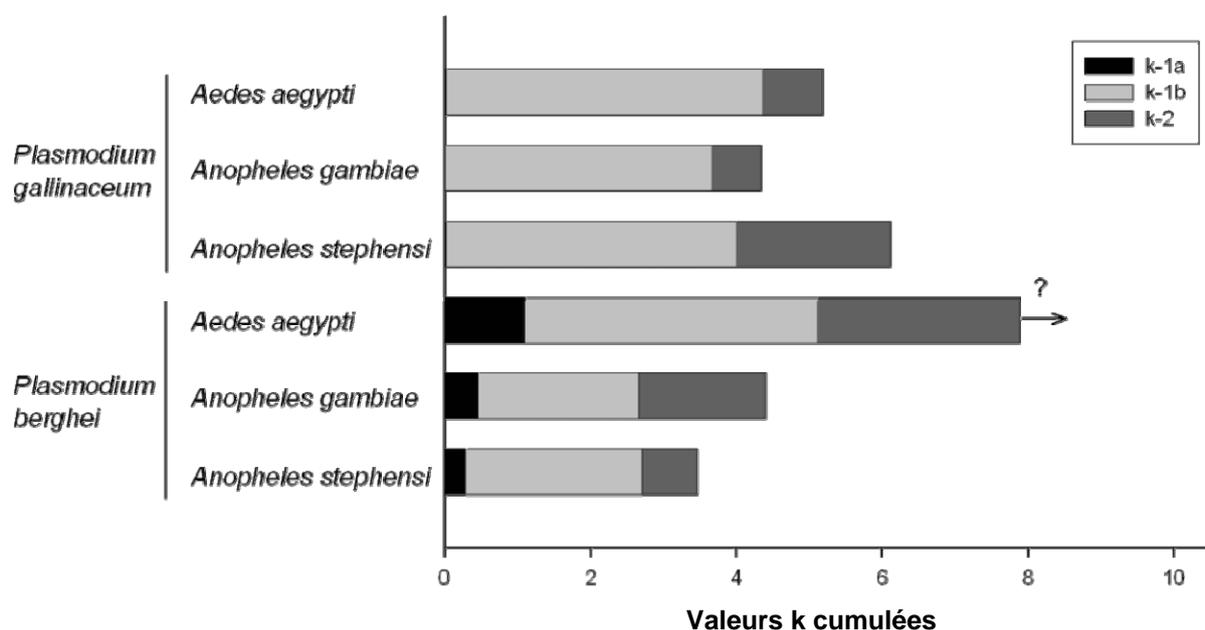
La sporogonie est similaire pour toutes les espèces de *Plasmodium*, quel que soit le genre du moustique infecté (anophèles, culicidés ou phlébotomes). C'est pendant la phase de sporogonie précoce qu'ont lieu les pertes parasitaires les plus importantes : le nombre de parasites chute de plus de 97% en moyenne (92 à 99% de pertes pour *P. falciparum* dans *An. gambiae*, *An. quadriannulatus* et *An. albimanus* en populations naturelles), jusqu'à l'extinction totale dans certains cas. Le nombre des parasites subsistants reste relativement stable au stade oocyste et augmente ensuite avec la libération des stades sporozoïtes.

La Figure 5 (a et b) illustre les étapes de transition entre les stades successifs majoritairement concernés par la réduction parasitaire au cours de la sporogonie. Trois transitions majeures sont distinguées au cours desquelles s'exercent différents mécanismes de régulation de la charge parasitaire (Figure 5b) :

- (i) La transition gamétocyte-zygote puis la différenciation en ookinète : étapes de la gamétogenèse et de la fécondation (0-24 heures post-infection) ;
- (ii) La transition ookinète-oocyste (24-48 heures post-infection) ;



a)



b)

Figure 5. La réduction parasitaire au cours du développement sporogonique de *Plasmodium* dans le vecteur anophèle. (a) Les sites de la réduction parasitaire : (A) pertes parasitaires lors de la transition entre les stades gamétocyte-gamète-ookinète : stades de la sporogonie précoce ; (B) pertes lors de la transition entre les stades ookinète-oocyste ; (C) pertes de sporozoïtes dans l'hémolymphé : ces pertes qui ont lieu lors de la sporogonie tardive sont mineures. Les pertes entre stades successifs ont été étudiées par comptage des parasites lors des transitions entre stades (paramètre de mortalités successives k). (Figure modifiée d'après Vernick 2005) ; (b) Pertes successives cumulées pendant le déroulement de l'infection des trois espèces *Aedes aegypti*, *An. gambiae* et *An. stephensi* par *P. gallinaceum* et *P. berghei*. (k-1a) pertes pendant l'activation des gamétocytes ; (k-1b) pertes entre les étapes d'activation gamétocytaire et de formation de l'ookinète ; (k-2) pertes entre la formation de l'ookinète et le développement de l'oocyste ; (?) la valeur k-2 de l'infection de *P. berghei* dans *Ae. aegypti* n'a pas pu être déterminée avec précision. (Source : Alavi et al. 2003).

- (iii) La transition sporozoïtes dans l'hémolymphe-sporozoïtes des glandes salivaires (10-15 jours post-infection).

C'est au cours de la première phase de la sporogonie précoce (activation des gamétocytes et fécondation) qu'ont lieu les pertes les plus importantes pour le parasite dans la majorité des systèmes moustique-parasite. La deuxième étape de réduction parasitaire majeure a lieu lors de la transition du stade ookinète au stade oocyste, c'est-à-dire lors de l'invasion de l'épithélium de l'estomac du moustique par les ookinètes. Les pertes ultérieures, si elles peuvent diminuer un peu la charge en parasites, ne seront plus éliminatoires pour le parasite dans les conditions naturelles de l'infection : quelques ookinètes ayant franchi avec succès la barrière intestinale sont suffisants pour assurer la transmission du parasite.

- Les facteurs qui influencent le déroulement de la sporogonie :

L'analyse de la dynamique des densités parasitaires et de la distribution des stades parasitaires successifs dans le moustique lors d'infections expérimentales de nombreuses combinaisons vecteur/parasite ont permis de mettre en évidence les facteurs qui régulent le développement du parasite au sein de son hôte définitif.

Pour un système donné, la majorité de la variance dans la mortalité parasitaire au cours d'infections réalisées sur des porteurs de gamétocytes différents se situe au niveau de la phase sporogonique précoce : gamétogénèse et fécondation (transition du gamétocyte au zygote) (Vaughan 2007 ; Vaughan et al. 1994 ; Zollner et al. 2006). Cette étape est en effet la seule qui diffère significativement entre les donneurs de sang infecté. L'étude de l'infectivité de 15 donneurs de *P. vivax* pour 3 espèces de vecteurs anophèles susceptibles montre que les stades parasitaires ne s'agrègent qu'au stade oocyste, les stades gamétocytes et zygotes étant distribués aléatoirement, et la gamme d'infectivité des 15 donneurs étant très large (Zollner et al. 2006). Ainsi, malgré le pouvoir infectieux hétérogène des souches parasitaires des donneurs, les parasites étaient distribués aléatoirement au sein des moustiques pour les stades précoces de la sporogonie précoce, ce qui suggère que ces processus précoces antérieurs à la transition ookinète-oocyste sont contrôlés par des facteurs intrinsèques au parasite (parasitémie asexuelle, sex-ratio) et/ou par des facteurs du sang (médicaments, anticorps, cytokines). Ainsi, les causes de l'hétérogénéité du succès infectieux d'un donneur à un autre sont à rechercher au cours de la transition gamétocyte-zygote, c'est-à-dire lors de la toute première phase de la sporogonie.

L'importance des conditions de l'infection chez l'homme et des conditions de la production des stades transmissibles dans le sang sur l'infectivité ultérieure d'une souche

parasitaire est ainsi soulignée : des facteurs tels que le sex-ratio des gamétocytes (Robert et al. 1996b), la multiplicité et la diversité génétique de l'infection, les facteurs du sang bloquant la transmission (cytokines humaines, complément, etc.) vont déterminer la probabilité d'infection des vecteurs.

En revanche, la grande variabilité inter-moustique au stade oocyste (avec une distribution très clairement agrégée, ou binomiale négative, des oocystes entre les individus moustiques) indique que le succès infectieux des ookinètes est influencé par des facteurs de contrôle de la charge parasitaire intrinsèques au moustique : c'est à ce stade qu'interviennent les facteurs de l'immunité du moustique.

▪ L'immunité des anophèles :

- Phénotypes et bases génétiques de la résistance des anophèles aux *Plasmodium* :

Les pertes parasitaires interviennent lors de la transition entre stades parasitaires qui ont à franchir les tissus de l'hôte représentant les barrières physiques majeures au sein du vecteur. C'est au sein de ces différents tissus que les facteurs de la résistance du moustique influencent de façon active (réponse immune active) ou passive (présence/absence des récepteurs adéquats pour les ligands parasitaires) le déroulement de l'infection. Les barrières à l'infection chez le moustique appartiennent à plusieurs catégories :

- (i) Barrières physiologiques/physiques : la paroi intestinale, la paroi des glandes salivaires, l'hémolymphe ;
- (ii) Cellulaires : présence/absence de récepteurs/ligands de surface pour l'invasion (Dinglasan et al. 2007), voies de signalisation, facteurs nutritifs ;
- (iii) Immunes : molécules de reconnaissance ou effectrices (hémocytes, phagocytes), différences dans les voies de régulation des gènes entre espèces de moustique, qui peuvent affecter les trois barrières précédentes.

Plusieurs mécanismes de l'immunité des anophèles qui sous-tendent potentiellement la grande variabilité inter-moustique de la charge parasitaire dans les populations naturelles de vecteurs ont été mis au jour à partir de systèmes génétiquement sélectionnés pour leur phénotype de résistance, régulant activement l'infection parasitaire. L'étude des bases génétiques et moléculaires de ces phénotypes de résistance à l'infection palustre a ensuite été menée selon deux approches :

- (i) La première approche vise à cartographier la résistance dans des lignées d'*An. gambiae* autofécondantes de laboratoire, infectées expérimentalement par des souches de *Plasmodium* de rongeurs (*P. berghei*) ou simiens (*P. cynomolgi*) ou

infectés par des billes chargées. La variabilité inter-individuelle dans la susceptibilité aux parasites *Plasmodium* a ainsi été caractérisée au niveau génétique par de nombreuses études utilisant les techniques de la génomique fonctionnelle et comparative (avec *Drosophila*), majoritairement sur des systèmes de laboratoire ;

- (ii) La seconde approche vise essentiellement à sortir du laboratoire, pour cartographier l'intensité de l'infection dans des pedigrees d'*An. gambiae* sauvages infectés expérimentalement avec le parasite *P. falciparum* issu de porteurs de gamétocytes (souches naturelles sympatriques).

- *L'encapsulation mélanotique :*

L'encapsulation mélanotique des stades ookinètes et oocystes précoces est un phénotype de résistance sélectionné par Collins et al. (1986) sur la souche L35 d'*An. gambiae* réfractaire à l'infection par *P. cynomolgi* B. Les ookinètes vivants sont encapsulés à la sortie de l'épithélium intestinal, sous la membrane basal. Ce phénotype confère également à cette souche d'*An. gambiae* la résistance contre des souches de *Plasmodium* du Nouveau Monde et d'Asie du Sud-Est, mais pas contre les souches de *P. falciparum* africaines, ni contre les *Plasmodium* africains *P. malariae* ou *P. ovale*. Le fait que les parasites sympatriques à l'espèce vectrice africaine *An. gambiae* ne soient pas correctement éliminés a suggéré l'évolution dans ce système d'adaptations locales réciproques. Néanmoins, il faut souligner que les souches de vecteurs et de parasites utilisées sont issues d'élevage de laboratoire, et d'autre part, que ce phénotype, bien que très rare, a été tout de même observé dans des populations naturelles d'*An. gambiae* africaines (Riehle et al. 2006 ; Schwartz & Koella 2002 ; Vernick 2005).

Ce mécanisme n'est pas un mécanisme majeur de la résistance des anophèles dans les populations naturelles de vecteurs (Michel et al. 2006), soit parce que les parasites mettent en place un mécanisme d'immunosuppression de cette voie de résistance (Boete et al. 2002), soit parce que cette voie est trop coûteuse pour le vecteur, le parasite privilégiant en outre des mécanismes d'évasion immune pour infecter son hôte (Lambrechts et al. 2007).

Plusieurs QTL (*Quantitative Trait Loci*) associés au phénotype de l'encapsulation mélanotique du parasite ont été identifiés (Zheng et al. 1997 ; Zheng et al. 2003) : *Pen1* (locus majeur, 54% de la variation dans l'encapsulation), *Pen2* (mineur, 13% de la variance), et *Pen3* (essai avec *P. cynomolgi* B). De plus, différents QTL sont impliqués dans l'encapsulation de différents parasites (Zheng et al. 2003) : il y a une spécificité de la réponse

immune par encapsulation mélanotique en fonction de l'espèce parasitaire infectante. Les gènes en cause au sein de ces QTL n'ont pas été identifiés.

○ *Lyse intracellulaire des ookinètes :*

Un autre mécanisme de résistance par lyse intracellulaire des ookinètes dans l'épithélium de l'estomac a été mis en évidence sur une autre souche sélectionnée d'*An. gambiae* résistante à l'infection par *P. gallinaceum* (Vernick et al. 1995). Le nombre d'ookinètes envahissant la paroi intestinal est similaire chez les souches résistantes et susceptibles, les ookinètes étant dégradés pendant leur traversée de la paroi intestinale chez les souches résistantes (mécanisme probablement semblable pour les souches de *An. atroparvus* et *An. gambiae* résistantes à *P. berghei*). Le processus physiologique n'est pas connu, le phénotype étant contrôlé par un seul locus dominant.

○ *Phagocytose et autres mécanismes de résistance :*

L'implication de la machinerie de la phagocytose (médiée par les hémocytes) a été mise en évidence chez la drosophile dans l'élimination des bactéries. Le rôle des hémocytes dans l'élimination des parasites, et notamment dans le système *An. gambiae/Plasmodium* est moins clair, bien qu'une protéine ait été identifiée chez *An. gambiae* (TEP-1) qui semble promouvoir ce mécanisme de phagocytose dans l'élimination des pathogènes par ce vecteur (Blandin et al. 2004).

D'autre part, le mécanisme de la résistance naturelle d'*An. gambiae* ou de *Culex pipiens* à l'infection par *P. gallinaceum* a été analysé par comparaison avec l'infection dans le moustique susceptible *Aedes aegypti*. Les auteurs ont mis en évidence le rôle d'un facteur toxique diffusible humoral non-identifié. L'échec apparent des culicinés à servir de vecteurs aux *Plasmodium* de mammifères alors qu'ils sont exposés fréquemment aux repas de sang infectants dans les zones de transmission naturelles, et ce bien que l'infection de certains genres de culicinés (*Mansonia*, *Culex*) avec les *Plasmodium* humains africains soit possible expérimentalement, offre un autre exemple d'une résistance au mécanisme obscur. Malgré un développement physiologiquement possible dans le moustique, celui-ci ne sera jamais infectant pour l'hôte vertébré, sans que les barrières à la transmission ne soient connues (Vernick 2005).

○ *Approches en populations naturelles :*

L'étude des bases génétiques de la résistance d'*An. gambiae* en populations naturelles, bien qu'essentielle, a été très peu menée jusqu'à récemment (Luckhart et al. 2003 ; Niare et al. 2002 ; Riehle et al. 2006). Luckhart et al. (2003) ont utilisé une approche de génétique des populations et mis en évidence une variabilité naturelle des fréquences alléliques du gène *nos* dans les populations naturelles d'*An. gambiae* au Kenya. Les populations résistantes à l'infection ségrégent des allèles particuliers de ce gène, dont la protéine est impliquée dans la réponse du moustique à l'infection.

Niaré et al. (2002) ont examiné l'hérédité de la résistance à *P. falciparum* dans les populations naturelles d'*An. gambiae* au Mali. Le phénotype « nombre d'oocystes », i.e. l'intensité de l'infection, diffère significativement entre familles isofemelles infectées à partir du même porteur de gamétocytes. La résistance dans ces deux études est en effet définie comme la réduction du nombre d'oocystes au jour 8 après le repas de sang, phénotype agrégé qui résume toutes les étapes précédentes du développement du parasite dans le moustique. Les allèles qui ségrégent gouvernant ce phénotype sont fréquents dans les populations naturelles avec un effet sur la susceptibilité à l'infection parasitaire.

Niare et al. (2002) et Riehle et al. (2006) montrent l'impact majeur de 3 régions génomiques QTL (*Pfin1*, 2, 3) sur l'intensité de l'infection à *P. falciparum* en populations naturelles de *An. gambiae* au Mali, et le rôle de deux autres locus contrôlant la proportion d'oocystes mélanisés. Ces expériences sont menées sur des pedigrees isofemelles à partir de femelles *An. gambiae* capturées dans les maisons des porteurs de gamétocytes qui ont été recrutés ensuite pour les infections expérimentales : ces expériences sont donc témoin des interactions hôte-parasite de la paire évolutive responsable de la transmission palustre locale.

A la différence de *Pen1*, qui est sans effet sur l'intensité de l'infection, *Pfin2* est exprimé uniquement comme une variation dans l'intensité de l'infection, sans mélanisation, et est identifié grâce à son action contre les parasites sympatriques, contrairement à *Pen1* dont le trait d'encapsulation était plus fort contre les souches allopatriques (non-africaines) de *P. falciparum* par rapport aux souches africaines (Collins et al. 1986). Les deux locus *Pen1* et *Pfin2* sont donc différents.

Les locus de résistance sont regroupés dans une petite région chromosomique (un îlot de résistance à *Plasmodium*) expliquant la majorité de la variation génétique pour l'infection à *P. falciparum* en conditions naturelles. Deux gènes candidats ont été identifiés dans cette région, codant pour des protéines à motifs répétés riches en leucine. Le trait de résistance à l'infection à *P. falciparum* dans les populations naturelles de moustiques *An. gambiae* du Mali ségrége ainsi simplement suivant les lois de Mendel, à une fréquence assez élevée pour que le phénotype « résistant » soit considéré comme le phénotype sauvage par les auteurs.

L'infection du moustique ne concernerait ainsi que les génotypes présentant un défaut particulier du système immunitaire, le mécanisme de mélanisation n'étant pas quand à lui un mécanisme de résistance à l'infection normalement mis en œuvre par les moustiques dans la nature. De plus, l'homogénéité des résultats obtenus à partir de pedigrees indépendants, échantillonnés sur plusieurs années, et nourris chacun sur un porteur différent de gamétocytes, suggère fortement que la résistance contrôlée par l'îlot est largement indépendante du génotype de parasite *P. falciparum* à l'origine de l'infection. Dans la nature, les charges en oocystes sont inférieures à 10, pour plus de 200 en laboratoire. Ces allèles de résistance limitant le développement parasitaire sont des facteurs importants qui sous-tendent ces faibles charges observées dans le milieu naturel.

Deux QTL, dont un nouveau, ont depuis également été impliqués dans la régulation de la charge en oocyste au Kenya, Afrique de l'Est (Menge et al. 2006), mais la localisation physique des marqueurs n'a pas été déterminée.

Des études plus récentes (Luckhart & Riehle 2007 ; Riehle et al. 2007) menées au Kenya selon le même protocole que pour l'Afrique de l'Ouest (Riehle et al. 2006), confirment l'ubiquité géographique de cet îlot de résistance, retrouvé également dans les populations naturelles d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Est. Un même mécanisme de résistance serait donc commun à toutes les populations du vecteur *An. gambiae* en Afrique, ce qui suggère une origine ancienne pour la résistance à *P. falciparum*, plutôt que l'évolution de plusieurs mécanismes différents en réponse à plusieurs pathogènes dans le temps.

– Le fonctionnement de l'immunité chez les insectes :

Les mécanismes de la résistance des populations naturelles de moustiques anophèles (processus physiologiques impliqués et bases moléculaires) sont encore très peu connus. En revanche, les composants putatifs du système immunitaire d'*An. gambiae* ont été identifiés par génomique comparative (Christophides et al. 2002) combinée à des études du transcriptome de la réponse de *An. gambiae* à l'infection par *P. berghei* (Dimopoulos et al. 2002 ; Oduol et al. 2000 ; Vlachou et al. 2005). L'analyse de la fonction des gènes par la technique de *gene silencing* a montré des gènes régulés en amont par l'invasion de l'épithélium intestinal par l'ookinète. Un grand nombre de molécules et trois voies de signalisation ont été identifiées à ce jour chez la drosophile, et par analogie chez *Anopheles*. Parmi elles, les molécules suivantes jouent un rôle clé et ont pu ensuite faire l'objet de tests dans le système *An. gambiae/P. falciparum* naturel :

- (i) LRIM1, TEP1 (Blandin et al. 2004 ; Osta et al. 2004) : gènes antagonistes (leur inactivation entraîne une augmentation du nombre d'oocyste). Ces deux gènes

codent pour des protéines circulantes dans l'hémolymphe, qui tuent les ookinètes ayant envahi la paroi de l'estomac par lyse ou mélanisation.

- (ii) CTL4, CTLMA2 (Osta et al. 2004) : lectines circulantes agonistes, qui inhibent la réponse de mélanisation. D'autres facteurs agissent localement au sein de l'épithélium intestinal (Vlachou et al. 2005).

Récemment, la comparaison des dynamiques évolutives des répertoires immuns innés des deux moustiques *An. gambiae* et *Ae. aegypti* et de *Drosophila melanogaster* ont permis d'appréhender la spécificité d'un grand nombre de processus physiologiques impliqués dans la résistance des insectes aux pathogènes. Les séquences de plus de 300 gènes de l'immunité innée des trois insectes ont été comparées et leur dynamique évolutive analysée selon leur fonction, répartie en trois grandes catégories (Waterhouse et al. 2007) :

- *Reconnaissance immune du pathogène :*

Chez *An. gambiae*, deux types de récepteurs putatifs de reconnaissance du parasite *Plasmodium* ont été identifiés appartenant à deux classes structurales : TEP (*Thioester-Containing Protein*) et LRR (*Leucin-Rich Repeat*). Des membres de ces deux classes ont été associés à l'élimination des parasites par lyse ou mélanisation.

- *Modulation immune :*

La modulation immune est le processus qui régule les conséquences immédiates de la reconnaissance du pathogène et les fonctions effectrices qui s'ensuivent. Par exemple, la modulation de l'activation de la voie de signalisation Toll, qui déclenche la réaction de mélanisation, utilise un vaste répertoire de protéases sérines et leurs inhibiteurs ou autres régulateurs. Ces éléments s'agencent entre eux de façon variée pour former des modules régulateurs spécifiques d'espèces et même de souches de moustiques. Le module de la mélanisation est très contrôlé, car cette réaction génère des déchets toxiques qui peuvent endommager l'hôte moustique (Volz et al. 2006).

- *Transduction du signal et effecteurs immuns :*

Les voies de transduction du signal sont très conservées entre insectes (la voie Toll est retrouvée chez les vertébrés). Les effecteurs immuns ciblent et neutralisent la source microbienne du signal immun. La comparaison des gènes des effecteurs entre les trois insectes montre des dynamiques évolutives distinctes suivant la catégorie de l'effecteur, qui reflète son mode d'action : les effecteurs en interaction directe avec le pathogène se

diversifient rapidement et sont spécifiques d'espèces, alors que les enzymes productrices de composés chimiques (NOS) sont plus conservées.

L'analyse phylogénétique regroupe au final la plupart des gènes de l'immunité dans des expansions spécifiques d'espèces, ce qui suggère qu'ils ont évolué en réponse à des environnements microbiens distincts dans ces trois espèces d'insectes.

– Du laboratoire au terrain :

Toutes ces études ont été majoritairement menées dans le système artificiel *An. gambiae/P. berghei*, et sur la transition ookinète-oocyste. Pour ces raisons, la pertinence de leur applicabilité aux systèmes naturels a été remise en question par plusieurs auteurs (Boete 2005 ; Cohuet et al. 2006 ; Dong et al. 2006 ; Obbard et al. 2007 ; Tahar et al. 2002). Dong et al. (2006) montrent que les réponses immunes transcriptionnelles analysées à l'échelle du génome entier d'*An. gambiae* diffèrent entre *P. falciparum* et *P. berghei* : l'infection à *P. berghei* a un impact large sur le transcriptome, alors que *P. falciparum* élicite une réponse immune beaucoup plus ciblée (l'hypothèse d'une immunosuppression des défenses de l'hôte par le parasite n'étant pas retenue ; Lambrechts et al. 2007). Les effets différents de l'infection suivant l'espèce de parasite suggère l'existence d'adaptations coévolutives dans le système *An. gambiae/P. falciparum*, de façon similaire à l'étude de Collins et al. (1986).

Cohuet et al. (2006) ont testé l'effet de l'inactivation des gènes identifiés dans le couple de laboratoire *An. gambiae/P. berghei* (CTLA4, CTMLA2 et LRIM1) sur le développement de *P. falciparum* chez *An. gambiae* en conditions naturelles, et analysé la réponse transcriptionnelle de ces gènes à l'infection par *P. falciparum*. Le rôle des gènes LRIM1, CTLA4 et CTMLA2 ne serait pas important dans la résistance naturelle de *An. gambiae* à *P. falciparum*, les auteurs mettant en évidence l'effet de la coévolution adaptative qui intervient dans le système naturel *An. gambiae/P. falciparum* pour limiter la charge en oocyste par rapport au système artificiel *An. gambiae/P. berghei*.

Une étude récente a utilisé une approche de génétique des populations pour tester la pertinence de ces mêmes gènes dans la régulation de l'infection dans les populations naturelles de vecteurs (Obbard et al. 2007). Les auteurs ont testé deux populations africaines naturelles du vecteur *An. gambiae* et ne trouvent pas de trace d'une sélection exercée sur ces gènes par le parasite (les gènes de l'immunité, ou qui sont le support de la variation de compétence vectorielle, devraient être soumis à forte sélection, qui peut être révélée par l'analyse du polymorphisme et de la divergence des gènes). Ce résultat s'accorde avec l'étude de Cohuet et al. (2006) pour avancer la nécessité d'une approche naturelle dans l'étude de l'immunité des anophèles. Une telle approche est rendue d'autant plus nécessaire que les

études de l'immunité des anophèles sont menées dans l'optique du contrôle palustre par transformation génétique et lâcher de moustiques résistants à l'infection dans les contextes hautement diversifiés de la transmission palustre africaine.

1.4 Les profils africains de la transmission

La présence de vecteurs dépend de conditions locales qui expliquent une part importante de l'hétérogénéité de la distribution du paludisme. Dans les zones d'endémie palustre, selon les différentes régions biogéographiques et les particularités de la transmission, différents profils épidémiologiques sont décrits en Afrique intertropicale. Carnevale et al. (1984) ont ainsi proposé le concept de faciès épidémiologique pour l'Afrique de l'Ouest, concept étendu ensuite à toute l'Afrique. Un faciès épidémiologique est un ensemble de lieux et régions où le paludisme présente dans ses manifestations pathologiques des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite. En conséquence, dans ces lieux, la stabilité de la maladie, la prévalence parasitaire, l'incidence clinique et les paramètres entomologiques définis par l'indice de stabilité du paludisme y sont similaires.

Appliqués à un continent ces faciès permettent de découper celui-ci en strates épidémiologiques. C'est ainsi qu'il est convenu de diviser l'Afrique au sud du Sahara en six strates majeures : équatoriale, tropicale, sahélienne, subdésertique, australe et montagnarde (Pages et al. 2007). Nous présentons ci-dessous les traits généraux des faciès africains d'importance pour notre travail.

1.4.1 Transmission intense, pérenne ou saisonnière : régions équatoriales et tropicales humides

Le profil de transmission pérenne concerne les régions forestières équatoriales, comme c'est le cas au Sud du Cameroun, et post-forestières, ou alors les sites disposant d'un gîte permanent (c'est le cas de Dielmo au Sénégal ; Fontenille et al. 1997). Dans ces régions, il n'y a pas de transmission palustre au sein de la zone de forêt : les anophèles vecteurs n'y pénètrent pas, car ils n'y disposent pas de gîtes appropriés. Ils se développent donc en bord de cours d'eau et dans les zones déforestées, bien souvent par l'homme, et on observe une hétérogénéité des prévalences en fonction de l'enclavement des villages sous le couvert forestier. Le paludisme y est stable, et les deux saisons des pluies y entretiennent les gîtes et donc une transmission pérenne des *Plasmodium*, avec des variations saisonnières. Les taux entomologiques d'inoculation annuels (h), c'est à dire le nombre de piqûres infectantes par homme par an, varient entre 10 en zones rurales et forestières (Bockarie et al. 1994), et 1000

dans les zones déforestées et densément peuplées (Carnevale & Mouchet 1980). Plusieurs espèces d'anophèles y assurent la transmission des *Plasmodium*, très souvent en sympatrie, et il est fréquent de trouver *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et/ou *An. moucheti* transmettant ensemble *P. falciparum* tout au long de l'année (Antonio-Nkondjio et al. 2006).

La transmission intense et saisonnière concerne les régions des savanes humides (exemple de Tibati, au Cameroun). La saison de transmission correspond à la saison des pluies et s'étale sur 6 mois de l'année. Le paludisme y est stable et h varie entre 50 et 300 (Beier et al. 1999). Les principales espèces vectrices y sont *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus* et *An. nili*. Pour ces deux profils, la prémunition contre les accès palustres sévères y est généralement acquise tôt, entre 5 et 10 ans.

1.4.2 Transmission faible et saisonnière : régions tropicales sèches, bordures des déserts et hauts plateaux

Ce sont les régions de la savane sèche (Sénégal, Kenya). La saison des pluies dure de 2 à 4 mois, la stabilité du paludisme dépend de la durée et de l'intensité de la transmission. Le taux h varie entre 1 (Vercruyse 1985) et plus de 100 (Lemasson et al. 1997). Les vecteurs y sont *A. gambiae*, *A. arabiensis* et *A. funestus*. L'immunité protectrice contre les accès sévères n'y est généralement acquise que plus tard, vers 20 ans.

La transmission palustre en bordure de déserts est instable (Soudan, Madagascar, Kenya), avec des h fréquemment inférieurs à 1 et de grandes variations annuelles, ne permettant pas aux populations locales d'acquérir une protection, d'où l'observation d'épidémies palustres. Suivant les sites, la transmission est assurée par *An. gambiae*, *An. arabiensis* ou *An. funestus* (Fontenille et al. 1990).

1.4.3 Un cas particulier de transmission : environnements urbains ou anthropisés

Les modifications environnementales dues aux activités humaines, comme la déforestation pour l'urbanisation ou l'agriculture, la création de barrages, l'irrigation, ont créé les conditions pour l'émergence de nouveaux profils épidémiologiques. Dans les villes (Djibouti, Franceville, Cotonou, Yaoundé), h est très faible, variant de 0.01 à 10 (Bogreau et al. 2006 ; Issifou et al. 2003 ; Robert et al. 2003a), mais dans les zones d'agriculture irriguée, il peut s'élever à plusieurs centaines de piqûres infectantes/homme/an (Ijumba et al. 2002), selon la région bioclimatique, le type d'agriculture (rizières), les conditions socio-économiques des communautés locales, etc. Les espèces présentes dans ce type d'environnement sont *An. gambiae*, *An. arabiensis* ou *An. funestus*.

2 L'infection à *P. falciparum* dans les contextes africains de la transmission

La diversité de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme dépend de deux grands facteurs principaux : la fréquence de l'exposition au parasite *P. falciparum*, et l'immunité des hôtes, innée et acquise. L'hétérogénéité de ces deux facteurs entre hôtes va déterminer la variation des paramètres de l'infection entre hôtes et l'issue de l'infection palustre. La fréquence de l'exposition au parasite, c'est-à-dire la fréquence des piqûres infectantes reçues, varie en fonction : (i) de facteurs liés à l'environnement : durée et intensité de la transmission palustre, espèces vectrices locales ; (ii) de facteurs liés à l'hôte : taille de l'hôte, attractivité différentielle des hôtes ; (iii) ou de facteurs externes : chimioprophylaxie, traitements, mesures de contrôle (moustiquaires, vaccins). L'immunité (ou la susceptibilité) innée est variable suivant les facteurs génétiques intrinsèques de l'hôte (facteurs hématologiques, système HLA et appartenance ethnique), et l'immunité acquise varie en fonction de l'âge des hôtes et des modalités de leur exposition au parasite.

La compréhension des effets relatifs de ces nombreux facteurs dans l'épidémiologie de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme, est essentielle pour comprendre la mise en place des mécanismes de l'immunité anti-palustre naturelle et la mise en place de stratégies de contrôle appropriées. Nous nous limiterons ici à un état des lieux des différents facteurs qui influencent la multiplicité de l'infection chez l'homme, paramètre essentiel de l'infection à *P. falciparum* car il détermine la structure des populations du parasite et de nombreux traits de son histoire de vie.

2.1 La multiplicité de l'infection à *P. falciparum*

L'intensité et la durée de la transmission palustre dans les contextes épidémiologiques africains sont variables comme on l'a vu d'une région ou même d'un village à l'autre : le nombre de piqûres infectantes reçues, leur fréquence, la durée de la période de transmission, les espèces vectrices locales, les habitudes culturelles des populations, leurs parcours thérapeutiques, leur appartenance ethnique, etc. L'ensemble de ces facteurs, parmi lesquels les modalités de l'exposition au parasite *P. falciparum* jouent un rôle-clé, définissent l'endémicité du paludisme dans une région, le caractère pérenne ou saisonnier de la transmission, et vont finalement imposer le rythme de l'acquisition de l'immunité naturelle anti-palustre, qui va gouverner la distribution en fonction de l'âge de l'infection à *P. falciparum*. Ainsi, l'incidence des cas cliniques, la prévalence de l'infection palustre, les

densités parasitaires, le nombre de génotypes parasitaires co-infectants, tous ces paramètres qui caractérisent une infection à *P. falciparum* seront distribués de façon monotone, ou non, au cours de la vie d'un individu, en fonction des facteurs qui déterminent l'acquisition des divers mécanismes de l'immunité anti-palustre naturelle.

L'épidémiologie moléculaire de l'infection à *P. falciparum* vise ainsi à l'identification des divers facteurs qui vont conditionner la diversité génotypique des populations parasitaires de l'infection humaine et vectorielle, dans la perspective de mieux comprendre les mécanismes de l'immunité naturelle, ainsi que la biologie et l'épidémiologie du parasite (Mercereau-Puijalon 1999). Parmi tous les paramètres de l'infection, de nombreuses études ont montré l'importance de la multiplicité (ou complexité) de l'infection, définie comme le nombre minimal de génotypes parasitaires distincts portés par un individu infecté (Contamin et al. 1995).

Ce paramètre détermine les éléments suivants de la biologie et de l'épidémiologie du parasite (Paul et al. 2003 ; Tibayrenc 1999) :

- (i) Traits d'histoire de vie: gamétocytogenèse (Nassir et al. 2005), détermination du sexe et allocation des sexes (proportion des mâles, i.e. sex-ratio (Read et al. 1992 ; Robert et al. 2003b), succès de la transmission des stades sexuels (Nassir et al. 2005 ; Read & Taylor 2001) ;
- (ii) Structure des populations du parasite : le nombre de génotypes co-infectants et con-spécifiques détermine la probabilité d'autofécondation entre gamétocytes génétiquement identiques dans le vecteur (Dye & Godfray 1993 ; Hill et al. 1995 ; Nee et al. 2002) ;
- (iii) Evolution de la virulence : le nombre de génotypes co-infectants dans une infection multiple et/ou mixte détermine la compétition intra- et inter-spécifique au sein des hôtes homme et vecteur (de Roode et al. 2005 ; Read & Taylor 2001 ; Smith et al. 2005b ; Smith et al. 1999b).

Les premières études de la diversité génétique des isolats sanguins humains menées avec des marqueurs isoenzymatiques ou d'après l'analyse des variants antigéniques avaient déjà montré qu'un hôte hébergeait communément plusieurs génotypes distincts de parasites dans les zones où le paludisme est endémique (Carter & Voller 1975 ; Conway et al. 1991). Les méthodes de génotypage moléculaire basées sur l'amplification de l'ADN par PCR ont ensuite permis de caractériser génétiquement la composition et la diversité des infections naturelles à *P. falciparum* chez l'homme. Elles ont été largement appliquées à l'étude ponctuelle ou au suivi longitudinal des populations de parasites présentes dans le sang

circulant des individus impaludés symptomatiques ou asymptomatiques, dans une très grande variété de contextes épidémiologiques, et pour toutes les classes d'âges (suivis longitudinaux menés dans les villages de Dielmo et Ndiop au Sénégal (Mercereau-Puijalon 1999), Madang en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Bruce et al. 2000a), en Tanzanie (Farnert et al. 2001), et au Mali (Takala et al. 2007)).

Les marqueurs les plus utilisés ont été les régions polymorphes des gènes de trois antigènes de surface du parasite : les deux protéines de surface du mérozoïte, MSP-1 et 2 (*Merozoite Surface Protein-1 et 2*), et la protéine GLURP (*Glutamate-Rich Protein*). Plus récemment des marqueurs microsatellites ont été mis au point pour le génotypage des infections multiples (Bogreau et al. 2006 ; Greenhouse et al. 2006 ; Takala et al. 2007). Faciles à mettre en œuvre sur les populations naturelles du parasite, ces techniques sont cependant soumises à l'étape aléatoire d'amplification de la PCR. La détection des allèles minoritaires est aléatoire, des études ayant montré que la détection du nombre de génotypes de *P. falciparum* co-infectants chez les adultes était densité-dépendante (Farnert et al. 2001 ; Mayor et al. 2007). De plus, le comptage du nombre d'allèles par le nombre de bandes migrées, sans aucune indication de séquence, sont autant d'inconvénients qui peuvent sous-estimer la diversité génétique réelle des isolats.

Néanmoins, ces études ont montré que les infections à *P. falciparum* étaient composées de plusieurs génotypes co-infectants, dans quasiment tous les contextes de la transmission : transmission intense (Anderson et al. 2000b ; Beck et al. 1997 ; Bogreau et al. 2006 ; Ntoumi et al. 1995 ; Takala et al. 2007 ; Tanabe et al. 2007), transmission moyenne et saisonnière, rurale ou urbaine (Issifou et al. 2003 ; Konate et al. 1999 ; Paul et al. 1995 ; Peyerl-Hoffmann et al. 2001 ; Zwetyenga et al. 1999), ou transmission très faible et saisonnière (Arnot 1998 ; Roper et al. 1998) en Afrique, mais aussi en Asie du Sud-Est (Paul et al. 1998) ou en Amérique Latine (Ariey et al. 1999 ; Haddad et al. 1999). La seule exception concerne : (i) les zones où le paludisme est épidémique: les épidémies y sont provoquées par des parasites appartenant à un génotype clonal prédominant (Rogier et al. 2005 ; Urdaneta et al. 2001) ; (ii) les zones où le paludisme sévit au sein de populations isolées géographiquement : communautés indiennes d'Amazonie (Laserson et al. 1999) ou îles (îles du Cap Vert, Arez et al. 1999 ; îles Salomon, Sakihama et al. 2006). Malgré une transmission parfois forte (îles Salomon), la diversité des parasites circulants reste faible.

En tenant compte des biais possibles liés à l'utilisation de la PCR et à la nature du polymorphisme génotypé (pour le gène *msh-2*, il s'agit d'une variation du nombre d'unités répétées, un même poids moléculaire à la migration pouvant ainsi représenter en fait deux séquences différentes), le nombre de génotypes observés par hôte peut varier de 2 à 14

(Kobbe et al. 2006), avec un polymorphisme de 80 allèles différents répertoriés au total pour le « bloc 2 » du marqueur *msp-2* (Felger et al. 1999), ce qui en a fait le marqueur le plus couramment utilisé en épidémiologie moléculaire de *P. falciparum*. Jafari-Guemouri et al. (2006) et Kobbe et al. (2006) ont mesuré récemment la multiplicité des infections chez les enfants, au Sénégal et au Ghana : le premier trouve une moyenne de 5 à 7 clones par individu, le second une médiane de 4. Ils soulignent, comme d'autres études avant eux (Daubersies et al. 1996 ; Farnert et al. 1997), que la totalité de la diversité clonale d'une infection à *P. falciparum* n'est pas du tout accessible en un seul prélèvement de sang périphérique, à cause des dynamiques journalières de séquestration des génotypes dans les capillaires sanguins profonds.

Largement menées depuis le début des années 1990, ces études ont ainsi permis de mieux cerner les facteurs qui influencent la complexité des infections naturelles humaines et vectorielles. Elles ont largement contribué à l'identification des paramètres qui influencent la diversité et la structure des populations de *P. falciparum*, la mise en place de l'immunité, et la diffusion des résistances aux médicaments et vaccins.

Actuellement, l'épidémiologie moléculaire des populations naturelles de *P. falciparum* se cherche de nouveaux outils d'analyse : de nouvelles techniques sont mises au point pour quantifier les proportions et les dynamiques relatives des différents génotypes composant la population parasitaire d'une infection multiple humaine (PCR quantitative : Barry et al. 2007 ; Bruce & Day 2002 ; Jafari et al. 2004). D'autres méthodes visent à l'identification complète du génotype multilocus de chacun des clones d'une infection multiple humaine : mise au point d'une méthode d'estimation des haplotypes présents dans les isolats sanguins par pyroséquençage suivi d'une modélisation mathématique (*log-likelihood*) pour estimer la probabilité d'occurrence des haplotypes en fonction des fréquences alléliques (Hill & Babiker 1995 ; Takala et al. 2007). Enfin, depuis 2002, après le génotypage complet du génome de *P. falciparum* et *P. vivax*, de nouveaux marqueurs moléculaires du polymorphisme sont identifiés pour ces espèces (Cui et al. 2003 ; Leclerc et al. 2004). Cet effort s'accompagne ainsi d'un regain d'intérêt témoigné pour l'épidémiologie, la biologie et la structure des populations des autres espèces de *Plasmodium* humains, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* (Mueller et al. 2007). L'épidémiologie des infections mixtes naturelles chez l'homme (Mayxay et al. 2004 ; Zimmerman et al. 2004) comme chez le vecteur (Arez et al. 2003 ; Boete & Paul 2006) menées depuis quelques années a ainsi permis la prise de conscience de la fréquence élevée de ces infections et l'étude des interactions entre espèces (Bruce et al. 2000a ; Snounou & White 2004), qui va influencer largement sur l'épidémiologie de l'infection à *P. falciparum*.

2.2 Acquisition de l'immunité et multiplicité de l'infection

L'évolution de l'infection avec l'âge est caractéristique de l'acquisition de l'immunité antipalustre dans les zones de forte transmission. L'immunité anti-palustre peut être définie comme la lente acquisition d'une immunité non-stérilisante contre les stades sanguins du parasite (Mercereau-Puijalon 1999). L'état immun des individus a été suivi par l'observation et la mesure des paramètres suivants : incidence des cas cliniques, mesure des taux de conversion des anticorps dans le sang (Molineaux & Gramiccia 1980), observations microscopiques de la prévalence et des densités parasitaires, génotypage moléculaire enfin qui a permis l'accès à la complexité de l'infection parasitaire portée par un individu. L'observation de la variation de ces différents paramètres en fonction de divers facteurs, humains et environnementaux, a permis de proposer des modèles d'acquisition de l'immunité antipalustre en fonction du contexte épidémiologique.

2.2.1 Influence de l'âge sur la multiplicité de l'infection

- **Transmission intense (holo- et hyper-endémicités) :**

La distribution du nombre de génotypes co-infectants en fonction de l'âge est un indicateur de l'endémicité et de l'acquisition de l'immunité contre une maladie infectieuse. Les études longitudinales menées depuis 1990 dans deux villages au Sénégal, Dielmo et Ndiop, ont permis d'évaluer les facteurs qui influencent le portage parasitaire et la mise en place des mécanismes de l'immunité des individus. Deux facteurs principaux sont identifiés : l'âge du porteur asymptomatique (Ntoumi et al. 1995), et l'intensité et la durée de l'exposition au parasite (Konaté et al. 1999). Dans la zone de forte exposition au parasite *P. falciparum*, Dielmo, où la transmission est intense et pérenne (90-350 piqûres/homme/an), la distribution du nombre de génotypes distincts par individu hôte (3,3 génotypes distincts/porteur en moyenne, avec un maximum de 12 souches détectées chez un individu) est corrélée négativement avec l'âge de l'individu. La distribution de la complexité de l'infection dans le village holoendémique est ainsi stratifiée selon les classes d'âge suivantes :

- (i) Nouveau-nés de 6 mois à 1 an : après la naissance, le nouveau-né est protégé par les anticorps maternels. Après 6 mois, une piqûre infectieuse provoque une infection avec multiplication rapide et non-contrôlée. Les mécanismes de la fièvre (cytokines) protègent l'enfant, ou bien l'anémie est fatale. La multiplicité de l'infection (*MOI* pour *Multiplicity Of Infection*) est faible et les parasitémies élevées.

- (ii) Enfants de 2 à 4 ans : la *MOI* est plus basse que chez les enfants plus âgés. Cette classe d'âge est aussi celle qui reçoit le plus de traitements médicamenteux, le risque d'accès palustre étant très élevé. La parasitémie est forte.
- (iii) Enfants de 5 à 9 ans : la *MOI* est la plus élevée de tous les groupes d'âges, mais avec moins de risque d'attaques cliniques que pour les 0-4 ans. La parasitémie est diminuée.
- (iv) Enfants de 10 à 14 ans : la *MOI* diminue mais reste plus forte que chez les plus âgés.
- (v) Au-delà de 15 ans : la *MOI* diminue graduellement avec l'âge. Les densités de l'infection deviennent sub-microscopiques, d'autant plus que l'âge augmente, ce qui diminue d'autant la sensibilité de la PCR et le nombre de génotypes détectés chez les adultes (Farnert et al. 2001 ; Mayor et al. 2007).

Cet effet de l'âge sur la distribution des paramètres de l'infection, produit ou non d'un biais de la PCR aux faibles densités parasitaires, a été observé dans de nombreux contextes épidémiologiques et environnementaux, présentant tous les mêmes caractéristiques d'une transmission intense et pérenne : Tanzanie (Arnot 2002 ; Smith et al. 1999a), Gambie (Conway et al. 1991), Nigeria (Molineaux & Gramiccia 1980), Sénégal (Konaté et al. 1999), Cameroun (Basco & Ringwald 2001), Mali (Takala et al. 2007), Papouasie-Nouvelle-Guinée (al-Yaman et al. 1997 ; Bruce et al. 2000b). Les caractéristiques de l'infection palustre évoluent donc de la même façon avec l'âge des individus dans toutes les zones de forte transmission : les cas cliniques (multiplication asexuée incontrôlée du génotype infectant provoquant la fièvre) ne sont observés que chez les très jeunes enfants (<1-2 ans), les densités parasitaires étant ensuite rapidement contrôlées de façon à éviter les accès cliniques graves jusque à l'âge de 5 ans. Après 5 ans, la capacité de réduire fortement les densités des parasites du sang périphérique (clairance de l'infection) confèrent à l'individu une protection contre la prolifération parasitaire et les accès fébriles.

▪ **Transmission saisonnière (mésos- et hypo-endémicités) :**

Une telle corrélation entre l'âge et la complexité de l'infection n'est pas observée dans les régions à transmission faible et saisonnière. A Ndiop au Sénégal, situé à 5 km de Dielmo, la multiplicité moyenne est de l'ordre de 2 génotypes par hôte, pour 7 à 63 piqûres/homme/an, du même ordre que ce qui est décrit en Gambie ou à Kilifi au Kenya, zones de mésoendémie. La complexité de l'infection palustre asymptomatique ne varie pas en fonction de l'âge (Zwetyenga et al. 1998). La comparaison de la diversité des infections entre les deux villages montre une diversité deux fois plus élevée à Dielmo, les relevés longitudinaux au sein des

deux villages étant pourtant homogènes dans le temps. La corrélation négative entre l'âge et l'infection peut également être décalée dans le temps vers les classes d'âge plus élevées. A cause de l'exposition moins fréquente aux parasites, l'acquisition de l'immunité est retardée (voir Issifou et al. 2003 pour une comparaison du paludisme urbain entre Franceville, Gabon, et Cotonou, Bénin). L'absence d'effet de l'âge sur l'évolution de l'infection palustre dans les zones de faible transmission saisonnière est confirmée par d'autres études (Roper et al. 1998 pour le Soudan).

2.2.2 L'acquisition de l'immunité anti-palustre

▪ L'immunité spécifique : régulation des densités parasitaires :

L'influence de l'âge sur la distribution des divers paramètres de l'infection parasitaire (densités parasitaires, complexité) a été interprétée par Ntoumi et al. (1995) comme le reflet indirect de l'acquisition progressive des différents mécanismes de l'immunité anti-palustre naturelle au cours de la vie d'un individu en zone de forte endémicité. Dans le groupe des 5-14 ans, l'immunité clinique est en place, mais l'immunité antiparasitaire ne l'est pas encore ; ils sont ainsi le groupe qui héberge le plus grand nombre de génotypes différents. Le suivi longitudinal des enfants a montré que chaque nouvel accès clinique coïncide avec la présence de génotypes différents. L'exposition cumulée à de nombreux génotypes de *P. falciparum* porteurs d'antigènes différents est nécessaire à la mise en place d'un mécanisme de clairance parasitaire efficace, qui s'installe à partir de 15 ans (Puijalon et al. 1999). L'immunité protectrice est ainsi acquise par les réponses immunes cumulées aux multiples variants antigéniques après des infections répétées, dans les zones de forte transmission (Beck et al. 1997 ; Contamin et al. 1995).

En ce qui concerne l'effet de l'âge, Smith et al. (1999d) soulignent également que l'âge est un corollaire de la taille de l'hôte (poids et surface). Port et al. (1980) ont montré que la proportion de piqûres reçues est proportionnelle au poids ou à la surface de l'hôte, les effets de ces deux paramètres étant similaires. Les taux de succès des inoculations chez les enfants seraient donc supérieurs à ceux des adultes de la même communauté, ce qui va dans le sens d'une mise en place progressive de l'immunité avec l'âge.

Les antigènes-cibles d'un contrôle spécifique de souche seraient les protéines de surface du mérozoïte (MSP-1 et 2), et/ou l'antigène variant exprimé à la surface du globule rouge infecté PfEMP (*P. falciparum Erythrocyte-Membrane Protein*), codé par une famille d'une soixantaine de gènes *var* (Bull et al. 2005 ; Fandeur et al. 1995). Le rôle des protéines MSP-1 et 2 est détaillé par Tanabe et al. (2007) dans l'acquisition d'une immunité additive et

âge-dépendante aux différentes régions antigéniques de la molécule (immunité spécifique d'épitope). L'histoire complète de l'exposition d'un individu aux parasites *Plasmodium* étant impossible à suivre sur le terrain, l'étude des mécanismes précis impliqués dans le contrôle de l'infection reste fragmentaire. Les modèles d'infections expérimentales (singe *Saimiri*) ont cependant clairement montré que l'infection par une souche exprimant un antigène variant protégeait contre l'infection ultérieure d'une souche identique, mais pas par une même souche exprimant un autre variant (Fandeur et al. 1995). D'autres études montrent que l'infection répétée par une même variant confère la protection contre un variant hétérologue. Cette protection partielle est celle des enfants de Dielmo. Le modèle établi est donc celui d'une immunité spécifique de souche acquise tôt chez les sujets peu exposés au parasite (Martinelli et al. 2005), qui s'enrichit d'une immunité d'acquisition plus lente et à spectre plus large par réactions croisées contre sérotypes proches. Ainsi, l'étendue et la prévalence de la diversité antigénique locale est importante pour l'acquisition d'une immunité protectrice.

▪ **L'immunité innée généraliste :**

L'existence d'une immunité innée généraliste qui régulerait les densités parasitaires dans les infections multiples et mixtes a suscité une controverse après la publication des résultats de l'étude longitudinale menée par Bruce et al. (2000) à Madang, Papouasie-Nouvelle-Guinée (Bruce et al. 2000a ; Snounou 2004). Bruce et al. (2000) observent d'une part que malgré le renouvellement rapide des génotypes et des espèces infectantes dans le sang périphérique des enfants, caractéristique des dynamiques de l'infection en zone de forte endémie, la densité globale de l'infection évolue autour d'un seuil constant de 1000 parasites/ μ l de sang ; et d'autre part, que l'infection par les espèces *P. falciparum* et *P. vivax* est non-aléatoire : dans les infections mixtes, les pics de parasitémie dus à chacune de ces deux espèces sont séquentiels et n'apparaissent jamais simultanément. Ils en déduisent donc un modèle général de régulation des densités parasitaires par un mécanisme densité-dépendant, général et non-spécifique de souche ni d'espèce, combiné à un mécanisme spécifique de souche. Les auteurs qualifient le mécanisme de régulation densité-dépendante de mécanisme inné de contrôle de l'immunité, par opposition à l'immunité spécifique de souche ou d'espèce qui serait acquise. La densité-dépendance est le fait que la variation de la parasitémie due aux effets cumulés du contrôle immunitaire de chaque génotype infectieux dépend de la densité globale de la population plasmodiale totale. Ce mécanisme rendrait compte selon eux, de la stabilité observée de la densité parasitaire globale couplée à des pics séquentiels de densités pour chaque espèce infectante. L'immunité spécifique quand à elle jouerait son rôle dans le maintien de l'infection à des taux très bas de densités.

La question a cependant été posée des mécanismes moléculaires qui seraient mis en jeu pour l'élaboration d'une telle réponse non-spécifique de court-terme (Snounou et al. 2004). (Bouharoun-Tayoun et al. 1995) ont proposé un mécanisme de clairance densité-dépendant via l'activation des monocytes pour rendre compte des mécanismes immuns en jeu dans le phénomène de l'infection chronique.

2.3 Multiplicité de l'infection et évolution de la virulence

Certaines études menées en zones de transmission intense au Sénégal et en Tanzanie ont associé la richesse clonale de l'infection au statut clinique de l'hôte, les infections asymptomatiques étant plus riches en géotypes que les infections symptomatiques, et étant prédictives d'un risque réduit d'accès clinique (Bereczky et al. 2007). Dans d'autres contextes (Soudan, Tanzanie, Ndiop au Sénégal ou Kilifi au Kenya), cet effet du statut clinique de l'hôte n'est pas observé, la tendance inverse étant rapportée : les accès cliniques seraient plus souvent composés de plusieurs géotypes de *P. falciparum*.

Read & Taylor (2001) ont revu les différentes formes de compétition qui peuvent avoir lieu dans le cadre des interactions intra-hôtes entre haplotypes génétiquement et antigéniquement distincts d'une même espèce de pathogène *Plasmodium*. La théorie de l'évolution de la virulence en relation avec la capacité compétitrice d'une souche de pathogène propose que les lignées de pathogènes les plus virulents ont un avantage compétitif sur les lignées moins virulentes. Dans les contextes où les infections multiples sont communes, les pathogènes évoluent en moyenne vers une virulence accrue. En effet, si la compétition intra-hôte est basée sur l'exploitation d'une même ressource hôte par plusieurs lignées de pathogène, les lignées de pathogène les plus virulentes, i.e. celles qui ont le taux de multiplication le plus rapide, vont avoir un avantage compétitif sur les autres moins virulentes (Gandon et al. 2001 ; Smith et al. 1999c).

Cependant, la question de la relation entre la capacité compétitive intrinsèque d'une souche et sa virulence intrinsèque (i.e. morbidité et mortalité induites chez l'hôte) est restée posée. Si les preuves de la compétition entre souches de *Plasmodium* existent, expérimentalement ou naturellement, la question subsiste de savoir si la compétition favorise les souches les plus virulentes. Une virulence accrue des infections multiples a été montrée expérimentalement dans le modèle rongeur (Snounou et al. 1989), où les infections mixtes (2 géotypes) par *P. chabaudi* étaient plus virulentes pour les souris que les infections monoclonales (Taylor & Read 1998). Une série d'expériences tirant profit de la PCR quantitative en temps réel sur un modèle de *Plasmodium* de rongeur ont été menées pour éclaircir le lien entre compétitivité et virulence (Bell et al. 2006 ; de Roode et al. 2005 ;

Mackinnon & Read 2003). Les résultats ont montré que les souches les plus virulentes étaient effectivement meilleures compétitrices, non pas via un taux de multiplication accrue, mais via une meilleure capacité à continuer à se multiplier dans l'hôte même aux fortes densités parasitaires, malgré la limitation de la ressource hôte et malgré l'immunité croisée entre souches (compétition apparente arbitrée par l'immunité). Cette capacité provient d'une meilleure résistance aux réponses immunes ou bien d'une sélection moins restrictive des globules rouges à infecter.

Néanmoins, d'autres types de compétition sont également possibles pour *P. falciparum*, et notamment, comme le suggèrent Read & Taylor (2001), la compétition apparente entre clones : un clone qui prend le dessus dans une infection induit une réponse immune dirigée également contre les autres clones de densités plus faibles. En effet, chez les adultes, le portage parasitaire est de mieux en mieux contrôlé, les densités étant réduites sous le seuil de détection microscopique. Les parasites ne sont pas stérilisés, l'individu est porteur sain d'une infection maintenue à très faible taux de multiplication. On parle de chronicité de l'infection, qui caractérise l'état de l'adulte sain et immun à *P. falciparum* dans les zones endémiques. Les densités parasitaires à ce stade ne sont plus corrélées avec la multiplicité de l'infection, ce qui suggère que les densités clonales ne sont pas régulées de façon indépendante au sein des hôtes, et donc l'existence d'une compétition intra-hôte entre les génotypes (Smith et al. 1999d). La mise en place des mécanismes immunitaires de réduction contrôlée des densités augmenterait en outre la durée de l'infection.

La chronicité de l'infection serait elle-même protectrice contre les nouveaux génotypes inoculés au cours de la vie par-dessus les génotypes déjà présents et contrôlés. Cette immunité contre la super-infection (immunité concomitante ou prémunition, i.e. les réponses de l'hôte élicitées par les parasites déjà établis empêchent l'infection par de nouveaux génotypes parasitaires) passerait ainsi par le maintien à bas-bruit d'une infection chronique multiclonale (Sergent & Parrot 1935 cité par Read et al. 2001). Smith et al. (1999d) observent que la stratégie de survie du parasite varie dans les zones de forte endémicité en fonction de l'âge et du statut immun de l'hôte : chez les très jeunes enfants, les infections ne persistent pas longtemps (stratégie du « *get out fast* »). Les génotypes les mieux transmis sont ceux qui se développent le plus rapidement, entraînant une réponse fiévreuse stimulant la production des gamétocytes. Le statut naïf de l'hôte permet un développement rapide de type course à l'exploitation pour transmettre rapidement les stades sexuels, sélectionnant ainsi les génotypes les plus virulents. En revanche, chez les enfants plus âgés et les adultes continuellement exposés au parasite, les infections établies offrent une protection croisée contre les clones invasifs en limitant la super-infection. Les génotypes les mieux transmis

seraient ceux qui sont maintenus à faibles densités et produisent des gamétocytes sur de longues périodes, l'immunité concomitante partiellement *trans*-protective étant un mécanisme qui permettrait aux clones de réserver la ressource hôte pour eux en empêchant l'infection par des clones compétiteurs. La stratégie du parasite vise à éviter la réponse fiévreuse, la compétition serait de type « compétition apparente » décrite ci-dessus, sans sélection pour la virulence.

La distinction à opérer entre les infections qui provoquent des phases aiguës de multiplication des densités (hôtes naïfs) et les infections chroniques a été soulignée également par Bell et al. (2006) sur leur modèle de rongeur pour tester la relation entre la virulence d'un clone et sa capacité compétitrice. Les résultats mettent en lumière le rôle du système immunitaire dans l'interaction entre les clones de *Plasmodium*, via une distinction à établir entre deux types d'infections, qui sélectionneraient différemment pour la virulence : (i) les phases d'infections aiguës sélectionnent effectivement pour une virulence accrue, via un succès compétiteur plus élevé des souches les plus virulentes (domination numérique), la compétition est de type suppressive ; l'immunité pendant la phase aiguë étant une immunité croisée entre souches ; (ii) les infections multiples chroniques : elles sélectionnent pour une compétition facilitatrice entre souches, et la réponse immune mise en place est spécifique de souche.

Ainsi, suivant les conditions de la transmission, la nécessité de persistance des clones sous formes d'infections chroniques pendant la saison sèche, ou bien suivant le statut immun de l'hôte, la compétition entre clones dans les infections multiples sélectionne ou non pour une virulence accrue des souches (Smith et al. 1999d ; Bell et al. 2006). Cependant ces questions de la virulence sont plus complexes, car elles impliquent également l'hôte vecteur et les dispersions relatives des hôtes vecteurs et humains à l'échelle des sites de transmission (Elliott et al. 2003).

2.4 Relation entre le taux d'inoculation entomologique (h) et l'infection à *P. falciparum*

2.4.1 Fréquence des piqûres infectées et multiplicité

- **La relation n'est pas linéaire :**

La question plus particulière de la relation à établir entre le nombre de génotypes composant une infection à *P. falciparum* chez l'homme (et donc chez le vecteur ?) et l'intensité de la transmission palustre estimée à partir du taux d'inoculation entomologique (*h*) est importante car elle détermine la structure des populations de *P. falciparum* dans les zones

endémiques. Le nombre de génotypes génétiquement distincts présents au sein des infections parasitaires conditionne en effet la possibilité de recombinaison entre génomes différents au sein du vecteur (Anderson et al. 2000b ; Dye 1991).

La complexité de l'infection des sujets asymptomatiques reflète l'accumulation de souches qui ont passé le stade pré-érythrocytaire et ont commencé le cycle érythrocytaire. Les infections multiples résulteraient ainsi (i) d'une piqûre unique par un moustique infecté contenant plusieurs sporozoïtes de génotypes distincts (il existe une grande diversité génétique dans la mise en culture d'un isolat sanguin infecté par une seule ou un nombre très limité de piqûres de moustique (Druilhe et al. 1998 ; Thaithong et al. 1984)) ; (ii) ou bien d'inoculations successives par plusieurs moustiques, sans que les génotypes présents antérieurement aient été éliminés par les mécanismes immunitaires (super-infection) (Nassir et al. 2005).

On envisage donc aisément à première vue que la fréquence des piqûres infectantes reçues par un individu conditionne la probabilité pour cet hôte d'héberger des parasites génétiquement distincts. Arnot (1998 ; 2002) a ainsi relié directement l'intensité de la transmission dans un site, mesurée par le taux entomologique d'inoculation (h), et la fréquence des infections multiples chez l'homme, et note que le nombre moyen de parasites génétiquement distincts par hôte augmente bien avec l'augmentation de h , mais moins que linéairement. En effet, dans le village de Ndiop au Sénégal, bien que le polymorphisme allélique des marqueurs soit similaire à celui de Dielmo, la transmission y est suffisamment plus basse pour que la cinétique d'acquisition de l'immunité par les hôtes diffère entre les deux sites. La multiplicité des infections y est deux fois inférieure à celle de Dielmo, et ne diminue pas avec l'âge des hôtes (Zwetyenga et al. 1998).

Récemment, Takala et al. (2007) ont montré un effet de la saison de transmission sur la multiplicité estimée par séquençage du bloc-19 de *m*sp-1 au Mali : le nombre de génotypes est plus élevé au début de la saison et diminue ensuite pendant la saison de transmission, particulièrement dans les deux classes d'âge les plus jeunes. Ces classes seraient ainsi plus immédiatement sensibles aux variations à court-terme dans la fréquence des piqûres que les classes plus âgées. L'acquisition d'une immunité qui autorise le portage chronique d'infections à long-terme, protectrices, chez les plus âgés, tamponnerait en quelque sorte les effets des variations à court-terme de la fréquence des piqûres reçues sur la diversité de l'infection clonale.

Cependant, si la multiplicité de l'infection semble effectivement augmenter avec l'intensité de la transmission, le nombre moyen de clones par homme atteint rapidement un palier pour les fortes valeurs de h , comme c'est le cas par exemple en Tanzanie, où des taux

d'inoculation de plus de 1000 piqûres/homme/an génèrent une complexité moyenne de 3 génotypes distincts par homme (Hill et al. 1995). Les taux d'infection mesurés par Anderson et al. (2000b) au Brésil (prévalence parasitaire de 0.1%) génèrent tout de même une infection multiple chez 10% des personnes infectées. L'existence d'un seuil dans la diversité clonale intra-hôte suggère que celle-ci est régulée, par une régulation densité-dépendante, et/ou par l'existence de compétitions entre les clones (compétition suppressive ; Read & Taylor 2001).

A l'autre extrémité, même des contextes de transmission très faibles peuvent générer des infections multiples. Paul et al. (1998), dans l'objectif de déterminer la multiplicité des infections palustres en zones de très faible endémie, ont mesuré une moyenne de 1,67 génotypes par individu en Thaïlande, avec 68% (<15 ans) et 77% (>15 ans) d'infections multiples pour un taux annuel d'inoculation inférieur à 1 piqûre infectante/individu. (Luxemburger et al. 1996) mesurent une multiplicité très forte de 3,6 génotypes moyens/hôte pour un h très faible de 0,8 dans un camp à la frontière Thaïlande-Myanmar. Paul et al. (1998) soulignent le rôle de la migration (flux de gènes) dans l'apport de diversité ainsi que le rôle du traitement par la chloroquine en zone de résistance, qui augmente la probabilité d'infections recrudescentes et la durée de l'infection. Les infections dureraient ainsi assez longtemps pour se chevaucher avec les nouvelles infections à la saison suivante de la transmission.

Un tel mécanisme de création de la multiplicité par superinfection grâce à une augmentation de la durée de l'infection a été observé plus récemment par Nassir et al. (2005) au Soudan, où de la même façon, 10 à 47% des infections sont multiples alors que la transmission est faible et très saisonnière (moyennes de 1,3 à 1,9 génotypes/hôte en saison sèche et humide). Les auteurs observent que la multiplicité de l'infection augmente significativement la durée de l'infection par les stades asexués, mais également la persistance de la production des stades sexués à travers la saison sèche. Plus récemment, Rohr (2006) a montré qu'une majorité des infections polyclonales de la frontière Thaï-Myanmar étaient créées par la piqûre unique de moustiques infectés par un grand nombre d'haplotypes sporozoïtes distincts.

▪ **D'autres facteurs influencent la multiplicité :**

Comme on l'a vu, l'issue d'une infection par *P. falciparum* chez l'homme est déterminée par la conjonction de nombreux facteurs, parasitaires et humains, qui vont déterminer l'exposition au parasite et la susceptibilité innée et acquise des hôtes humains. Ainsi, les facteurs du sang, tels que le génotype de l'hémoglobine (thalassémies, anémie falciforme), les mesures de protection (utilisation de moustiquaires imprégnées, chimioprophylaxies : Robert et al. 1996a), ou les interventions pour le contrôle de la maladie

(vaccin : Beck et al. 1997 ; Haywood et al. 1999), vont influencer la multiplicité de l'infection via une réduction de la fréquence des piqûres, et donc une diminution du spectre et de la charge de l'infection.

2.4.2 Quelle relation entre le taux d'inoculation (h) et la force de l'infection chez l'homme ?

Comprendre les relations qui existent entre les deux paramètres fondamentaux h , taux d'inoculation entomologique, et l'infection chez l'homme mesurée par la prévalence parasitaire, est essentiel pour comprendre les conséquences de la mise en place des stratégies de lutte antivectorielle visant à réduire le taux entomologique d'inoculation sur l'efficacité de la lutte antipalustre dans les zones de forte transmission. Cette question est primordiale particulièrement dans les zones où, grâce à la prémunition, l'exposition régulière des populations aux parasites représente en fait le meilleur gage de leur protection.

La relation entre le taux d'inoculation entomologique (h) et la prévalence parasitaire (PR) est complexe et non-linéaire, et les premiers modèles établis pour établir la relation entre h et PR dans un contexte donné de transmission (Macdonald 1957 ; Molineaux & Gramiccia 1980) ne fonctionnaient pas en zones de savane. Beier et al. (1999) analysent la relation entre ces deux paramètres dans 31 sites en Afrique, la majorité des sites montrant une relation linéaire entre eux. Mais les faibles niveaux de transmission ($h < 5$) sont associés à des niveaux de prévalence supérieurs à 40%, alors que celle-ci plafonne au dessus de 80% à partir d'un taux de piqûres supérieurs à 200. Ces relations persistent dans les différents contextes écoclimatiques africains. En conclusion, cette étude montre qu'une réduction drastique du taux d'inoculation entomologique (< 1 piqûre infectante/homme/an) doit être atteinte pour réduire significativement la prévalence.

Un modèle a été proposé pour comprendre les rôles respectifs des différents facteurs influençant cette relation à partir d'un jeu de données de 91 paires de mesures du h et du PR associé chez des enfants africains de moins de 15 ans (Smith et al. 2005a), avec les conclusions suivantes :

- (i) L'immunité, définie comme un état temporaire de résistance aux nouvelles infections, ne joue pas un rôle important sur les prévalences parasitaires pendant l'enfance ;
- (ii) L'hétérogénéité du comportement de piqûre du moustique (choix non-aléatoire des hôtes) ou - hypothèse privilégiée - l'hétérogénéité de la susceptibilité à l'infection suivant les individus, influe majoritairement sur la PR ;

- (iii) Selon leur modèle, les nouvelles infections seraient fortement agrégées, par une forte hétérogénéité intrinsèque de la susceptibilité entre individus, avec 20% des individus concentrant 80% des nouvelles infections ;
- (iv) Enfin, leur conclusion appuie les hypothèses selon lesquelles mêmes de fortes réductions du h n'auraient qu'un effet mineur sur les réductions des prévalences parasitaires humaines.

La première conclusion va à l'encontre de l'hypothèse classique selon laquelle l'immunité contre la parasitémie périphérique est mise en place après des infections répétées. Cependant, la prise en compte de la mise en place progressive de l'immunité avec l'augmentation de h (i.e. l'impact de l'augmentation de la transmission sur la diminution de la susceptibilité aux nouvelles infections avec l'âge) pourrait également expliquer le modèle (Filion et al. 2006). Selon ces auteurs, la prévalence, mesure ponctuelle, n'est pas un indice satisfaisant pour prendre en compte la progressivité de la mise en place des mécanismes immuns durant l'enfance. En fait, ils soulignent toute la difficulté de la mise en place de tels modèles formalisant les relations entre l'épidémiologie et l'immunité, et les dynamiques de la transmission palustre, à cause de l'hétérogénéité des contextes de transmission, et de la compréhension encore très incomplète des mécanismes d'acquisition de l'immunité dans ces différents contextes.

2.4.3 Relation entre le taux d'inoculation (h) et l'infectivité des populations humaines pour les vecteurs

Killeen et al. (2006) ont relié à partir des données de la littérature le taux d'inoculation entomologique (h) avec l'infectivité des populations humaines (κ), ce dernier paramètre étant estimé : (a) par infections expérimentales de vecteurs d'insectarium sur des individus pris au hasard dans la population étudiée ou sur des porteurs de gamétocytes ; ou (b) en mesurant les taux d'infection de la population vectorielle, par les indices oocystique ou sporozoïtique. D'autres estimateurs plus élaborés de l'infectivité de la population humaine pour les vecteurs ont été obtenus par les taux d'infection en ookinètes, les courbes de prévalence sporozoïtiques âge-spécifique, ou le taux d'accumulation des sporozoïtes dans une population vieillissante de vecteurs. Trente-sept sites sont répertoriés en Afrique et Papouasie-Nouvelle-Guinée, tous situés en zones de forte transmission. Les résultats du modèle mis en place, qui suppose une relation proportionnelle entre parasitémie et gamétocytémie, montrent que la relation entre h et κ est très faible pour les valeurs de $h > 10$, et confirme que les valeurs de h devront être

réduites drastiquement pour avoir un impact sur le réservoir infectieux de la population humaine.

2.5 Les infections mixtes : interactions et dynamiques chez les deux hôtes humain et vecteur

2.5.1 Prévalences des Plasmodium humains

Les quatre espèces de *Plasmodium* humains sont transmises par les vecteurs et infectent l'homme en Afrique sub-saharienne. La présence de ces espèces dans le sang humain a été longtemps estimée par observations microscopiques de frottis sanguins. La comparaison des diagnostics utilisant cette méthode et les techniques récentes de diagnostic moléculaire basées sur l'utilisation de la PCR (Kasehagen et al. 2006 ; McNamara et al. 2004), qui permet la détection de densités 100 fois plus faibles, ont montré une sous-estimation des prévalences réelles des 4 espèces plasmodiales avec le diagnostic visuel, particulièrement pour les deux espèces *P. malariae* et *P. ovale*.

En dehors de *P. falciparum*, espèce majoritaire en Afrique et dans le monde (>90% des infections chez l'homme), l'espèce *P. malariae* est communément distribuée dans toutes les régions endémiques palustres africaines, ses prévalences chez l'homme basées sur le diagnostic moléculaire pouvant atteindre ~40%, le pic de prévalence étant atteint pour la même classe d'âge que *P. falciparum* (<10 ans) (Molineaux & Gramiccia 1980 ; Trape et al. 1994). L'espèce *P. ovale* serait moins largement répandue que *P. malariae*, avec des prévalences plus faibles (pic chez les <10 ans), variant de 2% à plus de 10% (Mueller et al. 2007). L'infection sanguine à *P. ovale* étant de courte durée avec une faible parasitémie, l'incidence réelle des cas est probablement sous-estimée. Au Sénégal, 40% des patients ont été infectés à *P. ovale* en 4 mois (Trape et al. 1994). L'espèce *P. vivax* est également présente en Afrique, où elle représente 3-5% des cas dans les zones peuplées par des populations d'origine non mélando-africaines : Afrique du Sud, Afrique de l'Est et Madagascar (absence de l'antigène Duffy en Afrique de l'Ouest et Centrale).

La coexistence entre les différentes espèces n'est pas neutre. Ces espèces diffèrent dans leurs traits d'histoire de vie, leur biologie, leur distribution, leur stratégie de transmission. La différence inter-espèce dans la préférence érythrocytaire (voir chapitre Système biologique) a suggéré l'existence de pressions sélectives résultant d'une compétition intra-hôte pour la colonisation de différentes niches (Paul et al. 2003). De plus, de nombreux facteurs tels que la durée du cycle sporogonique, l'existence ou non d'une phase de latence dans le foie, la rapidité de la multiplication asexuée et de la production des stades

transmissibles chez l'homme, ainsi que les différences de susceptibilité et les variations de densités des populations vectorielles, vont fortement influencer l'épidémiologie des différentes espèces plasmodiales chez l'homme et chez le vecteur.

2.5.2 Interactions chez l'homme

De nombreuses observations ont suggéré l'existence de mécanismes d'interactions entre les espèces plasmodiales. Largement sous-estimées, elles ont lieu en grande majorité chez l'homme, où le parasite passe la majeure partie de son cycle (Snounou & White 2004 ; Zimmerman et al. 2004). La comparaison du nombre d'infections mixtes avec le nombre attendu sous l'hypothèse d'aucune interaction étant données les prévalences de chaque espèce a montré un déficit ou un excès des infections mixtes observées. En fonction des espèces plasmodiales majoritaires présentes dans un contexte donné de transmission, les interactions entre les espèces se modifient : en Asie du Sud-Est, ce sont les co-infections *P. vivax*/*P. falciparum* qui sont très fréquentes, avec 1/3 des patients positifs pour *P. falciparum* qui le sont également pour *P. vivax* en Thaïlande ; en Afrique, les corrélations négatives (par exemple à travers la compétition apparente entre espèces) sont observées avec le couple *P. falciparum*/*P. vivax*, alors que le couple *P. falciparum*/*P. malariae* est corrélé positivement (McKenzie & Bossert 1997b ; Molineaux & Gramiccia 1980 ; Snounou & White 2004). Dans d'autres contextes de transmission, comme en Papouasie-Nouvelle-Guinée (PNG), ces corrélations positives ou négatives ne sont pas observées, la composition des infections mixtes y étant aléatoires (Mueller et al. 2007).

Les préférences érythrocytaires de chacune des espèces de *Plasmodium* infectant l'homme vont jouer un rôle majeur sur leurs interactions intra-hôtes : l'évolution de l'infection et ses conséquences chez l'homme font varier les proportions des différents types de globules rouges et donc la ressource-hôte pour les différentes espèces (Paul et al. 2003 ; Reece et al. 2005). Les épisodes d'infection chez l'homme par chaque espèce seraient de plus séquentiels. L'espèce *P. falciparum* est ainsi observée pendant la saison de transmission, peut-être favorisée par son taux de croissance supérieur à celui de *P. malariae* (48 heures au lieu de 72), et laisse la place à *P. malariae* en saison sèche (Molineaux & Gramiccia 1980 ; voir également Bruce et al. 2000a pour le suivi longitudinal des interactions *P. falciparum*/*P. vivax* au sein d'infections mixtes en PNG montrant une alternance des pics de densités entre les deux espèces).

Enfin, le renouveau récent de l'intérêt porté à l'étude des infections mixtes a été aussi suscité par l'observation des conséquences cliniques de telles infections. Dans certains contextes de transmission, la co-infection avec *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale* offre une

protection croisée qui diminue la virulence de l'infection à *P. falciparum* (Luxemburger et al. 1997 cité par Paul et al. 2003) : le risque d'anémie diminue, ainsi que le portage de gamétocytes, avec une réduction de l'infectivité ; le nombre de génotypes de l'infection à *P. falciparum* serait également diminué en présence de *P. vivax*. Ainsi, une méthode de contrôle focalisée sur une seule espèce de parasite pourrait aggraver le tableau clinique de l'infection à *P. falciparum*.

2.5.3 Interactions chez le vecteur

Les infections mixtes et les interactions entre espèces dans les populations vectrices naturelles sont moins décrites, mais néanmoins primordiales pour la compréhension de l'épidémiologie des différentes espèces, par exemple dans la perspective de l'évaluation des conséquences du contrôle vectoriel sur la distribution de ces espèces (Boete & Paul 2006 ; McKenzie & Bossert 1997a). Le diagnostic de l'infection chez le vecteur a été largement mené par la méthode ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Absorbant Assay*). Une étude a montré des prévalences de l'ordre de 1-5% pour *P. malariae* et 0,4-20% pour *P. ovale*, les prévalences étant supérieures chez le vecteur pour cette dernière espèce (Arez et al. 2003 ; Dibaya 2005 ; Marques et al. 2005). La probabilité de telles infections pour les vecteurs augmente avec l'âge de la population vectrice (McKenzie & Bossert 1997a). La biologie (longévité), le comportement et la compétence vectorielle des anophèles sont très variables, et dépendent des facteurs environnementaux. Ainsi, des mesures de contrôle visant la réduction de la longévité des vecteurs auraient d'abord un impact sur les espèces parasitaires à cycle long comme *P. malariae*. Les différences de susceptibilité et de compétence vectorielle auront un impact similaire, en autorisant ou non le développement complet des différentes espèces de *Plasmodium* humains.

2.6 Transmission de *P. falciparum* de l'homme vers le vecteur : les gamétocytes

La transmission du parasite par les anophèles vecteurs débute par l'aspiration des formes sexuées matures du parasite, les gamétocytes, circulants dans le sang périphérique chez l'homme. Le pic de production des gamétocytes de *P. falciparum* survient 9 à 10 jours après le pic de densité des stades asexués dans le sang périphérique, c'est à dire après la mise en place d'une réponse immune dirigée contre ces stades, et après un éventuel traitement des signes cliniques. Il y a donc sélection des gènes de résistance chez ce parasite, contrairement à *P. vivax* par exemple, où les gamétocytes sont produits peu avant les signes cliniques, ce qui

leur évite la pression médicamenteuse (Day 1999 ; Paul et al. 2004 ; Sutherland et al. 2002a).

Les prévalences et les densités des stades sanguins asexués et gamétocytes dans les zones de paludisme stable endémique diminuent avec l'âge et la mise en place d'une immunité non-stérilisante (Molineaux & Gramiccia 1980). De plus, la rareté de l'observation des stades sexués par rapport aux stades asexués dans le sang périphérique semble contredire le succès de la transmission palustre dans les conditions naturelles. Taylor & Read (1997) ont proposé d'expliquer ces densités très faibles de stades transmissibles par l'action de la sélection naturelle ou l'action de mécanismes immuns spécifiques. Les progrès dans le diagnostic moléculaire des gamétocytes ont résolu ce paradoxe (Abdel-Wahab et al. 2002 ; Menegon et al. 2000) : il y a de très nombreux réservoirs de gamétocytes chez les individus en zones d'endémies mais présents en densités indétectables au microscope. Dans les zones de transmission instable et saisonnière, ces infections gamétocytaires sub-patentes et persistantes permettent au parasite d'attendre la reprise de la transmission au retour des moustiques lors de la prochaine saison des pluies (40% des individus infectés dans un site de transmission saisonnière au Soudan ont retenu leurs infections gamétocytaires jusqu'à 7 mois). De plus, la multiplicité des infections prolongerait la longévité des gamétocytes dans le sang périphérique (Nassir et al. 2005). La diversité des infections naturelles favoriserait ainsi la transmission du parasite, et éventuellement sa recombinaison dans le vecteur (Sutherland et al. 2002b).

Il existe d'autre part des seuils minimum et maximum de densités des gamétocytes matures dans le sang humain, en deçà ou au delà desquels la proportion de vecteurs infectés décolle ou ne progresse plus, respectivement (Paul et al. 2007). L'existence d'un seuil maximal au succès de la transmission est interprétée comme la conséquence de la mise en place chez l'hôte d'une immunité bloquant la transmission, provoquée par la réponse fiévreuse consécutive à la multiplication incontrôlée des stades asexués dans le sang.

L'identification du réservoir de gamétocytes et des facteurs qui déclenchent la transmission homme-moustique est déterminante pour la compréhension de l'épidémiologie de la maladie par son impact sur le recrutement vectoriel. Plusieurs études ont montré que les adultes (>15 ans) seraient le réservoir de gamétocytes infectieux dans les zones de fortes transmission (Drakeley et al. 2000 ; Takala et al. 2007). Paul et al. (2004), ont émis l'hypothèse que l'augmentation soudaine de la fréquence des piqûres par les moustiques non-infectés parallèlement à l'augmentation de leurs densités avec le démarrage de la saison des pluies déclencherait la transmission homme-moustique du parasite. L'observation de la transmission dans les zones tempérées (émergence printanière de *P. vivax* et des *Plasmodium* aviaires) et dans les zones de paludisme instable épidémique (épidémies saisonnières et

régionales) ont suggéré que la pression répétée des piqûres culicidiennes concomitantes à l'arrivée saisonnière des pluies serait le signal du déclenchement de la gamétocyto-genèse chez une fraction de la population qui deviendrait très infectante pour les vecteurs anophèles, initiant ainsi la transmission palustre dans ces régions. Une étude menée sur les parasites de rongeurs *P. chabaudi* et *P. vinckei* n'a cependant pas permis de relier l'augmentation des piqûres de moustiques avec la gamétocyto-genèse (Shutler et al. 2005).

Les travaux sur la détermination du sexe et le sex-ratio chez *P. falciparum* (Paul et al. 2002a ; Read et al. 1992 ; Shutler et al. 2005) ont cependant permis de montrer que la production des gamétocytes par le parasite est adaptative et de préciser les signaux déclencheurs de la gamétocyto-genèse : (i) anémie (qui déclenche la production d'érythropoïétine et des réticulocytes), stress immunologique (mise en place d'une immunité bloquant la transmission provoquant l'agrégation des gamétocytes mâles entre eux), et traitement : le parasite s'adapte ainsi et assure sa transmission quand l'environnement érythropoïétique devient néfaste ; (ii) hyperparasitémie liée à l'accès palustre (environnement parasitaire) ; et (iii) la piqûre de moustique : les piqûres augmenteraient la prévalence des gamétocytes en zones de transmission saisonnière (Paul et al. 2004).

3 Conclusion

L'objet de cette Première partie était de mettre en avant les éléments-clés de la transmission et de l'épidémiologie du parasite *P. falciparum* qui vont influencer la distribution, la diversité et la structure génétiques des populations naturelles du parasite chez ses deux hôtes homme et moustique en Afrique. Les traits d'histoire de vie et de comportement des vecteurs (biologie, dispersion, préférences et comportements trophiques, compétence vectorielle) vont déterminer les patrons du recrutement et de la transmission du parasite par le vecteur. La variation des modalités du recrutement parasitaire et de la compétence vectorielle entre espèces vectrices hôtes va influencer la distribution de la variabilité génétique parasitaire au sein et entre les espèces vectrices. L'impact de l'habitat hôte vecteur sur la structuration génétique des populations naturelles du parasite dépend de tous ces facteurs.

En retour, les paramètres de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme (infections multiples et mixtes, nombre de génotypes parasitaires co-infectants par hôte, interactions entre génotypes et entre espèces plasmodiales au sein de l'hôte, modalités de la production des gamétocytes, dynamiques) et leur variation en fonction du contexte de la transmission palustre, vont influencer des traits essentiels de l'histoire de vie du parasite, comme le régime

de reproduction chez le moustique, et ainsi la distribution de la variabilité génétique du parasite au sein et entre les individus hôtes humains et moustiques en Afrique. L'impact des différents niveaux de structure de la population parasitaire (individu, sous-populations, site) aux différentes échelles (locale et régionale) sur la distribution de la diversité génétique de *P. falciparum* fera l'objet de la Seconde partie.

PARTIE 2 : STRUCTURATION GENETIQUE DE PLASMODIUM FALCIPARUM EN AFRIQUE

1 Bases théoriques générales de l'étude de la structure des populations parasitaires

Les agents pathogènes et leurs vecteurs sont des organismes dont la biologie, l'écologie, les traits d'histoire de vie comme le mode de reproduction et la taille des populations, sont difficile voire impossible à observer par les méthodes directes telles que les méthodes de marquage-lâcher-recapture. L'utilisation de marqueurs génétiques répartis dans le génome de ces organismes, et l'analyse de leurs caractéristiques dans le cadre des théories de la génétique des populations permet un accès indirect à l'étude de la distribution de l'information génétique au sein et entre les populations de parasites, et permet donc l'étude du fonctionnement des interactions entre les parasites et leurs hôtes.

Les populations naturelles d'organismes vivants ne sont pas distribuées de façon homogène sur leur aire de répartition : elles sont subdivisées en sous-populations géographiquement séparées. Pour les parasites, les populations naturelles sont fragmentées dans les individus hôtes, dont les populations sont elles-mêmes distribuées dans l'espace et dans le temps. Parmi les modèles formalisant le fonctionnement de populations structurées, nous nous intéresserons au modèle en île de Wright (1931) qui a fourni les bases théoriques de notre analyse. Dans ce modèle, une population est subdivisée en n sous-populations de N individus dont une proportion m provient de l'extérieur (migrants) et $(1-m)$ est autochtone. A chaque génération chaque population meurt en envoyant une infinité de propagules dans le milieu. Chaque sous-population est recolonisée avec m migrants et $(1-m)$ résidents. A chaque génération, chaque sous-population est constituée de $N \times m$ migrants et $(1-m) N$ résidents. Les migrants proviennent aléatoirement de chacune des n sous-populations, n étant très grand.

1.1 Distribution de la variabilité génétique entre les différents niveaux de structure d'une population

1.1.1 Distribution des gènes dans l'espace et dans le temps

Si on considère une population d'individus appartenant à une espèce diploïde et se multipliant par reproduction sexuée, et au sein de cette population, un gène situé à un locus quelconque pour lequel existent deux allèles, A ou a . Au sein de chaque population d'effectif

N , on a une population de $2N$ allèles, soit A , soit a . Ces allèles sont associés en sous-groupes hiérarchisés (i.e. « emboîtés » les uns dans les autres). Le premier niveau de la hiérarchie est l'individu dans lequel deux allèles sont associés. Si les individus sont regroupés ensuite par classes, on crée des niveaux hiérarchiques supérieurs. Ainsi les populations naturelles sont souvent subdivisées en sous-populations géographiquement séparées.

L'individu et la sous-population sont les deux facteurs qui sont susceptibles d'influencer la distribution des allèles dans le modèle évoqué. La mesure de l'effet de ces deux facteurs revient à estimer la corrélation entre allèles (i) au sein des individus et (ii) entre individus au sein des sous-populations (Hartl & Clark 1997).

Pour estimer l'effet du facteur individu, on peut comparer la probabilité de tirer au sort deux allèles identiques dans un même individu, notée Q_1 , à la probabilité de tirer deux allèles identiques dans deux individus différents de la même sous-population, notée Q_2 (Cockerham & Weir 1987). Si le facteur individu n'a pas d'effet sur la distribution des allèles (hypothèse nulle), $Q_1=Q_2$. On procède selon le même principe pour estimer l'effet du facteur sous-population : on compare la probabilité de tirer au sort deux allèles identiques dans deux individus d'une même sous-population (Q_2), à la probabilité de tirer deux allèles identiques dans deux sous-populations différentes, notée Q_3 .

La génétique des populations est donc l'étude des facteurs de variation de la distribution des allèles. Ces facteurs peuvent être des facteurs de variation spatiale évoqués ci-dessus, mais aussi des facteurs provoquant un changement dans le temps de la distribution des allèles, c'est-à-dire l'évolution.

1.1.2 Effet du facteur individu sur la variabilité génétique

- **Régime de reproduction et hétérozygoties :**

Dans le schéma hiérarchique à deux niveaux précédent, les allèles A et a sont associés dans les individus eux-mêmes regroupés en sous-populations. La population dans son ensemble est une population de sous-populations, ou métapopulation. Les allèles sont associés deux par deux dans les individus d'une sous-population lors de la fécondation. S'il n'y a pas de corrélation entre les allèles au sein des individus, c'est que l'association des deux allèles de chaque individu a lieu au hasard, c'est-à-dire que les deux gamètes se rencontrent de façon aléatoire lors de la fécondation. Ce régime de reproduction est appelé panmixie : les allèles présents dans les individus d'une génération donnée sont issus d'un tirage aléatoire des allèles présents dans les individus de la génération précédente. Dans un tel régime, le taux

d'hétérozygotes attendu H_E est obtenu facilement en fonction des fréquences alléliques p et q des allèles A et a respectivement, dans la sous-population j :

$$H_E = 2pq$$

La structure génétique d'une sous-population dans laquelle on observe un tel taux d'hétérozygotes est dite structure de Hardy-Weinberg (Hardy 1908, Weinberg 1908, cités par Hartl & Clark 1997). S'il existe une corrélation entre les allèles au sein des individus, un écart à ce taux d'hétérozygotes est observé. Biologiquement, un tel écart est lié à un régime de reproduction non-panmictique. On formalise cet écart à la panmixie par une variable supplémentaire, notée F , indice de fixation, telle que :

$$H_0 = H_E (1-F) = 2pq (1-F) \quad \text{avec} \quad H_0 : \text{hétérozygotie observée} \\ \text{et } F \in [-1 ; 1]$$

Si F est positif, il existe un déficit en hétérozygote par rapport à la panmixie. Si F est négatif, il y a un excès d'hétérozygotes observés par rapport aux proportions attendues dans le cadre d'un régime panmictique sous les conditions de Hardy-Weinberg. F quantifie donc l'écart des proportions génotypiques observées par rapport aux proportions attendues sous l'hypothèse d'une union aléatoire des gamètes. Il faut noter que seules les fréquences *génotypiques* sont modifiées par le régime de reproduction. Le régime de reproduction à lui seul n'est pas une force évolutive, car il ne provoque pas de modifications des fréquences *alléliques*. Il peut cependant accélérer l'effet de la dérive génétique.

▪ **Les régimes de reproduction consanguins :**

Dans un régime d'autogamie, les individus se reproduisent par autofécondation (*selfing*). Les individus homozygotes (AA ou aa) produisent des descendants de génotype identique au leur, tandis que les individus hétérozygotes (Aa) produisent 50% d'hétérozygotes à la génération suivante. A chaque génération, le taux d'hétérozygotes est donc diminué de moitié, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que des homozygotes. On a alors $H_0 = 0$ ou $F = 1$.

Le régime de reproduction par autofécondation est un cas extrême de régime endogame ou consanguin (*inbreeding*), où la reproduction a lieu entre individus apparentés, avec pour conséquence le fait que les allèles identiques par descendance (i.e. deux allèles d'un gène d'un individu copies d'un même gène ancêtre) se retrouvent plus souvent qu'attendus au hasard associés dans un même individu. Un tel régime génère un déficit en hétérozygotes au niveau de la sous-population, qui s'amplifie à chaque génération.

Dans le cas où la consanguinité est la seule source possible de déficit en hétérozygote, et si les individus auxquels on s'intéresse sont au stade zygote, F est alors la moyenne arithmétique des coefficients de consanguinité f des individus, f étant la probabilité que deux allèles d'un gène d'un individu soient identiques par descendance. Le paramètre F est alors le coefficient de consanguinité (*inbreeding coefficient*) de la population (Wright 1951), ce qui permet d'estimer S , le taux d'autofécondation.

Comme on l'a vu dans son cycle de reproduction chez l'homme, *P. falciparum* est un parasite hermaphrodite. Comme les *Taenia*, *Echinococcus*, *Fasciola*, il est capable de produire des gamètes mâles et des gamètes femelles à partir de lignées mitotiques génétiquement identiques. Plusieurs auteurs ont calculé le déficit en hétérozygotes généré par un taux d'autofécondation S (Pollak 1987 ; Nordborg & Donnelly 1997 cités par Balloux 2004). Dans leurs modèles, ils supposent qu'une fraction S de gamètes est investie dans l'autofécondation, et une fraction $(1-S)$ dans des croisements panmictiques. Il faut noter que pour les espèces hermaphrodites, cette portion $(1-S)$ inclue une probabilité $1/2N$ pour les gamètes de se reproduire entre gamètes frère-sœurs sans pour autant générer d'écart à la panmixie. Le fait qu'un organisme soit hermaphrodite et puisse s'autoféconder n'implique donc pas nécessairement que ses populations ne soient pas panmictiques. La démonstration montre qu'à l'équilibre on obtient un déficit en hétérozygotes, et un excès d'homozygotes : si $S=0$, on retrouve les proportions de Hardy-Weinberg ; si $S=1$, on a $H_E = 0$, il ne reste aucun hétérozygote, tous remplacés par des homozygotes AA et aa ; si S est compris entre 0 et 1, on obtient un déficit plus ou moins important en hétérozygotes.

Il faut remarquer d'autre part que la signature de l'autofécondation est attendue à tous les locus étudiés, car elle s'exerce à l'échelle du génome entier, ce qui n'est pas le cas pour l'homogamie, où le déficit en hétérozygotes généré n'affecte que les gènes liés au phénotype pour lequel s'effectue la sélection des partenaires.

La clonalité, ou reproduction asexuée, reproduit les individus à l'identique. Elle ne change pas à elle seule les fréquences alléliques d'une génération à la suivante. Cependant, en populations finies, subissant un taux de mutation constant, des excès d'hétérozygotes sont attendus par rapport aux fréquences génotypiques de Hardy-Weinberg (effet Meselson : Welch & Meselson 2000), ainsi que de forts déséquilibres de liaison (Balloux et al. 2003 ; de Meeus & Balloux 2004).

1.1.3 Effet du facteur sous-population sur la variabilité génétique

La subdivision d'une population en sous-populations influence la distribution et l'évolution des allèles. Si on laisse le modèle évoluer, les fréquences alléliques vont évoluer dans les sous-populations sous l'effet de deux forces : la dérive et la migration.

- **La dérive génétique :**

Si on suppose une population initialement panmictique que l'on fragmente en sous-populations totalement isolées (i.e. sans migration d'individus), les fréquences alléliques sont identiques initialement dans toutes les sous-populations. Si elles sont de taille infinie, les fréquences alléliques ne changeront pas (loi des grands nombres).

Cependant, beaucoup de populations ne répondent pas au critère de taille infinie. Dans les populations de taille finie, le tirage aléatoire avec remise que constitue l'échantillonnage gamétique à chaque génération va faire varier les fréquences alléliques d'une génération à la suivante, par simple effet du hasard de l'échantillonnage, autour de la valeur de l'espérance des fréquences alléliques. A terme, la fréquence d'un allèle peut atteindre la fixation (sa fréquence devient égale à 1), ou bien l'allèle peut disparaître de la population (sa fréquence devient nulle). Ce phénomène de dérive des fréquences alléliques est une force majeure de changement des fréquences alléliques. La dérive, c'est-à-dire l'augmentation de la variance des fréquences alléliques, est d'autant plus rapide que le pool initial de gamètes est réduit, c'est à dire que la population est constituée d'un petit nombre d'individus reproducteurs. En l'absence d'autres forces évolutives (mutation, sélection, migration), la dérive génétique diminue et élimine le polymorphisme génétique des populations naturelles.

La dérive est accélérée si la population n'est pas panmictique. Par exemple si le sex-ratio d'une population est différent de 1, la dérive est aussi rapide que si la population n'était pas constituée de N individus, mais de N_e individus, tel que :

$$N_e = 4N_m N_f / N \quad \text{avec} \quad N_m \quad : \text{ nombre de mâles} \\ N_f \quad : \text{ nombre de femelles}$$

N_e est la taille efficace, ou effectif efficace, de la population, généralement inférieur à la taille réelle. En conditions naturelles, le phénomène de la dérive génétique intervient surtout lors d'événements démographiques affectant fortement la taille des populations, comme les goulots d'étranglements (*bottlenecks*). D'autres facteurs, comme la subdivision de la population, vont influencer la dérive : dans le cas extrême d'une population complètement subdivisée (aucun flux de gènes entre les sous-populations), la taille efficace de la population

est infinie, et la diversité génétique est conservée (elle est « gelée » à l'échelle globale, même si à l'échelle locale elle est perdue (de Meeus et al. 2007), voir également (Criscione & Blouin 2005) pour une revue des calculs de N_e dans les populations parasites).

▪ **La migration :**

En général, les sous-populations ne sont pas isolées : elles échangent un certain nombre d'individus migrants entre elles à chaque génération. Chaque migrant apporte avec lui 2 allèles par locus. Cet apport d'allèles contribue à limiter la perte de diversité allélique due à la dérive, jusqu'à atteindre un équilibre entre les deux processus. Un certain nombre de modèles de structure métapopulationnelle ont été conçus pour formaliser cet équilibre qui s'établit entre les sous-populations, dont le plus simple est le modèle en îles de Wright (1931). Dans ce modèle, un nombre infini de sous-populations (les îles), chacune composée de N individus, reçoit à chaque génération un nombre de migrants Nm , m étant la proportion d'individus qui migrent par génération. En l'absence de sélection et de migration et si on néglige la mutation, seule la dérive intervient : à l'équilibre, la fréquence p_i de l'allèle A dans la sous-population i est soit égale à 0 (avec une probabilité $1-p$), soit égale à 1 (avec une probabilité p). La différenciation génétique entre sous-populations est alors maximale, et elle peut être mesurée par la variance des p_i . A l'équilibre :

$$Var_{\max}(p_i) = p(1-p)$$

Si on ajoute de la migration au modèle, celle-ci va s'opposer à la dérive. Si l'on considère une population à l'équilibre, la comparaison de la variance observée des p_i et de la variance maximale des p_i est donc une mesure de l'importance de la migration. Wright (1951) propose donc le paramètre F_{ST} (**F** pour indice de fixation, **ST** pour *Subpopulation in Total*) :

$$F_{ST} = Var(p_i) / Var_{\max}(p_i) = Var(p_i) / p(1-p)$$

Si la variance des p_i est maximale, $F_{ST} = 1$. Inversement, si tous les individus migrent à chaque génération, les fréquences alléliques attendues dans chaque sous-population restent constantes et égales, $F_{ST} = 0$.

Notons que si la structuration en sous-populations n'influe pas sur la distribution des allèles, les p_i sont identiques dans toutes les sous-populations, i.e. la probabilité Q_2 de tirer 2 allèles identiques dans 2 individus différents d'une même sous-population est égale à celle de tirer 2 allèles identiques dans 2 sous-populations différentes (Q_3), et $F_{ST} = 0$.

Si les sous-populations sont différenciées, c'est-à-dire si les p_i ne sont pas tous identiques, alors $Q_2 > Q_3$. Il existe donc dans ce cas une corrélation statistique entre les allèles d'une même sous-population (les allèles portés par deux individus différents d'une même sous-population ont plus de chances d'être identiques par descendance que si tirés au hasard parmi les individus de deux sous-populations différentes). Cette corrélation est mesurée par le F_{ST} , de la même manière que le coefficient F mesurait la corrélation statistique entre allèles d'un même individu.

La migration a donc deux effets suivant l'échelle considérée :

- (i) A l'échelle globale d'un ensemble de populations : la migration limite la différenciation que subissent des populations isolées issues d'une même population originelle. Cette différenciation subie résulte de la dérive génétique, de la mutation, et éventuellement de la sélection si les populations sont soumises à des pressions sélectives différentes.
- (ii) A l'échelle locale, la migration s'oppose aux processus qui entraînent une diminution de la variabilité (dérive)

1.2 Les F-statistiques

Les deux paramètres F et F_{ST} , qui mesurent respectivement l'effet de l'individu et l'effet de la sous-population sur la distribution de la variabilité génétique sont appelés respectivement F_{IS} (**IS** pour *Individual in Subpopulation*) et F_{ST} par Wright (1951). F_{IS} et F_{ST} sont les F -statistiques.

F_{IS} mesure l'écart à la panmixie à l'intérieur des sous-populations :

$$F_{IS} = 1 - H_0/2p_iq_i$$

F_{ST} mesure la différenciation génétique entre sous-populations (écart à la panmixie dû à la structuration entre sous-populations):

$$F_{ST} = \text{Var}(p_i)/pq$$

Ces deux paramètres sont liés à l'écart total à la panmixie par la relation suivante :

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad (\text{Crow \& Kimura 1970})$$

Cette structuration hiérarchique en deux niveaux implique que même si les individus dans les sous-populations se reproduisent de façon panmictique ($F_{IS} = 0$), les fréquences génotypiques dans la population totale peuvent dévier des proportions de Hardy-Weinberg

($F_{IT} = F_{ST} \neq 0$) à cause de la variation des fréquences alléliques entre sous-populations : c'est l'effet Wahlund (Wahlund 1928 cité par Yang 1998).

Ces paramètres peuvent également être exprimés en termes de probabilité d'identité (Cockerham & Weir 1987) :

$$F_{IS} = \frac{Q_0 - Q_1}{1 - Q_1}, \quad F_{ST} = \frac{Q_1 - Q_2}{1 - Q_2}, \quad F_{IT} = \frac{Q_0 - Q_2}{1 - Q_2}$$

Il faut souligner que ces deux paramètres n'ont de sens que pour des gènes non soumis à la sélection ni à la mutation. Ils permettent alors de mesurer effectivement les effets de la dérive et de la migration. La recherche des valeurs de ces paramètres n'est donc pertinente que pour des gènes sélectivement neutres, avec des taux de mutation négligeables. Dans certains cas où le polymorphisme des marqueurs utilisés est très élevé (comme c'est le cas pour les marqueurs microsatellites : Balloux & Lugon-Moulin 2002), le paramètre F_{ST} en donne une mesure imparfaite.

2 Le régime de reproduction de *P. falciparum*

2.1 La reproduction asexuée dans les populations de pathogènes

2.1.1 La clonalité chez les eucaryotes parasites

La reproduction asexuée est définie comme le mécanisme par lequel un individu produit de nouveaux individus génétiquement identiques à leur ancêtre à tous les locus du génome, excepté aux sites qui ont subi des mutations somatiques. D'après cette définition, la reproduction asexuée est donc synonyme de reproduction clonale (de Meeus et al. 2007).

La forme classique de reproduction asexuée implique la division cellulaire par mitose dans les organismes unicellulaires (procaryotes, protistes). Cependant, de très nombreux organismes multicellulaires eucaryotes pratiquent également ce mode de reproduction, suivant en cela plusieurs voies différentes (rhizomes, bulbes et tubéreuses pour les plantes, reproduction agamétique et parthénogenèse pour les animaux). Parmi eux, de nombreux organismes eucaryotes pathogènes incluent de la reproduction asexuée dans leur cycle de vie. De Meeus et al. (2007) proposent de distinguer ainsi les eucaryotes à cycle simple, qui se reproduisent par clonalité non cyclique, et les eucaryotes à cycle complexe, qui alternent des phases de reproduction sexuée et asexuée au cours de leur cycle de vie. Parmi ces derniers, trois types de cycle de vie sont distingués suivant la complexité des différentes phases (Figure 6).

L'importance de la reproduction asexuée chez les eucaryotes a été longtemps négligée, du fait de sa rareté chez les eucaryotes supérieurs (insectes, oiseaux et mammifères), mais un

très grand nombre d'espèces eucaryotes unicellulaires et procaryotes pratiquent ce mode de reproduction (de Meeûs et al. 2007). Parmi eux, des pathogènes uni ou pluri-cellulaires d'une grande importance médicale et économique : paludisme, schistosomiase, trypanosomiase, *Candida*, pucerons, etc. L'importance de l'étude de ce mode de reproduction et de ses conséquences génétiques et évolutives n'est donc pas exclusivement une question d'intérêt théorique.

2.1.2 Conséquences génétiques de la reproduction asexuée

Les conséquences génétiques de la reproduction asexuée sont multiples et variables selon que la clonalité est le seul mode de reproduction ou non de l'organisme considéré et qu'elle concerne des stades polyploïdes ou haploïdes du cycle de vie de l'organisme (Balloux & Lehmann 2003 ; de Meeus et al. 2007 ; Prugnolle et al. 2005a).

Si une lignée d'organismes diploïdes évolue pendant un nombre suffisant de générations sans aucune reproduction sexuelle (sans ségrégation ni recombinaison), alors les allèles de chaque gène vont accumuler des mutations à partir du point où la lignée est devenue asexuée jusqu'à diverger complètement (effet Meselson, Welch & Meselson 2000). Pour les clones totaux, tous les individus sont donc attendus hétérozygotes à tous les locus d'où la notion contre-intuitive d'un polymorphisme supérieur à celui des populations sexuées qui peut être maintenu aux locus individuels dans les populations naturelles clonales. Cette conséquence génétique à long-terme d'une reproduction strictement asexuée n'a été décrite que chez les rotifères bdelloïdes : son absence dans les autres organismes reflète la rareté des asexués stricts ou l'existence de facteurs homogénéisant comme la conversion génique.

Le taux de diversité génétique en soi ne constitue donc pas un indice du taux de recombinaison/clonalité pratiqué par un organisme diploïde. Pour un tel organisme, ce sont plutôt les modalités de la distribution de la diversité au sein des gènes, au sein des individus et sous-populations, et entre individus et sous-populations qui seront informatives.

A court-terme, trois conséquences génétiques majeures de la reproduction asexuée sont attendues :

- (i) Un régime de reproduction majoritairement clonal modifie la distribution génotypique des allèles par rapport à celle qui est attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg, dans le sens d'un déficit en hétérozygotes (endogamie) ou d'un excès si il est associé à la dérive génétique et à la mutation (excès d'hétérozygotes comparé aux fréquences attendues aux locus polymorphes pour les organismes à cycle complexe à plusieurs phases de clonalité (Balloux et al. 2003 ; de Meeus & Balloux 2005 ; Prugnolle et al. 2005a).

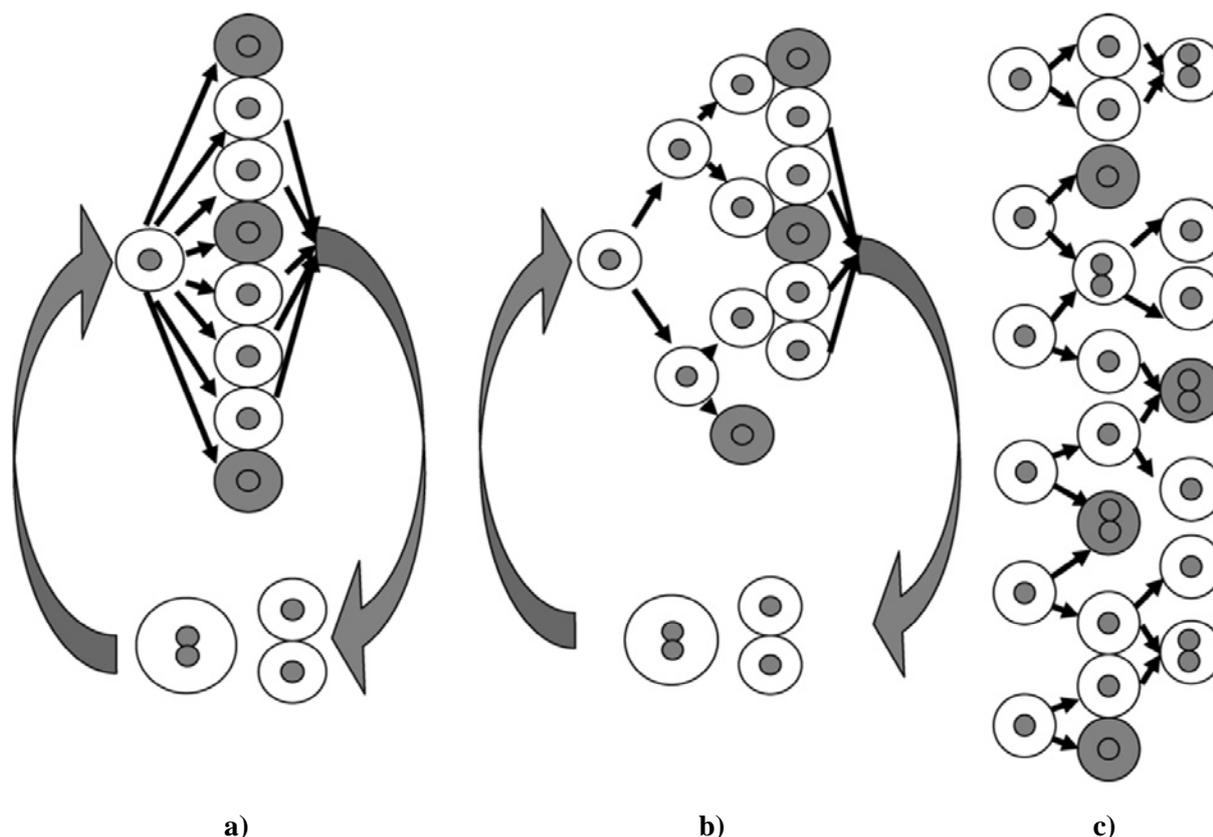


Figure 6. Illustration des trois types de cycle de vie des organismes avec une phase de reproduction asexuée. **(a)** Cycle de vie avec une seule phase de reproduction clonale par cycle ; **(b)** cycle de vie avec plusieurs phases d'asexualité : la phase clonale implique plusieurs générations clonales, comme c'est le cas pour *P. falciparum* ; **(c)** cycle de vie acyclique, i.e. la reproduction sexuée est facultative. Pour les deux cycles a) et b), la phase sexuée intervient à un point du cycle pour former les zygotes diploïdes. (Source : de Meeûs et al. 2007).

- (ii) L'autofécondation entraîne une opportunité réduite de recombinaison, donc le taux effectif de recombinaison entre marqueurs diminue en présence de consanguinité. La différence à l'association aléatoire entre marqueurs génétiquement liés va diminuer à chaque génération proportionnellement au taux effectif de recombinaison. Donc, le degré d'association entre marqueurs, i.e. le déséquilibre de liaison (DL) peut être utilisé pour estimer le taux effectif de recombinaison et donc F_{IS} . Dans les populations totalement asexuées, tout le génome est lié et partage la même histoire évolutive : la sélection à un locus entraînera tout le reste du génome avec elle par auto-stop (*hitch-hiking*). La rareté des événements de recombinaison permet donc à ces populations de conserver les associations de locus qui leur sont favorables (ou défavorables), avec un impact majeur pour les parasites sur la dissémination des résistances aux agents biocides (Hastings 2006).

- (iii) La présence de génotypes multilocus identiques dans une population est un signe caractéristique des organismes clonaux (Criscione & Blouin 2006 ; de Meeus et al. 2007). A l'inverse, si l'espèce pathogène est sexuelle (i.e. subit fréquemment la recombinaison), le génotype multilocus de la lignée sera instable et bientôt dilué dans le pool de gènes commun à l'espèce (Tibayrenc 1999).

2.2 La théorie clonale de *P. falciparum*

Au début des années 1990, des croisements de lignées clonales de culture montrent que des lignées génotypiquement distinctes de *P. falciparum* sont capables de se reproduire in vitro (Walliker et al. 1987). La technique de la PCR et le génotypage moléculaire vont ensuite permettre l'accès à la diversité allélique et génotypique des infections humaines, et la question des possibilités de croisement de ces différentes lignées entre elles se pose avec plus d'acuité. (Tibayrenc et al. 1990) vont alors proposer d'étendre le concept de la structure clonale des populations de pathogènes aux protozoaires parasites suivants : *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Trichomonas*, *Trypanosoma* et *Plasmodium*. L'emploi du terme de « clonalité » pour qualifier la structure des populations de *Plasmodium* alors que la phase sexuée dans le vecteur est un passage obligatoire du déroulement du cycle de vie du parasite va susciter un débat nourri sur la structure des populations naturelles de ce parasite (Conway et al. 1999 ; Mzilahowa et al. 2007 ; Razakandrainibe et al. 2005 ; Tibayrenc & Ayala 2002 ; Walliker 1991).

En fait, l'hypothèse proposée par les auteurs stipule non seulement que les organismes sont capables de se reproduire de façon clonale, ce qui est déjà connu in vitro, mais aussi que la reproduction uniparentale est suffisamment prédominante dans les populations naturelles pour générer des génotypes clonaux stables dans le temps et dans l'espace et même à une échelle de temps évolutive. La clonalité dans ce contexte est entendue dans une acception purement génétique, i.e. un organisme est clonal quand sa descendance est génétiquement identique aux parents (dans le cas d'espèces diploïdes à sexes séparés, par l'autofécondation entre gamètes mâle et femelle identiques génétiquement (Dye 1991)). La sexualité dans ce contexte se réfère donc à tout processus d'échange génétique entre cellules génétiquement distinctes qui permet la ségrégation des allèles et la recombinaison.

2.3 Etudes du taux de clonalité / recombinaison dans les populations naturelles de *P. falciparum*

La publication de cette théorie à l'aube des années 1990 a initié de nombreuses études qui se sont attachées à décrire la structure des populations naturelles du parasite *P. falciparum* dans une grande variété de contextes éco-épidémiologiques. La recherche d'une structure clonale ou panmictique, c'est-à-dire la détermination du taux d'autofécondation (ou du taux de recombinaison) dans les populations naturelles, a été menée selon différentes approches qui varient suivant le stade du cycle parasitaire étudié (Awadalla 2003).

La première approche utilise les méthodes paramétriques basées sur la détection du déséquilibre de liaison (DL) permettant de décrire l'association des locus entre eux (voir l'Encadré 2), pour décrire la structure haplotypique du génome des populations naturelles du parasite. Cette approche a été largement utilisée sur les isolats sanguins contenant les stades haploïdes du parasite dans différents contextes de transmission. Ces stades sont les plus faciles d'accès, et ces études sont nombreuses, mais leurs biais dans l'analyse du DL ont été soulignés rapidement (Day et al. 1992 ; Paul & Day 1998).

L'estimation du taux d'autofécondation du parasite dans les populations naturelles a également été réalisée par une approche de génétique des populations permettant l'estimation directe du déficit en hétérozygotes sur les stades oocystes diploïdes échantillonnés dans l'estomac du vecteur infecté. Ces études étaient rares (Babiker et al. 1994 ; Paul et al. 1995), d'autres études ont été menées plus récemment (Annan et al. 2007 ; Mzilahowa et al. 2007 ; Razakandrainibe et al. 2005). Elles permettent un accès direct aux F_{IS} et au déséquilibre de liaison entre locus estimés au sein du vecteur, hôte définitif, mais ces stades sont difficiles d'accès, les vecteurs infectés étant difficiles à obtenir sur le terrain, voire impossible dans les zones de faible endémie ou de paludisme instable épidémique (en Amérique du Sud ou en Asie, les faibles prévalences nécessiteraient la dissection de milliers de moustiques pour obtenir un effectif statistiquement significatif en estomacs infectés).

La dernière approche est évolutive et basée sur la théorie du LMC (*Local Mate Competition*) (Hamilton 1967). Elle vise à mesurer le sex-ratio des stades gamétocytes transmissibles du parasite présents dans le sang périphérique humain pour en inférer le taux d'autofécondation. Cette méthode a d'abord été proposée et appliquée par Read et al. (1992) et Paul et al. (1995) en PNG, puis suivie d'autres estimations en Afrique (Robert et al. 1996b ; Robert et al. 2003b).

Encadré 2. Le déséquilibre de liaison.

Définitions :

Si on considère les effets de la recombinaison entre deux gènes (A et B) possédant deux variants alléliques chacun (par exemple, A/a et B/b), où les allèles A et B favorisent un trait d'intérêt ; une association génétique entre allèles aux deux locus est mesurée par le déséquilibre de liaison (D) tel que :

$$D = \text{fréquence } (AB) \times \text{fréquence } (ab) - \text{fréquence } (Ab) \times \text{fréquence } (aB)$$

Le signe de D est arbitraire, on peut choisir D positif quand les deux haplotypes extrêmes (AB et ab) sont surreprésentés dans la population. Le déséquilibre de liaison est donc une mesure des associations génétiques entre allèles à différents locus, qui renseigne sur l'occurrence plus souvent qu'attendue de certains haplotypes particuliers.

La recombinaison détruit les associations génétiques non-aléatoires et diminue le déséquilibre de liaison dans une population. Si une fraction y de la population se reproduit sexuellement (en panmixie) et si, pendant la méiose, le taux de recombinaison entre les gènes A et B est r , le taux effectif de recombinaison (d) entre A et B est $y \times r$. En l'absence d'autres forces évolutives, comme la sélection, la migration, la mutation, ou la dérive génétique, le déséquilibre de liaison diminue d'un facteur $(1 - d)$ à chaque génération. Quand D s'approche de zéro, le sexe et la recombinaison n'ont plus d'effet sur la dynamique d'une population (d'après Otto & Lenormand 2002).

Le taux de recombinaison chez *P. falciparum* a été mesuré par ségrégation de marqueurs microsatellites dans un croisement génétique de Dd2 x Hb3 (Su et al. 1999): 1 centimorgan (cM) équivaut à 17kb, ce qui se traduit par une probabilité de recombinaison (r) de 6.10^{-7} entre nucléotides adjacents. Cette valeur est semblable à ce qui est connu chez la levure, mais 50 fois supérieur à ce qui est observé chez l'homme. Cependant, dans les populations naturelles, le taux effectif de recombinaison est bien plus faible à cause de l'autofécondation. Le taux effectif de recombinaison est $r' = (1-F) r$.

Les causes du déséquilibre de liaison :

La dérive génétique :

L'échantillonnage aléatoire des gamètes dans une population continue peut créer un excès de certaines combinaisons entre locus ;

« L'effet Wahlund » ou mélange de populations :

Lorsque une population est constituée de deux populations chacune en équilibre de liaison mais dont les fréquences alléliques diffèrent, du déséquilibre de liaison est créé ; si ces populations se rencontrent dans le milieu naturel, ce déséquilibre est transitoire si les deux populations restent en contact et recombinent au hasard ;

La sélection :

Sélection épistatique :

L'épistasie décrit l'interaction entre allèles de locus différents, ce qui peut être énoncé autrement : la valeur sélective d'un allèle à un locus dépend des allèles présents aux autres locus. Dans ce cas, la sélection n'agit pas de façon indépendante sur tous les locus, ils ne sont donc pas sélectionnés indépendamment, et du déséquilibre de liaison est généré entre ces locus ;

Balayage sélectif (selective sweep) :

Ce phénomène décrit les conséquences de la sélection positive exercée sur une mutation favorable et sur les allèles neutres qui lui sont liés ou qui sont en déséquilibre de liaison avec elle. Si un allèle neutre est lié à un allèle favorablement sélectionné dans la population, cet allèle neutre sera sélectionné avec l'allèle favorable, aboutissant à terme à sa fixation dans la population (phénomène d'auto-stop ou « hitch-hiking »).

Le balayage sélectif crée du déséquilibre de liaison et réduit la variabilité génétique neutre dans une population. Un phénomène semblable est en jeu pour les gènes situés dans les inversions chromosomiques : la sélection qui agit sur les inversions génère du déséquilibre de liaison au sein des inversions (Noor et al. (2001).

Mécanismes de maintien du déséquilibre de liaison :

La liaison physique entre deux locus :

Le taux de recombinaison entre deux locus physiquement liés sur un même chromosome dépend de la distance qui les sépare. Deux locus très proches seront en déséquilibre de liaison parce que le taux de recombinaison entre eux sera très réduit.

Le système de reproduction :

L'asexualité équivaut à une absence de recombinaison, le génome se transmettant « en bloc » à la génération suivante :

Autofécondation :

Les populations très autofécondantes maintiennent un déséquilibre de liaison entre locus : en effet, même si le taux de recombinaison est le même que dans une population allofécondante, l'efficacité de la recombinaison est réduite à cause de la rareté des hétérozygotes, qui contribuent le plus à rompre le déséquilibre de liaison ;

Homogamie :

L'union entre individus semblables peut contribuer à maintenir du déséquilibre de liaison ;

Clonalité :

La clonalité crée du déséquilibre de liaison par l'absence de recombinaison sexuée qu'elle suppose (voir Autofécondation). Cette propriété a été utilisée pour inférer la structure clonale ou panmictique des populations de pathogènes, notamment *P. falciparum*. Balloux et al. (2003) ont étudié la génétique des populations clonales et partiellement clonales diploïdes : leur modèle montre que tous les estimateurs basés sur l'identité par descendance, y compris le déséquilibre de liaison (index d'association et rD), ne seront pas sensibles au taux de reproduction clonale, à moins que celui-ci ne soit très prédominant, c'est à dire très proche ou égal à 1.

L'ensemble de ces études ont permis de clarifier la structure des populations du parasite dans les contextes de transmission mondiaux, et particulièrement en Afrique. Mais elles ont négligé dans leur quasi-majorité la fragmentation des populations de parasites dans leurs individus-hôtes à l'échelle locale, aussi parce que les techniques moléculaires ne permettaient pas de mener l'analyse moléculaire à ce niveau, pourtant essentiel pour la compréhension du fonctionnement local d'un foyer de transmission palustre.

2.3.1 Etudes du déséquilibre de liaison

Les conclusions des premières études du déséquilibre de liaison menées sur les haplotypes parasitaires sanguins ont vu s'opposer deux camps, aux deux extrêmes de la théorie, l'un partisan d'un régime de reproduction totalement panmictique du parasite, l'autre partisan de la structure clonale. Les conclusions de ces études ont été revues régulièrement (Awadalla 2003 ; Day et al. 1992 ; Dye 1991 ; Hartl et al. 2002 ; Paul & Day 1998 ; Tibayrenc & Ayala 2002).

- **Le consensus dérivé de ces études :**

Le consensus qui prévaut à l'heure actuelle concernant la structuration des populations naturelles de *P. falciparum* est largement basé sur l'étude du DL des stades sanguins du

parasite chez l'homme, et notamment sur l'étude d'Anderson et al. (2000b). Cette étude a été menée à partir de 465 échantillons sanguins collectés dans différents dispensaires de 9 localités à l'échelle mondiale (Afrique, Amérique du Sud, Asie) génotypés pour 12 marqueurs microsatellites (Su & Wellems 1996). Elle a été la première à mettre en œuvre les approches de génotypage multilocus par l'utilisation des marqueurs neutres microsatellites sur *P. falciparum*. Bien que le protocole mis en œuvre ne lui ait pas permis de s'affranchir des inconvénients inhérents à l'échantillonnage des stades sanguins et à l'utilisation du DL pour inférer la structure des populations, l'utilisation de marqueurs neutres et l'échelle d'analyse mondiale a permis de dégager les grands traits de la structuration de ce parasite chez son hôte humain.

Comme précédemment suggéré (Dye 1991), puis théorisé (Hill et al. 1995), le régime de reproduction du parasite *P. falciparum* serait fonction des caractéristiques environnementales conditionnant les faciès épidémiologiques et l'intensité de la transmission, qui conditionne elle-même la multiplicité de l'infection clonale chez l'homme et donc chez le vecteur. Selon ces auteurs, le parasite se reproduit de façon panmictique, mais dans un contexte de transmission faible (Amérique du Sud), la multiplicité de l'infection est faible chez l'homme et n'offre donc que peu de possibilités aux gamètes issus de clones génotypiquement différents pour se croiser. La faible diversité génétique observée dans ces régions s'accompagne de DL forts et étendus, reflets d'un régime de reproduction majoritairement autofécondant. A l'inverse, la forte transmission entretenue par les vecteurs en zones d'holo et hyper-endémicité favorise une grande richesse clonale de l'infection humaine, et donc une plus forte probabilité pour des gamétocytes de génotypes différents de se retrouver dans un même repas de sang chez le vecteur, et donc de se croiser. La diversité génétique observée en régions de forte transmission (Afrique) est élevée et les DL non-significatifs, signe d'un régime de reproduction panmictique des populations naturelles de *P. falciparum*.

Néanmoins ce schéma global a été contredit à plusieurs reprises, en témoignent les résultats contradictoires obtenus par les études des patrons du DL des gènes *csp-1* (Rich et al. 1997) et *msh-1* (Conway et al. 1999). La réconciliation entre les données de *csp-1* et *msh-1* est problématique, parce que chacun de ces gènes possède une structure génétique complexe et est très probablement soumis à très forte sélection (Hartl et al. 2002).

D'autre part, Anderson et al. (2000b) observent des DL forts et significatifs au Zimbabwe en Afrique, dans un site de forte transmission. D'autres DL significatifs ont également été observés sur ce continent en zones de transmission intense (Durand et al. 2003 ; Leclerc et al. 2002). Plus récemment, Bogreau et al. (2006) ont étudié la structure locale,

régionale et continentale du parasite *P. falciparum* en Afrique en génotypant des stades sanguins de 4 sites africains pour 22 microsatellites, dont 6 communs à ceux d'Anderson et al. (2000b), et n'observent pas de DL au sein des sites, sauf à Djibouti, où les auteurs supposent que ce DL résulte d'une expansion clonale épidémique. L'isolement des populations parasitaires djiboutiennes suggère l'existence de micro-foyers et/ou un système de reproduction clonal.

▪ **Limites des études du DL des stades sanguins du parasite :**

- Le type de marqueurs utilisé est remis en cause :

Avant le séquençage du génome de *P. falciparum*, la très grande majorité des études moléculaires menées en épidémiologie et génétique des populations du parasite a été conduite avec un nombre limité de locus codant notamment des antigènes exprimés à la surface des globules rouges infectés par le parasite (MSP-1 et MSP-2, CSP, GLURP) (Babiker et al. 1994; Paul et al. 1995; Rich et al. 1997). De nombreuses études ont montré que ces locus étaient fortement soumis à sélection de la part des systèmes immunitaires hôtes. L'analyse des ratios de mutations synonymes et non-synonymes au sein des séquences de *msh-1* et *msh-2* (Rich et al. 1997), ainsi que les études d'immunologie expérimentale montrant, notamment, un effet protecteur des anticorps dirigés contre ces antigènes de surface dans l'invasion des globules rouges montrent que ces séquences codantes sont soumises à une forte pression de sélection exercée par les systèmes immunitaires hôtes. L'interprétation des patrons de distribution des allèles au sein des populations est impossible sur la base des marqueurs sélectionnés, les effets de la sélection et de l'histoire évolutive de la population étant indiscernables. Les marqueurs microsatellites, sélectivement neutres, ont été développés ensuite et ont été utilisés pour la première fois pour l'analyse de *P. falciparum* par Anderson et al. (2000b) à l'échelle mondiale.

- Inconvénients liés à l'échantillonnage et à l'analyse des stades sanguins :

Les biais dans l'échantillonnage des isolats sanguins humains sont soulignés très tôt (Day & Read 1992). Il peut y avoir plusieurs origines à un DL observé en plus de l'autofécondation, et notamment l'effet Wahlund (voir l'Encadré 2). Or les isolats sanguins sont très souvent obtenus auprès des dispensaires, qui regroupent une population aux origines géographiques diverses. Au vu de la très grande diversité des contextes de transmission africains, et des conséquences de la transmission sur la mise en place de l'immunité chez l'homme, et donc sur la structure des populations parasitaires (i.e. le nombre de génotypes

parasitaires portés par homme) au sein d'un contexte donné de transmission (voir Intro. biblio. Partie 1), un tel échantillonnage aléatoire est susceptible de créer du DL par effet Wahlund. L'analyse des facteurs qui ont pu influencer les paramètres de génétique des populations estimés est rendue très difficile pour des isolats qui ont été obtenus indépendamment de leur contexte originel. De plus, comme on l'a vu, les paludismes cliniques en zones de forte transmission ne sont pas la norme : ce sont majoritairement les enfants qui développent ces accès, l'échantillonnage étant ainsi biaisé en leur faveur. Une sélection pour les souches les plus virulentes par un échantillonnage mené exclusivement sur les personnes se présentant au dispensaire contribue donc également à un biais d'échantillonnage. Ces auteurs soulignent la nécessité de mener échantillonnage et analyses au niveau local.

– Inconvénients liés à l'analyse du déséquilibre de liaison :

D'autre part, les problèmes inhérents à l'estimation du taux d'autofécondation d'une population ou de sa structure clonale par l'analyse du DL ont été largement soulignés (voir l'Encadré 2 pour l'inadéquation de certains paramètres d'estimation du DL pour en inférer la clonalité, ainsi que (Paul & Day 1998 ; Read & Day 1992 ; Vitalis & Couvet 2001). Les auteurs analysent les conditions de la fiabilité du DL pour inférer le taux d'autofécondation, et concluent que ces conditions ne sont pas réunies pour l'analyse de la structure des populations de *P. falciparum* telle qu'elle a été menée.

L'inconvénient majeur de la mesure du DL pour déterminer le taux d'autofécondation des populations naturelles de *P. falciparum* est qu'il est rendu impossible à estimer ou alors sur de très faibles effectifs dans les zones de fortes transmission. Dans ces zones en effet, la grande majorité des infections humaines sont multiples, composées de plusieurs haplotypes pour lesquels il est impossible de déduire l'haplotype multilocus. L'analyse ne peut être conduite que sur les infections monoclonales, ce qui réduit drastiquement l'effectif analysé en dessous du seuil de significativité des tests du DL, et introduit en outre un biais majeur en faveur des souches responsables des mono-infections (très loin d'être la norme dans ces zones, voir la Partie 1). Pour pallier à ces inconvénients, certains auteurs ont élaboré des techniques d'analyse moléculaire basées sur les intensités relatives des pics obtenus par le génotypage PCR (Anderson et al. 2000b). Mais l'aléa connu de l'amplification PCR introduit un biais dans ce type d'étude qu'il est difficile d'ignorer. Des méthodes, statistiques ou expérimentales, sont développées pour reconstruire les génotypes multilocus à partir des infections multiples (Certain & Sibley 2007 ; Hill et al. 1995 ; Takala et al. 2007).

Les limites de l'analyse du DL sur les stades sanguins ont donc initié l'effort vers des approches alternatives : études des oocystes ou du sex-ratio du parasite. Cependant, les études du DL ont récemment grandement tiré profit des avancées technologiques du séquençage « haut-débit » (voir la Discussion générale).

2.3.2 Etudes du déficit en hétérozygotes chez le vecteur

▪ **Pourquoi peu d'études sur les oocystes :**

Les études sur les stades oocystes diploïdes oocystes dans l'estomac du moustique permettent d'inférer le régime de reproduction du parasite directement au sein de son hôte définitif. Cependant, un très petit nombre d'études a été menée sur ces stades : deux études ont été menées sur le pool d'oocystes isolés des vecteurs toutes espèces et individus moustiques confondus (en Tanzanie, Babiker et al. 1994 ; en PNG, Paul et al. 1995), avant une étude menée sur des oocystes échantillonnés individuellement au sein de chaque individu-hôte moustique (Razakandrainibe et al. 2005). Ce petit nombre d'études consacrées aux stades vectoriels s'explique par la difficulté de l'accès aux oocystes, les vecteurs infectés étant difficiles à obtenir sur le terrain. En effet, si les indices oocystiques observés chez les vecteurs peuvent s'élever à 10% dans les zones où la transmission est la plus intense (zones rurales des hauts-plateaux kenyans), elle plafonne en moyenne à 5% au maximum dans les zones de forte transmission (voir Intro. Biblio. Partie 1). Ces faibles prévalences nécessitent la dissection de milliers de moustiques pour obtenir un effectif (tout juste) statistiquement significatif en estomacs infectés. D'autre part, les difficultés techniques de la dissection individuelle et d'amplification des très petites quantités d'ADN (un oocyste) n'ont pas permis jusqu'à récemment l'étude des modalités de la fécondation à l'échelle de l'individu-hôte vecteur, dans le moustique.

▪ **Etat des lieux :**

Plasmodium falciparum est un pathogène eucaryote unicellulaire protozoaire hermaphrodite à cycle haplobiontique comprenant une phase de reproduction sexuée obligatoire chez le vecteur alternant avec des phases de reproduction asexuée chez l'hôte intermédiaire (dans le foie et le sang).

Si la phase sexuée est obligatoire, la recombinaison ne l'est pas forcément. En théorie, si les moustiques ne prennent qu'un seul génotype par homme, il y aura autofécondation et pas de recombinaison. C'est donc à ce niveau, dans l'individu-hôte vecteur, qu'il est intéressant d'effectuer l'échantillonnage des infrapopulations parasitaires pour avoir accès aux

proportions en hétérozygotes. Les deux études pionnières effectuées sur les oocystes ont estimé le paramètre F_{IT} , i.e. le déficit en génotypes hétérozygotes observé sur la population totale des oocystes diploïdes échantillonnés sur l'ensemble des vecteurs. Ces valeurs sont comprises entre 0,9 en PNG (Paul et al. 1995) et 0,3 en Tanzanie (Babiker et al. 1994). Une estimation de 0,33 pour la Tanzanie a été obtenue par une méthode indépendante (Hill et al. 1995). Les deux tiers des zygotes de cette population sont donc capables de former des génotypes recombinants, et donc, un tiers des zygotes est le produit d'une autofécondation entre gamètes génétiquement identiques. Les différences de transmission n'expliquent pas totalement les différences observées, puisque si la transmission est très intense en Tanzanie, elle est également intense en PNG (Paul et al. 1995 ; 1998). Pour ce dernier site, la présence d'allèles nuls a été invoquée pour expliquer ce taux très fort de consanguinité des populations parasitaires vectorielles (Anderson et al. 2000c). Néanmoins, l'étude du sex-ratio des populations naturelles de *P. falciparum* semble corroborer ce résultat en PNG. Ces deux études pionnières ont été menées avec les marqueurs MSP-1 et 2, potentiellement soumis à forte sélection de la part du système immunitaire hôte.

Plus récemment, d'autres études ont décrit les proportions en hétérozygotes observées au sein des individus moustiques par l'analyse des oocystes avec des marqueurs neutres microsatellites, c'est-à-dire le paramètre F_{IS} (i.e. la probabilité que deux allèles homologues dans un zygote soient identiques par descendance, répliqués d'un allèle ancestral unique, voir Partie 2, Par. 1.1.2). Les F_{IS} observés au Kenya (Razakandrainibe et al. 2005 ; Annan et al. 2007) et au Malawi (Mzilahowa et al. 2007) sont remarquablement similaires (respectivement 0,15 et 0,18), ainsi que le déficit en hétérozygote global F_{IT} (0,43 et 0,56), le taux d'autofécondation variant de 25 à 50% selon la méthode de mesure, ce qui est considérable pour ces zones de forte transmission mais inférieur aux estimations obtenues par la mesure du sex-ratio.

2.3.3 Etudes du sex-ratio de *P. falciparum*

- **Théorie évolutive du sex-ratio de *P. falciparum* :**

Les stades transmissibles de *P. falciparum*, les gamétocytes, sont produits dans le sang périphérique de l'homme au cours de la multiplication asexuée. Chez ce parasite, tous les mérozoïtes issus d'un même schizonte sont sexués ou asexués, et tous les gamétocytes d'un même schizonte sexué sont soit mâles soit femelles (Bruce et al. 1990 ; Smith et al. 2000). Une même lignée clonale peut donc produire des schizontes producteurs de gamétocytes mâles et des schizontes producteurs de gamétocytes femelles, les gamètes issus des

gamétocytes des deux sexes pouvant s'autoféconder ou se croiser avec ceux issus d'autres lignées. Les gamétocytes sont aspirés lors de la piqûre d'un moustique femelle anophèle, et se transforment en gamètes dans l'estomac du vecteur selon les modalités suivantes : (i) un gamétocyte femelle produit un gamète femelle ; (ii) un gamétocyte mâle produit de 1 à C gamètes mâles, avec $C=8$ au maximum pour *P. falciparum*.

Le trait d'histoire de vie « allocation des sexes » pour une lignée clonale fait l'objet de l'étude du sex-ratio de *P. falciparum*. Le sex-ratio de *P. falciparum* est la proportion de gamétocytes mâles dans le sang périphérique, c'est-à-dire la proportion de schizontes alloués aux mâles par rapport au nombre total de schizontes alloués à la production des stades transmissibles d'une lignée clonale donnée. Le sex-ratio optimal, pour lequel la totalité des gamètes femelles produits sont fécondés par des gamètes mâles frères sera celui où C gamétocytes femelles sont produits pour chaque gamétocyte mâle frère, ce qui donne un sex-ratio optimal de $1/(1+C)$. C'est le sex-ratio pour lequel le nombre de gamètes mâles frères est égal au nombre de gamètes femelles sœurs, et donc qui maximise le nombre de zygotes produits par une lignée clonale au sein du vecteur.

L'observation des sex-ratios des protozoaires parasites *Plasmodium* montrent qu'ils sont en général biaisés en faveur des femelles (West et al. 2001). Or ce biais a longtemps été interprété comme la simple conséquence de la compensation par les femelles du nombre supérieur de gamètes mâles produits (Paul et al. 2002). Read et al. (1992 ; 1995) ont montré, en se basant sur la théorie d'allocation des sexes de Hamilton (1967), que le sex-ratio des parasites *Plasmodium* en tant que phénotype variable, déterminé génétiquement et héritable (des lignées clonales en culture possèdent leur propre sex-ratio, voir la revue de West et al. 2001), devait donc être optimisé par la sélection naturelle. Hamilton (1967) montre en effet que dans le cas d'une espèce autofécondante, la sélection naturelle favorisera un phénotype d'allocation des sexes où la compétition entre mâles frères pour l'accès aux femelles (*local mate competition*) sera réduite, c'est-à-dire que la proportion des mâles sera diminuée au profit des femelles. En effet, si l'espèce s'autoféconde, la compétition entre mâles frères devient inutile, et le nombre de mâles produits est ajusté à la proportion optimale nécessaire pour féconder toutes les femelles (si le coût de production des gamètes mâles et des gamètes femelles est identique).

Le sex-ratio $1/(1+C)$ n'est donc optimal que si tous les gamètes femelles sont fécondés par des gamètes frères, c'est-à-dire pour *Plasmodium* dans le cadre d'infections monoclonales, et non dans le cas d'infections multiples. Dans ces cas-là, comme pour les espèces dioïques panmictiques, la compétition entre mâles redevient utile, car elle détermine le nombre de copies de gènes transmis par la lignée. Le sex-ratio sélectionné sera donc rééquilibré en faveur

des mâles. On s'attend donc à obtenir des sex-ratios biaisés en faveur des femelles si les populations de parasites se reproduisent majoritairement par autofécondation, et des sex-ratios plus équitables si de l'allofécondation a lieu. L'observation des sex-ratios des parasites *Plasmodium* dans des contextes différents ont montré effectivement que la grande majorité des sex-ratios naturels étaient biaisés en faveur des femelles, les taux d'autofécondation étant en accord qualitatifs avec les sex-ratios mesurés (Read et al. 1992).

▪ **Sex-ratio et autofécondation chez *P. falciparum* :**

L'application de la théorie évolutive du sex-ratio à l'étude du taux d'autofécondation des parasites apicomplexes, et parmi eux *P. falciparum* a été proposée par Ghiselin (1974) et réactualisée par Read et al. (1992), puis mise en application par Paul et al. (1995) en Papouasie-Nouvelle-Guinée. La difficulté d'accès des oocystes diploïdes chez le vecteur (particulièrement dans les zones de faible transmission) et les ambiguïtés de l'étude du déséquilibre de liaison (Paul et al. 1998), ont fait apparaître l'étude du sex-ratio comme une bonne alternative pour estimer le taux d'autofécondation des populations naturelles du parasite. Le taux d'autofécondation (F) peut être estimé d'après le sex-ratio (r) ou le taux d'autofécondation (S) selon l'équation suivante :

$$F = 1 - 2r \quad (\text{Read et al. 1992})$$

$$r = (1-S)/2 \quad (\text{Dye \& Godfray 1993})$$

Le sex-ratio est mesuré par comptage des gamétocytes circulants dans le sang périphérique humain. Les estimations des sex-ratios couplées à une estimation directe du taux d'autofécondation sont en accord quantitatifs : le sex-ratio moyen observé (0,18) dans les infections palustres humaines en PNG prédit un taux d'autofécondation S compris entre 0,64 et 1 en supposant que 4 gamètes mâles sont produits par gamétocyte, c'est-à-dire que 64% des zygotes produits le sont par autofécondation. Ce sex-ratio estimé a été confirmé par les analyses moléculaires génétiques qui ont mesuré un coefficient d'autofécondation (F) de 0,9 (Paul et al. 1995 ; Read et al. 1992), et semble confirmé également dans un autre contexte de transmission ($F=0,56$ et $S=50\%$ au Malawi ; Mzilahowa et al. 2007).

D'autres études menées sur le sex-ratio des populations naturelles de *P. falciparum* ont montré une variation en fonction du niveau de transmission des zones étudiées : en zone holoendémique à Dielmo (Sénégal) le sex-ratio moyen est de 0,35 (respectivement 26% et 74% de gamétocytes mâles et femelles comptés, i.e. ~3 femelles pour 1 mâle) au total sur des villageois asymptomatiques non traités, valeur plus élevée que les deux valeurs publiées, 0,22 dans la ville de Yaoundé (Robert et al. 1996) et 0,18 en PNG (Paul et al. 1995).

Le sex-ratio moyen (0,22) observé au Cameroun est moins biaisé en faveur des femelles que celui observé en PNG (0,18), comme prédit par un plus fort potentiel panmictique au Cameroun, où l'intensité de la transmission, donc le taux d'inoculation et le nombre de clones par hôtes, sont supérieurs (Robert et al. 1996). A Dielmo, où h est aussi élevé qu'en PNG dans l'année, le sex-ratio est moins biaisé en faveur des femelles qu'attendu.

Les sex-ratios obtenus varient d'autre part avec l'anémie et avec la densité des gamétocytes : quand la densité est élevée, le parasite optimise sa transmission en produisant plus de femelles que de mâles, d'où des sex-ratios biaisées en faveur des femelles chez les individus en phase aigue de production de gamétocytes. En revanche, dans le cas d'une production régulière et continue de gamétocytes à faible densité (comme c'est le cas pour les infections chroniques des adultes en zones de forte transmission africaine), le nombre de mâles est augmenté par rapport aux femelles pour augmenter l'infectivité du repas de sang c'est à dire la probabilité pour que le moustique absorbe au moins quelques mâles avec les femelles si les gamétocytes circulants matures sont rares dans le sang périphérique. Plusieurs études (Barry et al. 2007 ; Bruce et al. 2000 ; Daubersies et al. 1996 ; Farnert et al. 1997 ; Takala et al. 2007) ont montré que le profil clonal varie d'un jour à l'autre dans les régions de forte transmission palustre où les infections sont multiples et contiennent un mélange de gamétocytes. Ces conditions permettent de prédire des variations dans le sex-ratio du parasite suivant le nombre d'haplotypes producteur de gamétocytes, qui peut varier dans le temps au sein des infections.

3 Structuration spatiale du parasite *P. falciparum* en Afrique

L'utilisation de marqueurs neutres ou sélectionnés pour inférer les patrons des flux de gènes entre sous-populations n'est pas anodine : la variabilité neutre peut ne pas donner la même information que les marqueurs sélectionnés, ce qui peut expliquer des résultats contradictoires dans la mesure des flux de gènes entre populations géographiquement distinctes. Les études de la différenciation génétique entre sous-populations en Afrique et dans le monde ont été effectuées à partir de ces deux types de marqueurs, les avancées techniques récentes liées aux séquençages complets des génomes du parasite et du vecteur ayant considérablement élargi la gamme du type et du nombre de marqueurs disponibles.

Le consensus qui a émergé des études menées jusqu'en 2005, avant la publication des études menées sur le génome entier (en 2007), fait état d'une diversité génétique de *P. falciparum* distribuée différemment dans les zones de forte transmission par rapport aux zones de transmission plus faible : en Afrique, l'étude de Anderson et al. (2000b) montre une

diversité distribuée principalement au niveau local, au sein des sous-populations, et très peu au niveau régional entre populations géographiquement distantes. En Amérique du Sud, c'est l'inverse, il y a très peu de diversité locale, et toute la diversité est structurée entre les populations, au niveau régional. En Asie du Sud-Est, le patron de structuration de la diversité des populations parasitaires est intermédiaire.

D'autres études en revanche menées entre localités géographiques distantes en Afrique à l'aide des mêmes marqueurs microsatellites neutres concluent à une structuration évidente du parasite au niveau continental. Ces résultats montrent donc une structure des populations plus importante que celle observée à ce jour à partir de marqueurs microsatellites chez *P. falciparum* (Abdel-Muhsin et al. 2003 ; Bogreau et al. 2006). Les conclusions des études récentes tirant parti des nouveaux types de marqueurs du criblage du génome de *P. falciparum* (Barry et al. 2007 ; Mu et al. 2005 ; Mu et al. 2007) seront discutés en Discussion générale.

Néanmoins, aucune de ces études n'a été menée à l'échelle locale et régionale africaine sur les stades du parasite dans le moustique. L'impact de la structuration du parasite au sein et entre individus homme et vecteur, i.e. la structuration du parasite en infrapopulation (Matériels & Méthodes ; Criscione et al. 2005) sur la distribution de la diversité génétique neutre entre les hôtes, localement et régionalement, n'a donc jamais été évalué.

4 L'impact de l'hôte vecteur: la spécificité dans le système anophèle/Plasmodium

En Afrique, la diversité anophélienne est très grande, mais seules quelques espèces sur les 14 espèces anophèles retrouvées avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires interviennent de façon significative dans la transmission : ces espèces majeures sont *An. gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. arabiensis*, *An. nili* et *An. moucheti*. Les autres espèces, malgré leur exposition quotidienne au parasite, ne sont pas des vecteurs d'importance dans la transmission du parasite : soit elles sont incompatibles, soit des éléments extrinsèques liés à l'environnement et à leur comportement interviennent pour en minimiser le rôle vecteur (Billingsley & Sinden 1997).

La compatibilité d'un système anophèle/*Plasmodium*, et donc la transmission du parasite, dépend ainsi du franchissement de deux filtres, qui vont gouverner la résistance ou la susceptibilité d'une espèce vectrice et sa capacité à transmettre le parasite :

- (i) Les filtres de rencontre sont déterminés par les facteurs environnementaux et comportementaux de la capacité vectorielle (facteurs extrinsèques) : si la

fréquence des contacts hôte-vecteur est nulle ou insuffisante, le recrutement et la transmission du parasite n'ont pas lieu ;

- (ii) Si les filtres de compatibilités sont fermés, le développement du parasite recruté sera bloqué à un stade donné de son développement au sein du vecteur, et le parasite ne sera pas transmis. Ces barrières qui sont mises en jeu contre l'infection ont une base génétique et moléculaire tout comme les barrières comportementales à la rencontre du parasite, mais ces dernières constituent un filtre externe.

L'ensemble de ces facteurs et leur variation entre les différentes espèces de moustiques déterminent la spécificité des interactions dans le système moustique/parasite. Les variations interspécifiques pour ces paramètres, reflets des mécanismes coévolutifs mis en place dans les différents systèmes, vont déterminer les modalités de la distribution de la variabilité génétique parasitaire dans les hôtes vecteurs et humains au sein des sites de transmission. A ce titre, leur étude présente une importance primordiale pour la compréhension des patrons de transmission et de l'épidémiologie palustres.

4.1 Spécificité des interactions Anopheles/Plasmodium : facteurs intrinsèques

4.1.1 Spécificité de l'infection et des interactions génétiques

La compatibilité au niveau génétique (intrinsèque) d'une interaction hôte-pathogène est réalisée quand le parasite peut trouver à la fois les ressources spécifiques, les récepteurs cellulaires, les nutriments et les signaux du développement dont il a besoin pour se reproduire et se développer, y compris en présence des défenses immunes de l'hôte (Vernick 2005).

Les moustiques, comme on l'a vu (Intro. biblio. Par. 1.3.2.), possèdent des mécanismes qui vont limiter le développement des parasites à plusieurs étapes lors de l'infection, mais sans forcément l'empêcher totalement. Seule une minorité des parasites ayant pénétré le moustique pourront donc se développer jusqu'au bout (Gouagna et al. 1998 ; Vaughan et al. 1994) : les mécanismes de défenses de base éliminent donc déjà la majorité des parasites. Un développement complet du parasite signifiera donc une bonne adéquation moléculaire du parasite pour son vecteur.

Une interaction compatible ne signifie pas forcément une interaction anodine : les parasites diminuent en effet le succès reproducteur (*fitness*) de leur hôte ((Ferguson & Read 2002 ; Lyimo & Koella 1992). Ce coût à l'infection contraint le moustique à monter une réponse immune active contre son parasite, réponse qui peut aussi être passive : la variabilité génétique au niveau de certaines molécules critiques pour le parasite peut produire des

phénotypes de vecteurs résistants au parasite en le rendant fonctionnellement invisible pour celui-ci (Vernick 2005). Le compromis entre le coût à la résistance et le coût de l'infection détermine les modalités de l'adaptation coévolutive dans le système anophèle/*Plasmodium* (Boete 2005).

Les combinaisons vecteur-parasite sont donc soit compatibles, soit pauvres (*An. stephensi*/*P. gallinaceum*), soit incompatibles (*Aedes aegypti* /*P. berghei*). Parmi les combinaisons compatibles, il existe une grande variabilité dans l'efficacité du développement parasitaire (la distribution des parasites dans les vecteurs est très agrégée, voir la Partie 1 Par.1.3.2) et de la transmission (Vaughan 2007). Des éléments de l'hôte humain (sang), du parasite, mais surtout des éléments spécifiques à chaque espèce de moustique (Alavi et al. 2003 ; Robert et al. 1998 ; Vaughan et al. 1994) et même souche de moustique (Collins et al. 1986 ; Somboon et al. 1999 ; Volz et al. 2006) entrent successivement en jeu pour bloquer le développement sporogonique aux différentes étapes du cycle sporogonique.

La spécificité des interactions dans le système anophèle/*Plasmodium* a été caractérisée également au niveau génétique, notamment pour le phénotype de l'encapsulation mélanotique, où la cartographie génétique du phénotype de résistance de la souche *An. gambiae* L35 montre une spécificité des QTL impliqués en fonction du parasite (Zheng et al. 1997 ; Zheng et al. 2003). L'existence de telles interactions moléculaires et cellulaires clés sont un pré-requis pour qu'un système vecteur-parasite s'établisse et donc coévolue (Alavi et al. 2003).

4.1.2 La coévolution dans le système anophèle/*Plasmodium*

De très nombreuses infections expérimentales ont été réalisées pour élucider les mécanismes de la résistance et les limites de la compatibilité des populations de vecteurs aux populations de parasites, dans un grand nombre de systèmes moustique/parasite. Elles ont permis de mettre en évidence les preuves d'une adaptation coévolutive dans le système plus particulier anophèle/*Plasmodium*. Le moustique est un hôte obligatoire pour la transmission du parasite, mais aussi pour son évolution et son adaptation : la coévolution entre le parasite et le moustique est envisagée comme un aspect qui enrichit l'interaction vecteur/parasite, car elle enrichit la réponse immune d'une composante adaptative qui permet l'évasion immune.

Les infections expérimentales mises en œuvre pour tester les limites géographiques de l'adaptation locale des parasites à leurs hôtes ont montré que *P. falciparum* était un parasite (i) spécialiste à grande échelle, les souches africaines de *P. falciparum* se développant mal dans les vecteurs anophèles européens, alors que ceux-ci transmettaient les souches

européennes de *P. falciparum* (la fièvre tierce maligne) ; et (ii) généraliste à l'échelle locale, où il se développe chez tous les vecteurs sympatriques.

L'exemple des anophèles autochtones vis-à-vis des *Plasmodium* allopatriques montre qu'il existe une adaptation locale des parasites pour leurs vecteurs locaux, c'est-à-dire une composante adaptative dans la compatibilité des *Plasmodium* à leurs hôtes vecteurs (Collins et al. 1986). L'encapsulation mélanotique des parasites dans les vecteurs a été rapportée pour de nombreuses combinaisons parasite/moustique. Son efficacité est très dépendante de l'espèce de parasite et de la souche parasitaire, ce qui suggère qu'elle est basée sur une reconnaissance spécifique. La souche réfractaire *An. gambiae* L35 bloque totalement *P. cynomolgi*, *P. berghei*, *P. falciparum* d'Asie et du Nouveau Monde, mais pas les *Plasmodium* africains. Or, ces moustiques mélanisent tout de même très bien les billes, donc la reconnaissance spécifique des parasites africains élimine le parasite à une étape antérieure à la mélanisation. En appui de cette distinction faite entre élimination du parasite et mélanisation, les moustiques sauvages mélanisent également très bien les billes, mais pas les parasites (Schwartz & Koella 2002).

Un phénotype réfractaire a été obtenu également pour *An. dirus* contre *P. yoelii*, un parasite africain de rongeur. La mélanisation débute peu après l'invasion de l'estomac (Somboon et al. 1999). Mais, cette souche est complètement susceptible aux parasites humains *P. falciparum* et *P. vivax*, ce qui renforce encore la notion de spécificité des interactions entre le moustique et le parasite.

D'autre part, toutes les questions suscitées par l'applicabilité des connaissances accumulées à partir du système *An. gambiae/Plasmodium* de laboratoire vers les systèmes naturel anophèles/*P. falciparum* (voir la revue de Boete 2005) ont suscité une série d'études qui sont venues récemment appuyer la notion d'interactions coévolutives adaptatives dans ce système hôte/parasite en montrant que les patrons de la réponse immune à l'infection différaient totalement selon le système étudié :

- (i) Les profils transcriptionnels d'un panel de gènes impliqués dans la réponse immune à l'infection parasitaire sont différents selon que le vecteur *An. gambiae* est infecté par *P. falciparum* ou *P. berghei* : alors qu'un très grand nombre de gènes sont activés lors de l'infection de *P. berghei*, *P. falciparum* n'en élicite qu'un panel restreint et spécifique, ce qui indique la coadaptation du système immun du vecteur à l'infection par son parasite naturel le plus abondant (Dong et al. 2006 ; Tahar et al. 2002).

- (ii) Cohuet et al. (2006) ont testé sur le système naturel *An. gambiae/P. falciparum* des gènes ayant un effet sur le portage en oocystes, mais identifiés sur le système de laboratoire *An. gambiae/P. berghei*, un système sans histoire évolutive commune, et ont analysé la réponse transcriptionnelle de ces gènes à l'infection par *P. falciparum*. Le phénotype de la susceptibilité à l'infection (mesurée par le nombre d'oocystes) diffère totalement entre les deux systèmes.

La coadaptation dans le système naturel favorisera des taux d'infection bas, si à la fois l'hôte et le parasite tirent parti de la limitation de l'infection. La coadaptation au bénéfice des deux parties favorise en effet l'établissement d'un équilibre robuste sur la base d'une réponse immune limitée mais efficace du moustique au parasite (Boete 2005). Or les études du coût à la fécondité associé à l'infection par *Plasmodium* chez le moustique ont montré des résultats contradictoires. Dans les populations naturelles, toutes les observations montrent des charges en oocystes beaucoup plus faibles que dans les infections de laboratoire. D'autre part, une corrélation positive entre la mortalité et la charge en oocyste est observée dans les populations naturelles d'*An. gambiae*, potentiellement due au coût métabolique de l'infection (Lyimo & Koella 1992). L'infection des moustiques au niveau des glandes salivaires augmente de plus leur mortalité (comportement plus risqué). En condition de laboratoire la présence d'oocystes est associée à une fécondité diminuée avec un détournement des ressources de l'hôte par le parasite (Hogg & Hurd 1997).

Il va donc s'établir un compromis fonctionnel entre le coût de l'infection et la résistance (le coût de la résistance lui-même est un coût à la fécondité) (Boete 2005 ; Ferguson & Read 2002). Or l'encapsulation mélanotique est très coûteuse pour le parasite (effet toxique des facteurs immuns impliqués) et les études récentes de Riehle et al. (2006 ; 2007) ont montré que ce n'était pas le système qui était favorisé dans la nature. Niaré et al. (2002) montrent que les allèles de résistance ségrégent à une forte fréquence dans la population naturelle, donc *P. falciparum* exerce une forte pression sur *Anopheles*. Le parasite et le vecteur représentent donc un système en coévolution à l'équilibre dynamique où la diminution de la charge de l'infection peut favoriser la transmission du parasite : compromis qui est à l'origine de la coadaptation évolutive, et de l'équilibre robuste observé dans les infections naturelles.

A tous ces titres, la comparaison des dynamiques évolutives des gènes de l'immunité entre la drosophile et les vecteurs *Anopheles* et *Aedes* est très révélatrice : les pathogènes de la drosophile sont essentiellement des bactéries, alors que les anophèles sont confrontés

majoritairement à la même espèce de parasite. Le système drosophile/pathogène va donc coévoluer de façon généraliste, alors que les relations anophèles/parasites seront spécifiques. Volz et al. (2006) ont montré comment cette spécificité s'exerçait au niveau de l'espèce et même de la souche de *An. gambiae*, et Waterhouse et al. (2007) ont mis en évidence les bases génétiques et les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans l'évolution de cette spécificité : principalement, il s'agit des mécanismes de la reconnaissance immune et de la modulation des voies de signalisation, ainsi que certains mécanismes effecteurs (Intro. biblio. Partie 1, Par 1.3.2).

4.2 Eléments extrinsèques de la spécificité anophèles/*Plasmodium*

Tous les facteurs extrinsèques, de l'écologie, de la biologie et du comportement, affectent le recrutement des parasites par les espèces d'anophèles au sein des sites et peuvent avoir un impact sur le portage parasitaire de ces espèces, i.e. sur la distribution des espèces et des génotypes *Plasmodium* dans leurs hôtes. Ils influencent ainsi la structure des populations du parasite à l'échelle locale du site de transmission où ils sont présents en sympatrie, mais également aux échelles supérieures : en effet, selon les mécanismes micro-évolutifs mis en jeu aux différents niveaux de fragmentation de la population parasitaire, l'évolution et le maintien de la diversité se feront différemment selon que l'individu moustique ou la sous-population, voire la population régionale, constituent l'unité évolutive du parasite.

Les traits d'importance, densités vectorielles, longévités, comportements trophiques, préférences trophiques, ont été présentés (Intro. biblio. Partie 1, Par. 1.3.1) pour les quatre espèces anophèles prises en compte dans cette étude. Ces traits sont variables entre les espèces vectrices, et au sein de chaque espèce ils varient également en fonction des contextes de la transmission. Par exemple, les gîtes utilisés par *An. funestus* (lacs, marécages, rizières) sont permanents et moins soumis aux aléas de la pluviométrie que ceux de *An. gambiae* (flaques de pluie récente), plus dépendants du degré hygrométrique des sols. Les densités de population de *An. funestus* sont ainsi plus stables dans le temps et moins fluctuantes que celles de *An. gambiae* (Gillies & De Meillon 1968). Dans les contextes de transmission équatoriaux, au couvert végétal dense, l'héliophilie des espèces *An. gambiae* s.s., *An. nili* et *An. moucheti* restreint leur espace de dispersion aux espaces découverts, ce qui est moins le cas pour *An. funestus* (Gillies & De Meillon 1968).

De plus, les dynamiques relatives des densités des espèces varient au cours de la saison de transmission : la stabilité des gîtes de *An. funestus* lui permet de relayer la transmission plus en avant dans la saison sèche. Or, les caractéristiques de l'infection des hôtes humains évoluent avec l'avancement de la saison de transmission, la multiplicité des

infections étant plus élevée en début de saison de transmission (Takala et al. 2007). Une espèce recrutant ses parasites plus tard dans la saison aura ainsi accès à une population de parasites génétiquement moins diversifiée.

Les caractéristiques du comportement trophique (agressivité, choix et recherche de l'hôte, persistance sur l'hôte, fréquence des repas multiples, lieux de repos) sont également très variables entre espèces anophèles sympatriques (Trung et al. 2005). Par exemple, l'endophilie très forte de *An. funestus* par rapport aux autres espèces est soulignée par de nombreuses études dans de nombreux contextes de transmission (Beier 1996 ; Costantini et al. 1999 ; Fontenille et al. 1997 ; Gillies & de Meillon 1968 ; Minakawa et al. 2002). Les études menées sur la fréquence des repas multiples et interrompus, ainsi que sur l'utilisation de jus sucré, ont montré par ailleurs une propension plus forte pour *An. funestus* à se nourrir exclusivement de sang pour restreindre ses déplacements en dehors de l'abri des cases (Beier 1996).

Quelques études ont ainsi mis en évidence des spécificités de transmission de certaines espèces de parasites humains par certaines espèces d'anophèles, dans les contextes où plusieurs espèces distinctes sont sympatriques (voir la revue de Boete & Paul 2005). Ces mécanismes font intervenir des facteurs de l'hôte (biologie, dispersion des vecteurs), mais également du parasite (mécanismes de compétition/facilitation chez l'homme et chez le vecteur). Ainsi, l'existence d'interactions entre les espèces plasmodiales au sein des infections mixtes naturelles dans les vecteurs va avoir des conséquences sur la spécificité de leur transmission (Ferguson & Read 2002 ; Boete & Paul 2005).

Ainsi, l'augmentation des cas cliniques dus à *P. vivax* en Asie du Sud-Est a été attribuée à un changement dans l'abondance et la composition de la population vectrice, avec une augmentation globale de la susceptibilité de la population vectorielle à ce parasite (l'utilisation d'antipaludiques efficaces contre *P. falciparum* étant également avancée, Limrat et al. 2001 ; Somboon et al. 1994 cités par Boete & Paul 2005). Une différence dans le comportement piqueur entre les vecteurs infectés avec *P. vivax* et ceux infectés avec *P. falciparum*, les vecteurs infectés par *P. vivax* piquant plus tôt dans la nuit que les autres, a été observée (Bockarie & Dagoro 2006) : les personnes dormant sous moustiquaires imprégnées étaient ainsi plus infectées avec *P. vivax*, expliquant en partie le changement de prévalences relatives *P. vivax*/*P. falciparum* après l'introduction des moustiquaires.

Les différentes espèces de *Plasmodium* humains diffèrent donc dans leur biologie chez l'homme (distribution, stratégie de transmission) (Reece et al. 2005) et chez le vecteur, et dans leur épidémiologie, *P. falciparum* étant par exemple plus vulnérable aux mesures de

lutte (Paul et al. 2002b). Les interactions et les dynamiques complexes des différentes espèces et génotypes de parasites, en interaction avec les dynamiques des différentes espèces vectrices hôtes locales, ont donc un impact sur le recrutement parasitaire et la transmission. L'analyse du portage parasitaire au sein d'espèces vectrices sympatriques dans différents foyers de transmission est donc essentielle pour l'élucidation du rôle de l'espèce vectrice sur la transmission.

4.3 Conclusion

La dimension de l'hôte vecteur n'a encore jamais été prise en compte dans la structuration génétique des populations naturelles de *P. falciparum*, et pourtant de très nombreux facteurs, intrinsèques et extrinsèques, suggèrent que le rôle de l'espèce hôte anophèle peut être déterminant : les patrons de recrutement parasitaire et du développement parasitaire sont très différents entre espèces, avec des conséquences potentielles majeures en terme de distribution des parasites au sein et entre les espèces vectrices au sein d'un site de transmission. Nous avons donc pris en compte ce facteur dans notre échantillonnage pour déterminer l'impact du vecteur sur la distribution du parasite et sur la structure génétique de ses populations au sein des sites de transmission. Dans la perspective d'un contrôle vectoriel transgénique par remplacement d'une espèce vectrice par son homologue modifié, l'analyse du portage parasitaire des différentes espèces est essentielle.

Matériels et méthodes

1 Site d'étude : le Cameroun

Notre étude a été conduite au Cameroun, pays d'Afrique Centrale marquant la charnière avec l'Afrique de l'Ouest. Le Cameroun s'étale sur plus de 1250 km depuis ses façades atlantique et forestière au Sud jusqu'au désert du Tchad au Nord. Il condense ainsi les caractéristiques éco-épidémiologiques de ces deux grandes régions africaines dans son paysage, son climat et sa végétation. On y retrouve en conséquence la totalité des vecteurs africains d'importance majeure impliqués dans la transmission du parasite, transmettant les trois espèces *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*.

1.1 Diversité biogéographique camerounaise

La superficie du Cameroun est de 465000 km² pour une population de 10 à 16 millions d'habitants. Situé au croisement des courants migratoires séculaires des peuplades soudanaises, peules et bantoues le pays compte plus de 230 ethnies réparties en cinq grands groupes : Soudanais, Chamites et Sémites au Nord, Bantous et Pygmées au Sud. Du Nord au Sud, le pays déroule sur toute sa longueur les différentes zones écoclimatiques du continent africain sub-saharien : la zone forestière équatoriale au Sud (Plateau Central) se prolonge par des formations post-forestières jusqu'au plateau de l'Adamaoua. Au-delà de la limite nette que constitue la falaise septentrionale de l'Adamaoua, les savanes arbustives soudano-guinéenne et les steppes à épineux se succèdent vers le Nord. (Voir les différentes zones climatiques indiquées sur la carte du relief camerounais, Illustration 1).

La végétation au Cameroun est donc un condensé de celle de l'Afrique intertropicale, avec forêts denses humides au Sud, savanes au Centre, steppes au Nord, et forêt et prairies de montagne à l'Ouest, cette zonalité étant en relation étroite avec celle du climat (Olivry 1986). Quatre régions climatiques principales sont distinguées :

- (i) Climat équatorial guinéen avec 4 saisons dont deux mois moins humides couvrant tout le sud du pays ; précipitations annuelles de 1500 à 2000 mm ; température moyenne de 25°C par an et amplitude moyenne par an de 2,4°C ;
- (ii) Climat équatorial de type camerounien avec mousson équatoriale (2 saisons et 0 à 3 mois moins humides) sur les côtes et les régions montagneuses, abondantes précipitations de 2000 à 10000 mm sur le Mont-Cameroun ;
- (iii) Climat soudanien ou tropical humide avec une saison sèche et une saison des pluies (6 mois-6 mois): c'est le climat du plateau de l'Adamaoua au centre du Cameroun ; les précipitations sont de 900 à 1500 mm, la température moyenne de 28°C, amplitude 6,4°C ;

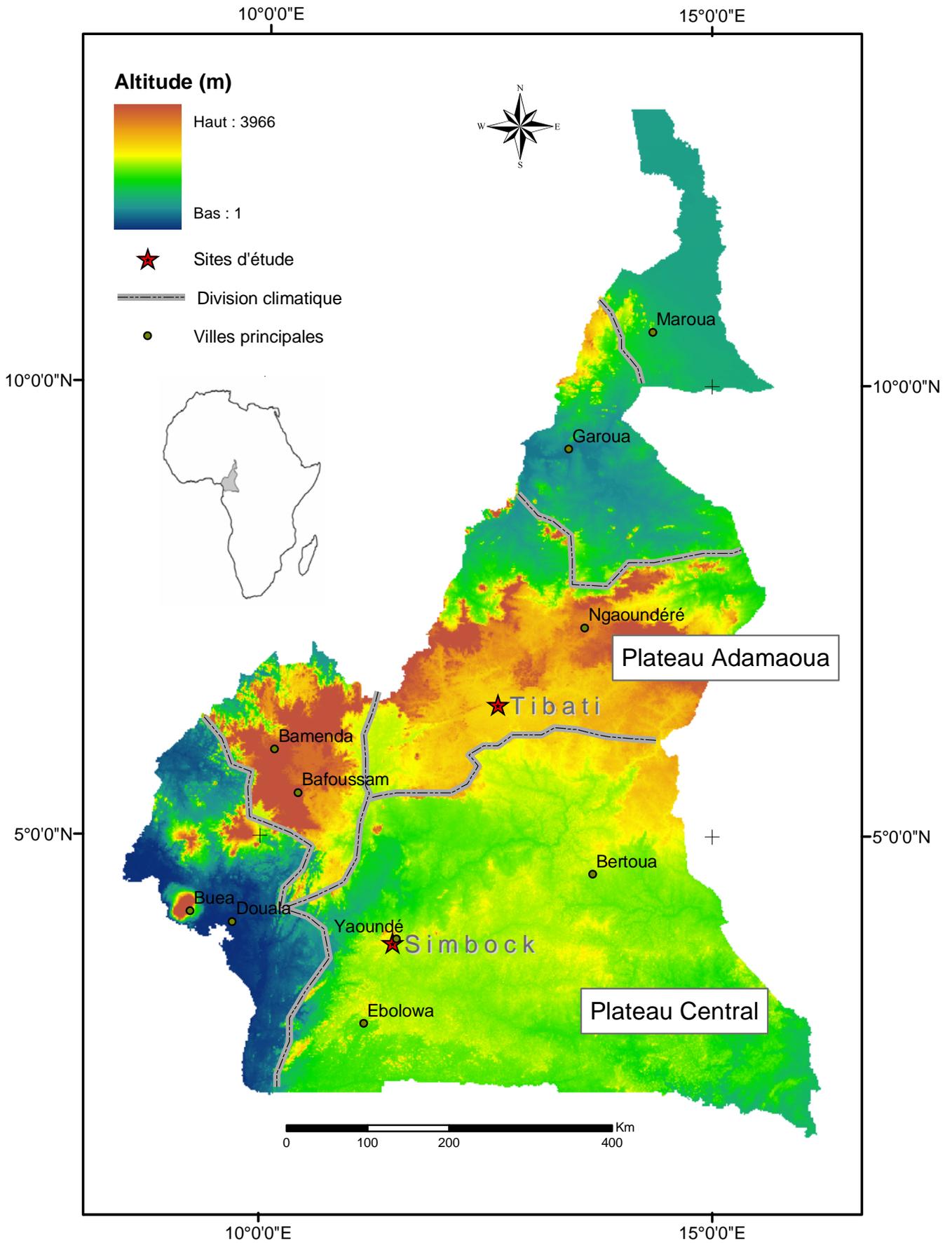


Illustration 1. Position géographique des sites de Simbock et Tibati sur la carte du relief du Cameroun. (Source: D. Ayala, UR016, IRD).

- (iv) Climat soudano-sahélien : plus de 7 mois de sécheresse ; les précipitations annuelles varient de 400 à 900 mm, la température moyenne est de 28°C et l'amplitude de 7,7°C.

1.2 Description des deux sites camerounais

L'hétérogénéité et la complexité de la transmission du paludisme en Afrique, dont nous venons de voir les principaux acteurs et les traits généraux, sont illustrées par les deux sites que nous avons choisis au Cameroun pour y mener notre étude. Choisis justement en raison de la complexité du système vectoriel, et de la forte intensité de transmission pérenne des parasites *Plasmodium* que ces vecteurs y entretiennent, ces sites diffèrent cependant entre eux par leurs caractéristiques bioclimatiques, et donc par la nature et la dynamique relative des profils entomologiques conditionnant la transmission au cours de l'année.

1.2.1 Simbock, village de forêt en périphérie urbaine

▪ Vecteurs et transmission à Simbock :

Le village de Simbock (3°50'N, 11°30'E) est situé en zone de forêt équatoriale rurale dégradée en proche périphérie urbaine (à 2 km de Yaoundé, capitale du Cameroun, voir l'illustration 1), et comprend 300 à 400 habitants. Un suivi étude entomologique longitudinal y a été conduit de novembre 1998 à septembre 2000 (Antonio-Nkondjio et al. 2002). Les vecteurs présents étaient *An. gambiae* s.s. (formes M et S), *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. *Anopheles moucheti* était l'espèce la plus abondante, représentant 54% des anophèles capturés sur deux ans. Le taux annuel d'inoculation entomologique annuel de *P. falciparum*, mesuré par la technique ELISA était de 277 pour la première année et de 368 pour la seconde. La transmission à Simbock est distribuée entre les 4 espèces vectrices tout au long de l'année (Figure 7), avec de fortes variations dans l'intensité et l'implication des différentes espèces vectrices de mois en mois.

▪ Description des cases de collecte :

Les récoltes entomologiques ont été réalisées dans le « bloc 6 » du village de Simbock. Les habitants y vivent toute l'année, la plupart travaillant en ville et rentrant le soir. Les maisons sont constituées de murs de banco (terre et végétaux) ou de ciment, avec un toit de tôle. Le sol est cimenté ou de terre battue. Les habitants dorment dans la pièce principale ou dans des pièces attenantes, la plupart du temps sans moustiquaires.

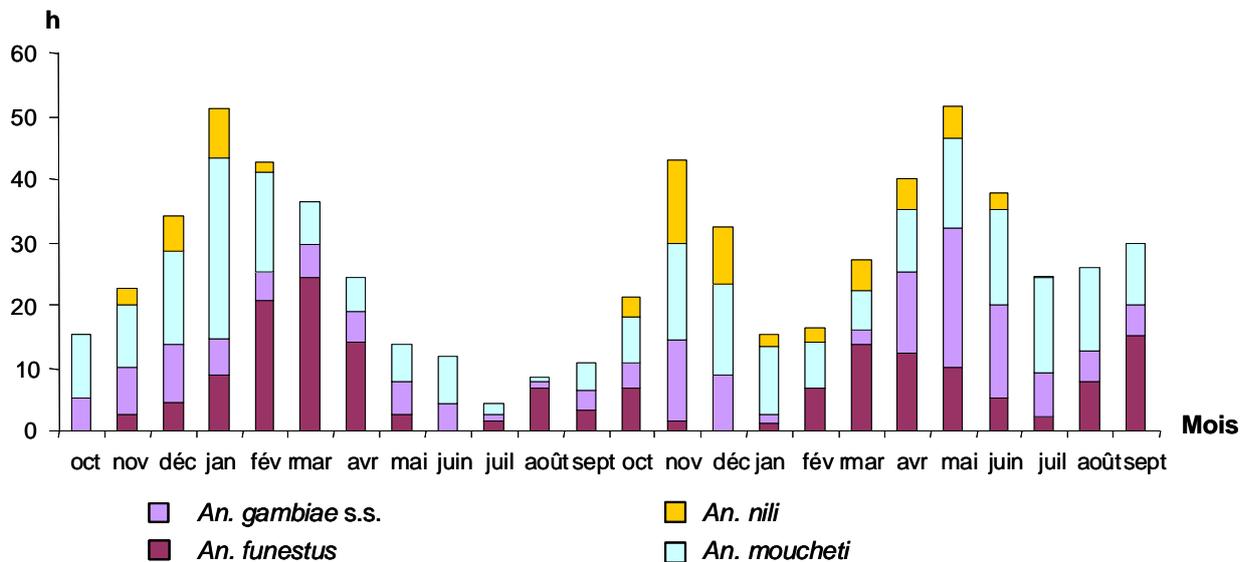


Figure 7. La transmission du parasite *P. falciparum* à Simbock par les quatre espèces vectrices sympatriques *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. La participation relative des quatre espèces vectrices dans la moyenne mensuelle du nombre de piqûres infectées reçues par homme (taux d'inoculation entomologique h) est représentée pour chaque mois de l'année à Simbock. Les fréquences des piqûres varient au cours de l'année selon les dynamiques des densités agressives de chaque espèce de vecteur, mais la transmission reste pérenne (Figure modifiée d'après Antonio-Nkondjio et al. 2002).

Le bétail n'est pas présent dans la zone équatoriale du sud Cameroun. Les animaux consistent en quelques chiens, chèvres, cochons, poulets occasionnels. Les hommes représentent donc la source principale des repas de sang dans le village (Antonio-Nkondjio et al. 2002). Simbock est environné d'une grande diversité de gîtes, expliquant la grande diversité des espèces anophèles vectrices présentes tout au long de l'année. La rivière Mefou qui coule une centaine de mètres en amont du « bloc 6 » est un gîte pour les espèces *An. nili* et *An. moucheti*. Des étangs de pisciculture, des zones marécageuses, ainsi que les flaques d'eau temporaires bordant la piste et abondantes lors des pluies sont autant de gîtes disponibles pour les espèces *An. gambiae* et/ou *An. funestus*.

Les échantillonnages ont été effectués dans 10 maisons du « bloc 6 », distantes les unes des autres de 2 km au maximum. Le climat est équatorial, la petite saison des pluies s'étend de mars à juin, la grande saison des pluies de septembre à novembre. Il pleut en moyenne 1500 mm par an, les températures moyennes minimum et maximum étant chaudes, de 18-25°C en juillet à 20-29°C en mars.

1.2.2 Tibati, village rural en transition forêt-savane, en bordure de lac

▪ Vecteurs et transmission à Tibati :

Le village de Tibati (6°28'N, 12°37'E) est situé à environ 320 km au nord de Simbock, en zone rurale, en proche bordure du grand lac Panyéré sur le plateau de l'Adamaoua. La zone est qualifiée de « château d'eau du Cameroun » en raison de son réseau hydrographique dense (lacs et rivières) en altitude (voir l'Illustration 1 et l'Annexe 1).

Tibati présente également une grande variété de gîtes, associée à une grande diversité de vecteurs anophèles. La rivière Meng, les abords du lac plantés de végétation droite, l'irrigation des cultures maraîchères, les mares et les flaques temporaires (voir l'Illustration 2 dans les Résultats complémentaires) constituent autant de gîtes pour les espèces *An. gambiae* et *An. funestus*, très abondantes, ainsi que pour les espèces *An. nili*, *An. pharoensis* et *An. ziemanni*.

L'agressivité anophélienne est relayée tout au long de l'année à Tibati par les quatre espèces principales *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. nili* et *An. pharoensis*, mais 9 espèces anophèles vectrices du parasite sont présentes au total sur la zone (Antonio-Nkondjio et al. 2006). L'agressivité totale évolue de façon asynchrone par rapport à la pluviométrie, avec des pics d'agressivité de novembre à mars, période de plus faible pluviométrie. *Anopheles funestus* est présent tout au long de l'année avec de fortes densités pendant la saison sèche. Ce vecteur assure l'essentiel de l'agressivité, suivi de *An. gambiae* présent tout le long des mois pluvieux et en début de saison sèche, où le pic de piqûres est observé. *Anopheles pharoensis* vient ensuite, présent uniquement pendant la saison sèche avec de fortes densités de piqûres. L'agressivité d'*An. nili* est plus négligeable, observée également pendant la saison des pluies. Ainsi, même si le climat est saisonnier à Tibati, la transmission y est pérenne, car le lac y entretient des gîtes permanents à *An. funestus*, dont les densités sont ainsi moins dépendantes des pluies. (Source F. Simard, UR016, IRD, comm. pers.).

▪ Description des cases de collecte :

Environ 20000 habitants vivent à Tibati. La ville est composée de plusieurs quartiers distincts, reliés entre eux par une piste goudronnée. Elle est bordée par le lac Panyéré et par la rivière Meng. Les collectes ont été effectuées dans 9 maisons réparties dans 3 quartiers de la ville (voir l'Annexe 1). Cinq maisons ont été choisies en bordure du lac Panyéré, deux autres maisons en bordure de la rivière Meng, et les deux dernières à mi-chemin, en bord de route menant à la rivière Meng. Ces quartiers sont distants les uns des autres de 2 à 5 km. Comme à

Simbock, les habitations sont construites en banco avec un toit de tôle. Les maisons sont organisées en concessions délimitées les unes des autres par des murs, et où se regroupe la famille élargie. Le bétail n'est pas présent autour des maisons. Quelques chiens, mais surtout chèvres et poulets sont présents en grand nombre autour et dans les concessions. Le climat est tropical humide de type guinéen, avec 1500 mm de pluie par an, et une saison des pluies, de mars à octobre.

Les lieux de vie dans ce village du nord-Cameroun sont organisés différemment de ceux du sud, les concessions bien délimitées sont plus larges que les maisons individuelles de Simbock. Le mode de vie y est également différent, les familles (avec adultes) étant plus fidèles à leur lieu d'habitation. La stabilité de la population occupant les lieux de vie à Simbock et Tibati est donc différente, peut-être plus stable à Tibati. La population de Tibati appartient à l'ethnie des Chamites et Sémites, alors que le sud forestier du Cameroun est peuplé de populations Bantoues. Ces appartenances ethniques différentes ont des conséquences sur la composition génétique intrinsèque du système immunitaire inné des populations (Dolo et al. 2005), mais également sur leur comportement (migration au sein du village, exposition différentielle aux piqûres). Ces différences sont à prendre en compte dans l'interprétation d'éventuelles microstructures locales des populations parasitaires.

2 Echantillonnage du parasite chez les deux hôtes homme et anophèle

2.1 Stades sanguins : collecte et traitement des échantillons

Les échantillonnages de sang périphérique ont été réalisés à Simbock en mars 2003 (fin de la petite saison sèche) et novembre 2004 (fin de la grande saison des pluies), et à Tibati en septembre 2003 (fin de saison des pluies) pendant l'échantillonnage des anophèles, en fin de première semaine de captures (et également en fin de deuxième semaine si nécessaire). La population échantillonnée était constituée des habitants des maisons de captures, ainsi que des captureurs recrutés. Une autorisation éthique a été obtenue auprès du Ministère de la Santé camerounais, ainsi qu'un consentement informé des populations. Les personnes présentant une température axillaire supérieure à 37,5°C étaient prises en charge médicalement.

Le protocole suivi pour le prélèvement du sang périphérique a été le même dans les deux villages échantillonnés. Chaque individu a subi un questionnaire renseignant ses nom, prénom, sexe, âge, maison et village d'habitation, et la température axillaire a été mesurée. Quelques gouttes de sang perlant au bout du doigt piqué d'une aiguille jetable sont ensuite

récupérées sur chacune des quatre extrémités des filtres IsoCode Stix® (Schleicher & Schuell, BioScience, maintenant commercialisés par Whatman, BioScience sous le nom Papier FTA®) utilisés pour les prélèvements. Une goutte épaisse est ensuite effectuée sur lame, pour lecture au microscope du statut de l'infection. Les filtres numérotés sont séchés à l'air libre et stockés individuellement, avant d'être transportés au laboratoire et séchés complètement pendant 2H au four à 80°C. Ils sont ensuite stockés définitivement en sachets individuels avec un dessiccatif à 4°C avant leur transport à Montpellier.

Les résultats des gouttes épaisses et de la prise de température axillaire étaient communiqués aux habitants des villages la semaine suivant les prélèvements. La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) et du paracétamol étaient distribués en cas de présence de stades infectants de *Plasmodium* chez les enfants au dessus de 5 ans, les adolescents et les adultes. Du Coartem® (artéméther-luméfantrine) en sirop était administré aux enfants infectés entre 3 mois et 5 ans.

2.2 Stades chez le vecteur : collecte et traitement des moustiques

2.2.1 Captures nocturnes stationnaires directes sur l'homme

Dans ce type de captures, l'homme est à la fois le piège et le collecteur. La capture de moustiques directement sur leur hôte naturel (dans ce cas l'homme) est la méthode la plus fiable pour récolter spécifiquement la faune agressive. Les captureurs, équipés d'une lampe de poche et d'un tube à hémolyse transparent, prennent place dans un coin tranquille à l'intérieur (prés des dormeurs dans la mesure du possible) et/ou à l'extérieur de la maison, sur le pas de la porte. A partir d'une certaine heure, tous les habitants sont couchés, et il devient inutile de capturer à l'extérieur, c'est pourquoi la mission de Simbock 2004 n'a été menée en extérieur que de 20H à 23H, le poste externe passant en intérieur à partir de 23H. Toutes les missions précédentes à Simbock et Tibati (2002 et 2003) ont cependant été menées aux deux postes, pour comprendre les habitudes des vecteurs quand ils ont le choix entre les deux possibilités, et parce qu'une part substantielle de la faune se nourrit dehors (voir Antonio-Nkondjio et al. 2002 à Simbock).

Les moustiques sont récoltés avant la piqûre directement dans le tube, refermé avec du coton. Les spécimens sont référencés pour de nombreuses caractéristiques : date, village, maison, tranche horaire de récolte (première ou deuxième moitié de nuit), intérieur ou extérieur. Les anophèles et autres culicidés sont triés et comptés au petit matin. Deux équipes de captureurs se relaient aux deux postes de captures par maison, de 20H à 01H et de 01H à 06H du matin.

Cette méthode de récolte permet d'avoir accès spécifiquement à la faune anophélienne anthropophile et est la seule à ce jour permettant l'estimation du taux de piqûres par homme et par nuit, paramètre qui intervient dans le calcul du taux d'inoculation entomologique (h) et dans l'estimation de la capacité vectorielle. Tous les biais qui peuvent affecter le nombre de piqûres normalement reçues par un homme au cours d'une nuit vont donc affecter les estimations de ces paramètres clés : une attraction différentielle des hôtes pour les vecteurs (Lacroix et al. 2005), qui contredirait le présupposé du choix aléatoire de l'hôte par l'anophèle ; l'existence de repas interrompus (Klowden & Briegel 1994) ; l'excès de captures par rapport aux anophèles qui se seraient naturellement présentés pour prendre effectivement un repas de sang, etc. Ces biais soulignent toute la difficulté d'une évaluation correcte du taux de piqûre subi par homme et par nuit (et donc de la transmission) dans les conditions naturelles.

2.2.2 Captures de la faune anophélienne

- **Simbock :**

Les récoltes entomologiques à Simbock ont été réalisées selon le protocole décrit à trois reprises :

- (i) Octobre-novembre 2002 (fin de la grande saison des pluies) : 7 nuits de captures ;
- (ii) Mars 2003 (petite saison des pluies) : 9 nuits de captures ;
- (iii) Novembre 2004 (fin de la grande saison des pluies) : 12 nuits de captures.

Les récoltes ont eu lieu à chaque fois dans les dix mêmes maisons du « bloc 6 » du village de Simbock (deux maisons ayant été retirées du lot en 2004 car non-productives). Les captures ont été effectuées en intérieur et extérieur, de 20H à 1H et de 1H à 6H, le captureur intérieur étant placé dans ou proche la chambre à coucher dans la mesure du possible, lorsque ce n'était pas la pièce principale. Deux équipes de deux captureurs se relayaient pour assurer chaque tranche horaire de captures.

- **Tibati :**

Les récoltes entomologiques se sont déroulées en septembre 2003 pendant 11 nuits dans les 9 maisons, avec deux postes par maison en externe et en interne. Les captureurs étaient recrutés dans tous le village, n'habitant donc pas toujours dans la maison de capture.

2.3 Identification morphologique et moléculaire

Les anophèles présentent une morphologie caractéristique qui permet de les différencier relativement aisément des autres genres de moustiques récoltés par les collecteurs. Leur petite taille, leur forme fuselée et leurs ailes mouchetées permettent un premier tri de ce genre à l'œil nu. Les spécimens anophèles sont ensuite identifiés morphologiquement selon les clés d'identification de Gillies & De Meillon (1968) et Gillies & Coetzee (1987). Ces clés permettent de distinguer entre eux les groupes et les complexes d'espèces anophèles africains, mais ne permettent pas l'identification des espèces au sein du groupe ou du complexe. Nous avons donc utilisé les techniques moléculaires d'identification d'espèces par PCR pour identifier les espèces *An. gambiae* (Scott et al. 1993), *An. gambiae* formes M ou S (Favia et al. 2001), *An. funestus* (Koekemoer et al. 2002) et *An. nili* (Kengne et al. 2003). Les trois types morphologiques de l'espèce *An. moucheti* s.l. sont présents à Simbock, seule localité où ce vecteur a été récolté, mais aucune différenciation indicative d'une éventuelle spéciation n'ayant été détectée entre ces trois formes au sud-Cameroun (Antonio-Nkondjio et al. 2007), *An. moucheti* dans cette localité peut être considérée comme une seule espèce génétiquement homogène.

2.4 Dissection des moustiques et recherche des stades infectants du parasite

Après identification morphologique à la loupe des groupes et complexes d'espèces anophèles, les spécimens ont été endormis au froid, puis les estomacs disséqués à l'aide d'aiguilles à dissection dans une solution saline (PBS 5%) sous loupe binoculaire. L'infection en oocystes des estomacs a été vérifiée au microscope directement sur la lame sans lamelle, et sans coloration spécifique. Les oocystes des estomacs infectés ont été comptés au microscope, puis les estomacs ont été conservés dans l'alcool à 80% pour traitement à Montpellier. Les carcasses des spécimens disséqués ont été conservées dans des tubes contenant un dessiccatif.

2.5 Dissection et isolement des oocystes

La dissection des oocystes a été effectuée à la main avec mandrins et minuties (pointes 20 μm) sur un microscope inversé micromanipulateur de type Leica DM IRB, sans utiliser les manettes de micromanipulation. Les estomacs conservés dans l'alcool absolu ont été réhydratés dans deux bains d'alcool successifs à 70°C et à 30°C. Les oocystes ont été disséqués individuellement dans une goutte d'alcool à 30°C, régulièrement réhydratée à l'eau distillée maintenue à 4°C. Les minuties ont été renouvelées entre chaque oocyste isolé. Un

oocyste isolé est récupéré dans la goutte de dissection par capillarité dans l'extrémité d'une pipette Pasteur en verre effilée à la flamme. L'oocyste est conservé individuellement dans un tube Eppendorf® 0,5 ml contenant 10 µl d'eau distillée, et stocké à -20°C avant extraction.

3 Caractérisation moléculaire des stades sanguins et vectoriels

3.1 Extraction de l'ADN

- **Stades sanguins :**

L'ADN des stades sanguins a été extrait à partir d'un triangle unique des filtres IsoCode Stix® utilisés pour l'échantillonnage du sang périphérique, en suivant le protocole fourni par Schleicher & Schuell (Keene N.H. 03431 USA) et élué dans 100 µl d'eau distillée.

- **Stades oocystes :**

L'ADN des oocystes a été extrait en suivant les instructions du protocole du DNeasy Tissue Kit fourni par QIAGEN, spécialisé pour les extractions de très petites quantités d'ADN et élué dans 60 µl de tampon (voir Article 1 et Razakandrainibe et al. 2005).

3.2 Génotypage : les marqueurs microsatellites

3.2.1 Les microsatellites chez *P. falciparum*

Les microsatellites sont considérés comme sélectivement neutres, hypervariables, codominants et locus-spécifiques. Le génome de *P. falciparum* est particulièrement riche en A/T (80,6%). Les premiers microsatellites isolés chez ce pathogène (Su & Wellems 1996) ont mis en évidence la prédominance des motifs répétés $[TA]_n$, $[T]_n$ et $[TAA]_n$, motifs similaires aux motifs retrouvés chez les plantes, alors que le motif typique des génomes de mammifères, $[CA]_n$, y est absent. Les séquences microsatellites sont abondamment réparties dans le génome de *P. falciparum*, retrouvées toutes les 2-3 kb, et prédominantes dans les introns (espacées de 50-100 pb dans ces régions, elles y constituent en moyenne 19% de la séquence intronique), ou les séquences flanquantes des séquences codantes (Hartl 2004). Le taux moyen de mutation des séquences microsatellites a été estimé à $1,6 \cdot 10^{-4}$ (Su & Wellems 1996). Ces caractéristiques de *P. falciparum* sont très différentes de celles de *P. vivax*, dont le contenu en G/C est double, et l'abondance en microsatellites moindre (Leclerc et al. 2004).

Les approches globales (Mu et al. 2007 ; Volkman et al. 2007) tirant parti des progrès de la génomique et de la bioinformatique ne sont pas encore appliquées aux effectifs des

études de génétique des populations, et les approches de génotypage multilocus utilisant des marqueurs neutres sont encore d'actualité pour l'étude de la structure des populations naturelles de ce parasite.

3.2.2 Description des marqueurs microsatellites utilisés

Les 7 marqueurs microsatellites trinuécléotidiques que nous avons utilisés (POLY α , chr. 4 ; TA60, chr. 5 ; ARAII, chr. 11 ; Pfg377, chr. 12 ; Pfpk2, chr. 12 ; TA87, chr. 6 ; TA109, chr. 6) sont les mêmes que ceux qui ont été utilisés par Razakandrainibe et al. (2005) (Tableau 1). Ils ont eux-mêmes été choisis parmi les 12 marqueurs sélectionnés par Anderson et al. (2000b), ce qui permet la comparaison de nos résultats avec ces études. Ces 7 locus sont répartis sur 5 chromosomes différents, deux paires de locus étant situées sur un même chromosome (chr. 12 et chr. 6).

Anderson et al. (2000b) ont comparé les modèles évolutifs suivis par les séquences microsatellites chez *P. falciparum* avec ceux d'autres taxa. Ils ont ainsi analysé la variation nucléotidique de leurs marqueurs par séquençage des allèles obtenus à partir d'isolats de PNG et de République Démocratique du Congo (RDC) pour leurs 12 séquences microsatellites composées de répétitions de motifs tri-nuécléotidiques. Parmi ces 12 locus figurent les sept locus que nous avons utilisés, aucune mutation n'ayant été observée par les auteurs dans les régions flanquantes de l'ensemble de ces locus, pour aucun des 66 allèles séquencés en PNG et en RDC. La probabilité d'obtenir des allèles nuls à partir de ces locus apparaît donc faible.

3.2.3 PCR et lecture du polymorphisme allélique

Les techniques d'amplification utilisées pour les très petites quantités d'ADN contenues dans un oocyste ont été détaillées (Anderson et al. 2000b ; Anderson et al. 1999 ; Razakandrainibe et al. 2005). La PCR semi-nichée permet par rapport à une PCR nichée d'éviter les bandes contaminantes dues aux produits d'amplifications par les amorces du premier tour d'amplification. Les amorces ont été multiplexées pour les premier et second tours d'amplification, et chaque oocyste repris individuellement en cas d'échec ou de doute à l'amplification.

Les logiciels GENESCAN et GENOTYPER (Applied Biosystem Prism 310) ont été utilisés pour la lecture des tailles des allèles microsatellites amplifiés, par rapport à une échelle standard (Genescan 500LIZ).

Tableau 1. Description de la structure des sept locus microsatellites utilisés et séquences nucléotidiques des amorces.

Locus	Numéros d'accésion GenBank	Origines de la variation de taille		Séquences des amorces utilisées			
		Trinucleotides	Autre				
Poly α	AF166139-43	(AAT)	Minisatellite contenant les microsatellites [(AAT) ₄ (AAC)(AAT) ₁₂]	F	5'	AAA ATA TAG ACG AAC AGA	3'
				R	5'	ATC AGA TAA TTG TTG GTA	3'
				R*	5'	GAA ATT ATA ACT CTA CCA	3'
TA109	AF166157-66	(CTA)	Minisatellite contenant les microsatellite [GAT(AAT) ₃] ₂₄	F	5'	CTC AAA GAA AAA TAA TTC	3'
				F*	5'	TAG TAA CGA TGT TGA CAA	3'
				R	5'	AAA AAG GAG GAT AAA TAC AT	3'
TA87	AF166152-6	(AAC)/(AAT)	/	F	5'	GTA CAT ATG AAT CAC CAA	3'
				F*	5'	GAA TAA ACA AAG TAT TGC	3'
				R	5'	GCT TTG AGT ATT ATT AAT A	3'
ARAI	AF166128-130	(AAT)	/	F	5'	GAT CTC AAC GGA AAT TAT	3'
				R	5'	TTA TGT TGG TAC CGT GTA	3'
				R*	5'	TTA TCC CTA CGA TTA ACA	3'
PfG377	AF166131-3	(AAT)	/	F	5'	CTT TCA TCG ATA CTA CGA	3'
				R	5'	CCT CAG ACT GAA ATG CAT	3'
				R*	5'	AAA GAA GGA ACA AGC AGA	3'
PfPK2	AF166134-8	(TTA)	/	F	5'	ATG GGT TAA ATG ACG TAG A	3'
				F*	5'	AAT GGC AAC ACC ATT CAA C	3'
				R	5'	ACA TGT TCA TAT TAC TCA C	3'
TA60	AF166144-6	(AAT)	/	F	5'	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T	3'
				F*	5'	GGT TAA ATC AGG ACA ACA T	3'
				R	5'	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA	3'

F : amorce Forward, R : amorce Reverse, R* : amorce Reverse marquée, F*, amorce Forward marquée. (Source : Anderson et al. 1999, 2000b).

4 Analyses statistiques

4.1 Logiciels de génétique des populations

4.1.1 FSTAT version 2.9.4

- **Estimation des F-statistiques :**

La mesure directe des deux paramètres F_{IS} et F_{ST} est impossible (cf. Intro. biblio. Partie 2, Par. 1.2). Différents estimateurs des F -statistiques à partir d'échantillons représentatifs de la population ont été proposés (Weir & Cockerham 1984; Robertson & Hill 1984; Raufaste & Bonhomme 2000), le choix d'une méthode se basant sur deux critères : l'absence de biais (l'espérance mathématique de l'estimateur est égale à la valeur du paramètre) et la variance minimale. La meilleure méthode, la plus utilisée (notamment par le logiciel FSTAT que nous avons utilisé) est la méthode de (Weir & Cockerham 1984). Elle est basée sur une analyse de variance hiérarchisée (ANOVA) de la variable aléatoire fréquence allélique. Cette variable est définie pour chaque allèle. Les sommes des carrés des écarts dues aux effets : (i) des allèles dans les individus ; (ii) des individus dans les sous-populations ; et (iii) des sous-populations dans la population totale, sont calculées. Les estimateurs de F_{IS} et F_{ST} sont respectivement f et θ .

Les F -statistiques, le déséquilibre de liaison, les hétérozygoties attendues et observées ont été estimés et testés selon les procédures des versions 2.9.3 et 2.9.4 du logiciel FSTAT (Goudet 1995). La version 2.9.4 diffère de la précédente dans la procédure du calcul du déséquilibre de liaison, avec l'estimation de deux nouveaux paramètres, Δ' et R , et a été utilisée pour cela (voir également les Matériels & Méthodes des Articles 1, 2 et 3).

- **Calcul et test du déséquilibre de liaison génotypique :**

Ils ont été réalisés avec le logiciel FSTAT version 2.9.4. Ce logiciel calcule deux coefficients du déséquilibre de liaison génotypique composite, Δ' et R . L'association des allèles à deux locus ou plus peut être vérifiée. La mesure classique du déséquilibre de liaison gamétique est $D = p_{AB} - p_A p_B$ où p_{AB} représente la fréquence du gamète portant l'allèle A au premier locus et B au second, et p_A et p_B représentent la fréquence des allèles A et B respectivement (voir l'Encadré 2).

Avec des données génotypiques, l'estimation du déséquilibre gamétique est impossible à moins de supposer que chaque locus est à l'équilibre de Hardy-Weinberg, car les haplotypes des gamètes qui ont formé les doubles hétérozygotes ne peuvent être déduits. Le déséquilibre de liaison génotypique composite, Δ_{AB} , intervient dans ce cas. Δ_{AB} cependant possède un

désavantage majeur : l'échelle possible des valeurs est très dépendante des fréquences alléliques. Weir (1979, 1996) cité par (Goudet, notice FSTAT 2.9.4) ont donc suggéré un autre coefficient, R_{AB} , qui prend en compte l'excès d'homozygotes aux locus A et B , c'est-à-dire la variance de la fréquence allélique de l'allèle A , compte tenu de sa fréquence p_A et de l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg, D_A . L'estimateur multi-allélique de R^2 est calculé par FSTAT 2.9.4, d'après l'estimateur multi-allélique du Δ' (Zapata 2000) cité par Goudet (FSTAT 2.9.4). Ce dernier est calculé d'après la moyenne pondérée du $|\Delta_{AB}|$, où la pondération est la fréquence attendue du gamète, $p_A p_B$.

La significativité de l'association entre les génotypes de chaque paire de locus dans chaque échantillon est testée en utilisant la statistique G . Pour ce test (Zaykin 1995) cité par (Goudet, FSTAT 2.9.4), la fréquence du génotype aux deux locus est le produit des fréquences des deux génotypes à un locus : il est donc valide même si les locus ne sont pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg. La P -value du test est obtenue comme suit : les génotypes aux deux locus sont associés aléatoirement un grand nombre de fois, et la statistique est recalculée sur le jeu de données randomisé. La P -value est estimée comme la proportion de statistiques du jeu de données randomisé qui sont supérieures ou égales à la statistique observée. Le test que nous avons effectué est le test entre toutes les paires de locus dans chaque échantillon, donnant la P -value pour chaque paire de locus dans chaque échantillon et globalement. Le nombre de randomisations est fixé par le seuil nominal pour les tests multiples (ce seuil tient compte des corrections de Bonferroni).

4.1.2 HIERFSTAT version 0.04-2

- **Estimation des F-statistiques hiérarchiques :**

Entre les deux paramètres F_{IS} et F_{ST} , seul change le niveau de hiérarchie auquel on se place : l'individu, ou la sous-population. Ainsi, pour une hiérarchie à plus de deux niveaux, le principe des probabilités d'identité reste le même. Pour le type d'analyse que nous avons menée, le nombre de niveaux hiérarchiques était de trois ou plus : individu oocyste, infrapopulations d'oocystes au sein de chaque moustique, sous-populations des moustiques dans chaque village, population totale.

Weir (1996) a étendu le principe de l'analyse de variance hiérarchisée de la variable aléatoire fréquence allélique pour estimer les F -statistiques à trois et quatre niveaux hiérarchiques. Yang (1998) a proposé une méthode pour étendre la méthode d'estimation des F -statistiques utilisée par Weir (1996) à un nombre arbitraire de s niveaux hiérarchiques en utilisant les estimateurs ANOVA des F -statistiques. Les composants de la variance allélique

sont moyennés sur les différents allèles et locus, et les F -statistiques estimées à partir de la moyenne des composants de la variance (Weir & Cockerham 1984).

▪ **Description de HIERFSTAT :**

Le package HIERFSTAT (Goudet 2005) a été conçu pour être utilisé dans le logiciel de statistique gratuit R version 2.3.0 (2005). HIERFSTAT permet d'estimer et de tester les F -statistiques hiérarchiques pour un nombre quelconque de niveaux hiérarchiques. Nous avons utilisé ce logiciel pour prendre en compte tous les niveaux de structure hiérarchiques de notre jeu de données :

- (i) L'individu oocyste ;
- (ii) Les oocystes regroupés au sein de l'individu hôte moustique (i.e. infrapopulation) ;
- (iii) Les oocystes dans les individus moustiques eux-mêmes regroupés en sous-populations selon les différents niveaux de structure spatiale (case, quartier, village ou région en Afrique) ;
- (iv) Les oocystes dans la population totale (voir Matériels & Méthodes de l'Article 1).

Or les F -statistiques classiques sont définies pour une hiérarchie à deux niveaux : individu et sous-populations, au sein de la population totale. HIERFSTAT implémente l'algorithme de (Yang 1998) pour le calcul des composants de la variance des fréquences alléliques applicable à un nombre aléatoire de niveaux hiérarchiques, et propose l'estimation des F -statistiques hiérarchiques ainsi que le test par randomisations de la significativité des différents niveaux de structure.

Nous avons utilisé ce test pour estimer l'effet des différents niveaux de structuration proprement hiérarchiques, c'est-à-dire « emboîtés » dans l'espace. Le temps (facteur croisé) et l'espèce anophèle vectrice (parce que deux moustiques d'espèces différentes peuvent recruter une même infrapopulation de parasites en piquant un même homme) ne sont pas des niveaux hiérarchiques. Seuls les effets des niveaux hiérarchiques spatiaux ont donc été estimés via la méthode HIERFSTAT : l'effet de la case ou du quartier à Tibati, et l'effet de la distance entre les sites (camerounais et kenyan). Les détails de la mise en œuvre des analyses menées sur ce logiciel sont exposés dans les Matériels & Méthodes des Articles 1, 2 et 3. Le package HIERFSTAT et le logiciel R dans lequel il est implémenté sont accessibles gratuitement via internet.

4.1.3 CANOCO

▪ **Analyse multivariée de données écologiques : les méthodes d'ordination :**

Le logiciel CANOCO (Ter Braak 1987) a été développé pour l'étude des facteurs environnementaux qui affectent la composition des communautés d'espèces animales ou végétales. Les méthodes d'ordination mises en œuvre par CANOCO mettent l'accent sur le caractère continu, graduel, de la variabilité détectée. L'analyse de la composition en espèces d'un quadrat donné échantillonné va se faire à partir d'un tableau à deux entrées : les espèces en colonnes, et les échantillonnages en lignes. Les données de l'analyse pour chaque point du tableau sont projetées sur un diagramme à deux, trois ou quatre axes. La composition en espèces de la communauté biotique et les facteurs environnementaux qui l'influencent est lue sur le diagramme : elle change graduellement et de façon continue le long des gradients choisis (les axes du diagramme), la proximité sur le diagramme entre les points (représentant les échantillonnages) impliquant leur similarité dans leur composition en espèces.

- **Terminologie des fichiers d'entrée de l'analyse :**

Données primaires (*primary data*) : variables espèces, ou données d'espèces (*species data*) : matrice rectangulaire avec les lignes correspondant aux individus des échantillons (*individual samples*) composés de multiples espèces, et les colonnes qualifiant les variables individuelles (espèces, composition chimique du sol, etc.). Ce sont les variables « réponses » : elles peuvent être prédites par les variables explicatives. Les données d'espèces peuvent indifféremment concerner des espèces proprement dites ou toute autre variable dont on souhaite prédire les valeurs en fonction des variables explicatives.

Variables explicatives (*explanatory variables*) : ce sont les variables environnementales (prédicteurs) et les covariables. L'effet des covariables doit être analysé avant de se pencher sur l'effet des variables environnementales, variables prédicteurs proprement dites.

- **L'analyse CCA :**

Nous avons choisi la méthodologie statistique de l'analyse canonique par correspondance (CCA pour *Canonical Correspondance Analysis*), pour mener l'étude de l'effet du niveau de structure « espèce anophèle » sur la distribution des génotypes parasitaires oocystes au sein de chaque site et intersites.

L'analyse CCA appartient à la catégorie des méthodes de l'analyse directe de gradient. Les variables prédicteurs (explicatives) utilisées étaient l'espèce anophèle et la localisation géographique, le jeu de données des variables primaires étant constitué des différents génotypes complets (i.e. 7 locus amplifiés) d'oocystes regroupés par infrapopulation

moustique. Les génotypes oocystes sont projetés sur un diagramme le long des axes gradients expliquant un pourcentage donné de la variance allélique. Le test réalisé pour déterminer la significativité de la variable explicative est un test de Monte Carlo par permutations, d'où l'intérêt de l'utilisation de ce logiciel. Les détails de la procédure de l'analyse CCA par CANOCO, ainsi que la procédure des tests des *P*-value sont détaillés dans les Matériels & Méthodes des Articles 1 et 2.

- **Représentation graphique :**

Le logiciel d'analyse statistique SYSTAT a été utilisé pour représenter graphiquement le diagramme de projection des génotypes le long des axes gradients. Les différents génotypes d'oocystes sont projetés au sein d'une ellipse graphique dont le centroïde est une estimation du poids moyen de la population le long des axes. La position relative des centroïdes les uns par rapport aux autres (leur proximité le long des axes) représente la proximité génétique des populations entre elles.

4.2 Autres outils d'analyses statistiques utilisés

4.2.1 QUANTITATIVE PARASITOLOGY version 3.0

Ce logiciel propose l'estimation d'une série de paramètres de quantification des populations de parasites au sein de leurs hôtes (individus et populations) ainsi que des méthodes statistiques adaptées pour leur comparaison entre hôtes (Reiczigel et al. 2005). La distribution du parasite dans les hôtes est détaillée, et les méthodes statistiques prennent en compte les patrons de l'infection des hôtes par les parasites : distribution agrégée, binomiale négative, calcul de la prévalence et intensité de l'infection, mais aussi du « *mean crowding* », etc. Plusieurs tests sont proposés pour permettre la comparaison des différents paramètres de l'infection parasitaire entre espèces hôtes. Voir les sections Matériels & Méthodes des Articles 1, 2 et 3. Ce logiciel est accessible gratuitement sur internet.

4.2.2 Tests statistiques : R, JMP, SYSTAT

Se reporter aux articles pour les détails de l'utilisation de ces différents logiciels d'analyses statistiques (Articles 1, 2 et 3).

Résultats

1 Structuration génétique de *P. falciparum* en Afrique : l'impact de l'hôte vecteur

Le paludisme tue chaque année plus d'un million de personnes dans le monde. Alors que l'éradication de ce fléau reste illusoire, le développement de résistances, aussi bien chez le vecteur contre les insecticides utilisés dans le contrôle des populations vectorielles, que chez le parasite contre les médicaments antipalustres, rend urgent et nécessaire la mise au point de nouveaux moyens de lutte contre le paludisme.

Parmi les stratégies alternatives, le remplacement des populations de vecteurs naturels par des populations modifiées génétiquement pour leur conférer la résistance à l'infection par le parasite de la forme grave du paludisme, *P. falciparum*, est sérieusement envisagé et a reçu récemment de nouveaux encouragements (Marelli et al. 2007). Or, les études qui ont été menées jusqu'à présent dans ce domaine ne concernent que la seule espèce *An. gambiae* s.s., vecteur majeur africain, et dans leur très grande majorité elles ont été conduites sur des systèmes vecteur/parasite artificiels issus du laboratoire.

Les conséquences potentielles de ces limitations sont majeures. Comme on l'a vu, la très grande majorité des foyers de transmission palustre africains comprend plusieurs espèces vectrices anophèles, qui transmettent en sympatrie ou en relais tout au long de l'année les différentes espèces et génotypes de *P. falciparum*. En outre, les caractéristiques biologiques, comportementales, et d'écologie de ces différentes espèces de vecteurs sont différentes. Or, aucune étude n'a été conduite jusqu'à présent pour tenter de déterminer l'importance relative des différentes espèces anophèles dans la transmission des parasites au sein des sites de transmission.

1.1 Echelles locale, régionale et continentale : le rôle des vecteurs *Anopheles gambiae* s.s. et *Anopheles funestus*

Article 1. Annan Z., Durand P., Ayala F. J., Arnathau C., Awono-Ambene P., Simard F., Razakandrainibe F. G., Koella J. C., Fontenille D. & Renaud F. 2007. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7987-92.

En particulier, la présence en sympatrie, alternée ou non dans le temps, et dans la majorité des contextes africains de transmission, des deux vecteurs majeurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* (espèce plus négligée malgré des taux d'infection des glandes salivaires et

oocystiques plus élevés que ceux de *An. gambiae* dans certains contextes de transmission) constitue un atout majeur pour le parasite : en effet, *P. falciparum* ne pourrait sans doute pas survivre aussi bien sans la présence conjointe de ces deux vecteurs pour assurer sa transmission au cours des saisons sèches et humides dans les zones où la transmission est saisonnière (Fontenille et al. 1997 ; Minakawa et al. 2002). D'autre part, les caractéristiques du développement naturel de *P. falciparum* au sein de ses différentes espèces de vecteurs sont encore très mal connues, y compris au sein du vecteur majeur le plus étudié *An. gambiae* s.s. Les modalités de son développement ont en effet été principalement étudiées dans les systèmes de laboratoire, notamment *An. gambiae/P. berghei*, mais très peu sur le terrain, et encore moins au sein des autres espèces de vecteurs.

Du point de vue des populations du parasite, de nombreuses questions cruciales pour la mise en place d'un contrôle antipalustre efficace restent également en suspens. Une bonne connaissance des stratégies évolutives du parasite dans les différents contextes de sa transmission est primordiale pour la mise en place des nouvelles mesures de lutte, aussi bien par l'utilisation de vecteurs résistants à l'infection, que par la caractérisation de nouveaux médicaments ou par la mise au point d'un vaccin. Ainsi, la caractérisation de la diversité génétique des populations naturelles du parasite chez ses deux hôtes naturels, homme et moustique vecteur, et les patrons de la distribution de cette variabilité au sein et entre individus et populations hôtes et sites de transmission, sont autant de questions qui sont restées très peu étudiées jusqu'à tout récemment. En particulier, la question du régime de reproduction privilégié par le parasite dans ses différentes espèces vectrices au sein des foyers de transmission palustre n'a encore jamais été explorée. Les conséquences sont cependant majeures pour la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et pour son contrôle efficace : le taux de recombinaison dans les populations naturelles du parasite détermine en effet l'évolution des populations du parasite, et donc la rapidité de l'évolution de mécanismes de résistance, qu'elle soit dirigée contre de nouvelles molécules thérapeutiques, contre un vaccin, ou qu'elle soit un mécanisme de contournement à la résistance des populations vectrices modifiées génétiquement.

C'est dans ces perspectives que notre étude - dont les résultats sont présentés dans l'Article 1 ci-après - a été conduite. La structure génétique des populations naturelles d'oocystes diploïdes du parasite *P. falciparum* échantillonnées pour la première fois chez ses deux vecteurs majeurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* dans trois sites de transmission intense en Afrique a été étudiée. La dissection de plus de 10000 moustiques a permis l'isolement et l'analyse de 746 oocystes de *P. falciparum* provenant de 183 moustiques.

Les résultats mettent en évidence une forte diversité génétique du parasite, de l'ordre des observations antérieures (taux d'hétérozygotie attendue = 0,79 pour chaque vecteur), et un taux global de consanguinité qui avoisine les 50%. Cette consanguinité s'explique d'une part par l'autofécondation qui a lieu au sein des moustiques chez les deux espèces majeures, mais également par une distribution non-aléatoire des génotypes d'oocystes entre les individus moustiques. Ces données obtenues dans les contextes de transmission différents de l'Afrique Centrale sont en accord avec celles qui ont été obtenues au Kenya sur *An. gambiae* (Razakandrainibe et al. 2005) et confirment la forte structuration génétique de *P. falciparum* entre moustiques, associée à un régime de reproduction qui combine brassage génétique et autofécondation. L'impact de l'espèce vectrice est également très net sur la consanguinité globale : les F_{IT} diffèrent très significativement entre les deux espèces, cette différence étant majoritairement due au F_{ST} inter-moustiques, beaucoup plus fort chez *An. funestus*, pour lequel les infrapopulations d'oocystes sont donc significativement plus différenciées entre elles que ne le sont entre elles les infrapopulations oocystes de *An. gambiae* (Figure 8).

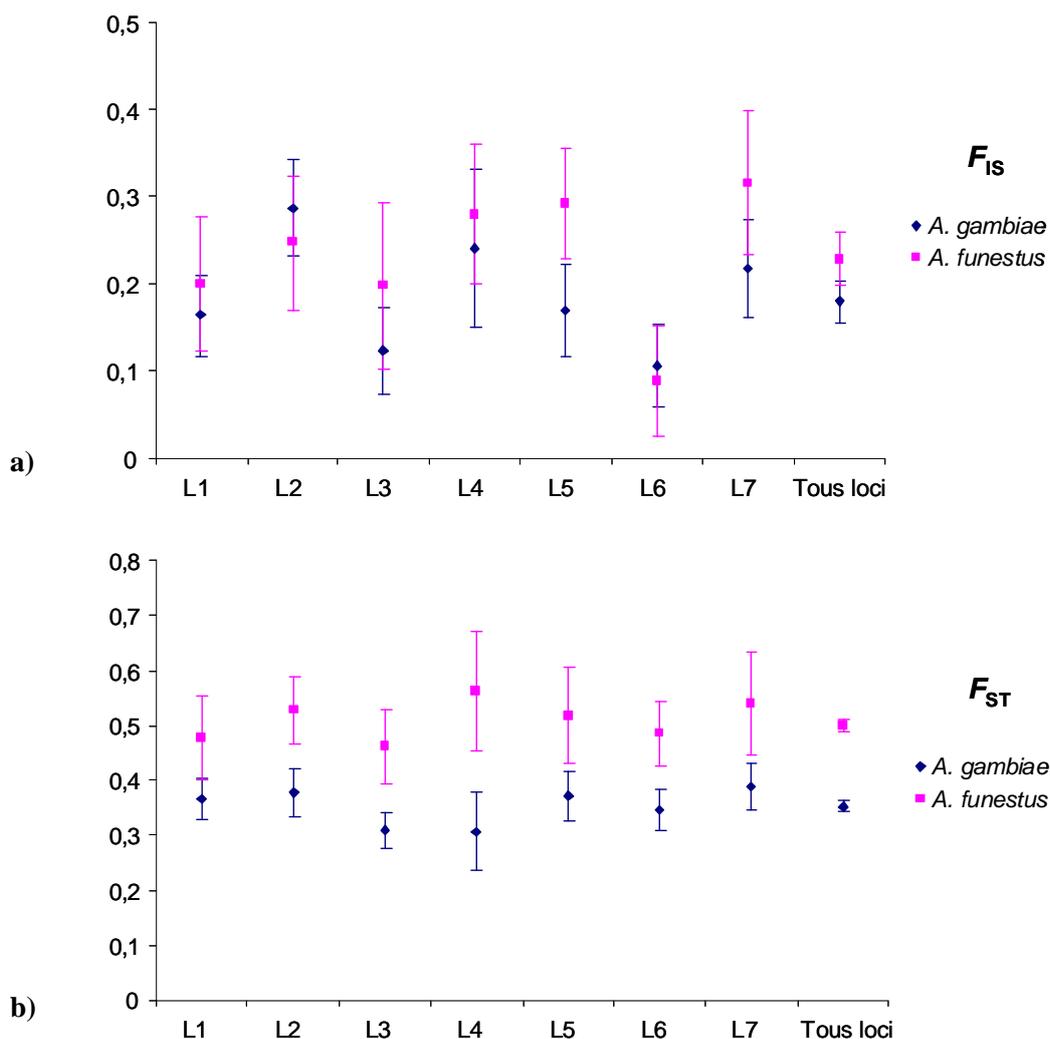


Figure 8. Comparaison des composantes F_{IS} et F_{ST} de la consanguinité globale F_{IT} des oocystes de *P. falciparum* entre les vecteurs *An. gambiae* et *An. funestus*. **(a)** Le F_{IS} moyen a été estimé par locus et globalement à partir des F_{IS} estimés au sein des moustiques de chaque espèce contenant au moins deux oocystes, tous sites confondus. **(b)** Le F_{ST} inter-moustiques moyen par locus et global a été estimé pour chaque espèce tous sites confondus. Le logiciel FSTAT V.2.9.4 a été utilisé pour l'estimation des paramètres et pour le calcul des IC95.

Le F_{IS} contribue également à la différence de consanguinité globale entre les deux espèces, mais plus légèrement (voir la Figure 8, la différence entre les F_{IS} des deux espèces est significative pour Simbock, mais pas pour les villages de Tibati ni de Rota, et pas globalement).

D'autre part, la différenciation spatiale à l'échelle régionale (Cameroun) et continentale (Afrique) n'est pas significative, en accord avec des résultats précédemment obtenus sur les stades sanguins (Anderson et al. 2000b), qui montrent que l'essentiel de la diversité en Afrique est structurée non pas entre sites, mais au niveau local au sein des sites de transmission. De la même manière, l'impact de l'espèce vectrice sur la distribution des génotypes oocystes n'est pas significatif : les génotypes oocystes de *P. falciparum* sont répartis aléatoirement dans les deux vecteurs *An. gambiae* ou *An. funestus*.

Ces données sont essentielles pour la compréhension de l'impact des espèces vectrices sur la structuration des populations de *P. falciparum* dans les foyers de transmission où de nombreuses espèces vectrices sont présentes en sympatrie. Elles montrent tout d'abord que la stratégie globale de reproduction du parasite est la même chez les deux espèces de vecteurs étudiés, avec un brassage génétique accompagné d'une part significative d'autofécondation y compris en zone de transmission intense en Afrique. Elles montrent d'autre part le rôle significatif de l'espèce vectrice sur la distribution du parasite au sein des moustiques (les taux d'infections à Simbock sont différents entre les deux espèces) qui s'accompagne d'une structuration différente de cette diversité selon l'espèce (F_{ST} inter-moustique), et mettent ainsi en lumière l'impact de l'hôte vecteur sur les modalités de la structuration du parasite à l'échelle locale du site de transmission. À l'échelle supérieure, régionale et continentale, la diversité parasitaire forte et très structurée à l'échelle locale ne permet pas de mettre en évidence de structuration génétique entre populations distantes géographiquement.

Article 1 :

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, vol. 104, p. 7987-92.

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN THE TWO MAIN AFRICAN VECTORS, *ANOPHELES GAMBIAE* S.S. AND *ANOPHELES FUNESTUS*

ZEINAB ANNAN, PATRICK DURAND, FRANCISCO J. AYALA, CÉLINE ARNATHAU, PARFAIT AWONO-AMBENE, FRÉDÉRIC SIMARD, FABIEN G. RAZAKANDRAINIBE, JACOB C. KOELLA, DIDIER FONTENILLE & FRANÇOIS RENAUD

Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*

Zeinab Annan^{*†}, Patrick Durand^{*}, Francisco J. Ayala^{*§}, Céline Arnathau^{*}, Parfait Awono-Ambene[¶], Frédéric Simard[¶], Fabien G. Razakandrainibe^{||}, Jacob C. Koella^{**}, Didier Fontenille[†], and François Renaud^{*}

^{*}Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche-Institut de Recherche pour le Développement/Centre National de la Recherche Scientifique 2724, B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France; [†]Laboratoire de Lutte Contre les Insectes Nuisibles, Unité de Recherche 016-Institut de Recherche pour le Développement, B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France; [‡]Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, CA 92697; [¶]Laboratoire de Recherche sur le Paludisme-Institut de Recherche pour le Développement, Organisation de Coordination pour la Lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale, B.P. 288, Yaoundé, Cameroon; ^{||}Laboratoire de Parasitologie Evolutive, Unité Mixte de Recherche-Centre National de la Recherche Scientifique 7103, Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France; and ^{**}Division of Biology, Imperial College London, Silwood Park, Ascot, Berkshire SL5 7PY, United Kingdom

Contributed by Francisco J. Ayala, March 26, 2007 (sent for review February 15, 2007)

We investigated patterns of genetic diversity of *Plasmodium falciparum* associated with its two main African vectors: *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. We dissected 10,296 wild-caught mosquitoes from three tropical sites, two in Cameroon (Simbock and Tibati, separated by 320 km) and one in Kenya (Rota, >2,000 km from the other two sites). We assayed seven microsatellite loci in 746 oocysts from 183 infected mosquito guts. Genetic polymorphism was very high in parasites isolated from both vector species. The expected heterozygosity (H_E) was 0.79 in both species; the observed heterozygosities (H_O) were 0.32 in *A. funestus* and 0.42 in *A. gambiae*, indicating considerable inbreeding within both vector species. Mean selfing (s) between genetically identical gametes was $s = 0.33$. Differences in the rate of inbreeding were statistically insignificant among sites and between the two vector species. As expected, because of the high rate of inbreeding, linkage disequilibrium was very high; it was significant for all 21 loci pairs in *A. gambiae* and for 15 of 21 pairs in *A. funestus*, although only two pairwise comparisons were between loci on the same chromosome. Overall, the genetic population structure of *P. falciparum*, as evaluated by F statistics, was predominantly clonal rather than panmictic, a population structure that facilitates the spread of antimalarial drug and vaccine resistance and thus may impair the effectiveness of malaria control efforts.

malaria | epidemiology | evolutionary genetics | Cameroon | Kenya

Malaria is the most significant and widespread vector-transmitted human disease, accounting yearly for several hundred million clinical cases and >2 million deaths, mostly affecting young children and pregnant women in subSaharan Africa (1). Prevention and cure of the disease are major public-health challenges that are tackled by using several strategies, among them vector control. The transmission of *Plasmodium falciparum*, the agent of malignant malaria, involves a complex vectorial system consisting of ≈ 10 *Anopheles* species, colonizing different ecoclimatic settings, regions, and seasons in strongly variable relative abundances (2–5).

The two most important vectors of malignant malaria in Africa are *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* because of their widespread distribution, highly anthropophilic and endophilic behavior, and long life spans (6, 7). *A. gambiae* is the most important vector throughout Africa and the most extensively studied *Anopheles* species (8). The effectiveness of malaria transmission emerges from the complementary ecoclimatic attributes and seasonal patterns of both species. *A. funestus* breeds in permanent larval sites that enable this species, in regions of seasonal transmission, to extend parasite transmission far into the dry season, after the temporary breeding pools of *A. gambiae* have dried out (7, 9–11).

Differences in the biology and ecology of these two main vectors might entail a differential impact on the genetic composition of the *P. falciparum* populations they harbor and transmit. We compared patterns of genetic diversity of *P. falciparum* isolated from midguts of wild-collected *A. gambiae* and *A. funestus*. The parasite population genetic structure in its mosquito vectors is of primary relevance to understanding the disease's epidemiology and its evolution (including predicting and monitoring the spread of drug resistance alleles) and to devising effective means for its control.

Most population genetic investigations of *P. falciparum* have focused on the haploid blood stages of the parasite in its human host (12–16). In contrast, we investigated the parasite's genetic diversity with oocysts dissected from mosquito guts, which allows the observation of the products of meiosis and, thus, the direct estimation of the population structure of the parasite. A few earlier studies considered oocysts' genetic diversity but targeted a small number of antigen-coding loci subjected to strong host immune selection (17–18), thus giving a possibly biased view of *P. falciparum* population structure. Using seven presumably neutral microsatellite loci, we have recently demonstrated that *P. falciparum* population structure is predominantly clonal in *A. gambiae* from Kenya (19). We now extend this approach to parasite populations from the two major African vector species, *A. gambiae* s.s. and *A. funestus*, collected in Central (Cameroon) and East Africa (Kenya) across successive years.

Results

Infection Rate and Parasite Distribution. We dissected 10,296 wild-caught sympatric *A. gambiae* s.s. (71%) and *A. funestus* (29%) in three localities: Simbock and Tibati, located in distinct ecoclimatic areas of Cameroon (Central Africa), and Rota in western Kenya (East Africa). Mosquitoes were collected in 2002 (Simbock and Rota), 2003 (all three sites), and 2004 (Simbock). The midguts of 221 [2.1%, 95% confidence interval (C.I.) = 1.88–2.45] mosquitoes were infected with *P. falciparum* oocysts. The proportion of infected mosquitoes was higher for *A. funestus* than for *A. gambiae* in Simbock (4.6 vs. 1.8%, respectively, Fisher's exact test, $P < 10^{-3}$)

Author contributions: P.D., F.S., J.C.K., D.F., and F.R. designed research; Z.A., P.D., C.A., P.A.-A., and F.G.R. performed research; Z.A., P.D., and F.R. analyzed data; and Z.A., F.J.A., D.F., and F.R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: C.I., confidence interval; chr., chromosome.

[§]To whom correspondence should be addressed at: Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, 321 Steinhaus Hall, Irvine, CA 92697-2525. E-mail: fjayala@uci.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0702715104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

Table 1. Distribution of *P. falciparum* oocysts in *A. gambiae* and *A. funestus* in three African sites and different years

Population	<i>A. gambiae</i> s.s.						<i>A. funestus</i>					
	Mosquito host sample		<i>P. falciparum</i> oocysts within mosquitoes				Mosquito host sample		<i>P. falciparum</i> oocysts within mosquitoes			
	Total	No. infected	Percent infected (95% C.I.)	Total (range)	Mean per mosquito (95% C.I.)	Var/mean ratio	Total	No. infected	Percent infected (95% C.I.)	Total (range)	Mean per mosquito (95% C.I.)	Var/mean ratio
Simbock 2002	867	17	2.0 (1.2, 3.1)	85 (1–30)	5.0 (2.9, 10.3)	14.1	130	2	1.5 (0.3, 5.6)	13 (2–11)	6.5 (2.0, 6.5)	9.6
Simbock 2003	397	9	2.3 (1.1, 4.2)	69 (1–15)	7.7 (3.9, 11.0)	11.4	336	18	5.4 (3.4, 8.3)	71 (1–12)	3.9 (2.6, 5.4)	6.2
Simbock 2004	961	13	1.4 (0.8, 2.3)	79 (1–25)	6.1 (3.1, 11.7)	14.6	275	14	5.1 (3.0, 8.5)	37 (1–8)	2.6 (1.7, 3.9)	4.1
Tibati 2003	3,677	18	0.5 (0.3, 0.8)	189 (1–40)	10.5 (6.1, 17.3)	23.7	1,127	15	1.3 (0.8, 2.2)	132 (1–40)	8.8 (5.1, 16.3)	20.4
Rota 2002	743	20	2.7 (1.7, 4.1)	117 (1–30)	5.8 (4.0, 9.8)	12.5	608	19	3.1 (1.9, 4.8)	189 (1–54)	9.9 (6.1, 18.2)	25.6
Rota 2003	689	51	7.4 (5.6, 9.6)	334 (1–44)	6.5 (4.5, 9.5)	18.6	486	25	5.1 (2.4, 7.6)	104 (1–25)	4.2 (2.4, 7.6)	13.2
Total	7,334	128	1.7 (1.5, 2.1)	873 (1–44)	6.8 (5.6, 8.6)	17.7	2,962	93	3.1 (2.6, 3.8)	546 (1–54)	5.9 (4.5, 7.9)	17.6

and Tibati (1.3 vs. 0.5%, respectively, $P = 0.006$), whereas no significant difference between the two species was observed in Rota (4 vs. 4.9% respectively, $P = 0.3$).

The number of oocysts per infected mosquito (Table 1) did not differ significantly between the two species: There were 6.8 oocysts per midgut (C.I. = 5.6–8.6) for *A. gambiae* and 5.9 (C.I. = 4.5–7.9) for *A. funestus*, either overall or within each site (bootstrap two-sample t test, $P = 0.4$). The frequency distribution of oocysts per mosquito was similar for the two species (stochastic equality test, $P = 0.2$). The index of discrepancy was 0.99 for both species; the variance-to-mean ratios were 17.7 and 17.6 (Table 1). These values are characteristic of the highly aggregated oocyst distributions generally observed in anopheline mosquitoes, with a high proportion of the parasites concentrated in a small fraction of hosts (19–21).

Genetic Polymorphism. We assayed seven previously described microsatellite loci (13, 19, 22) located on five chromosomes (chr.): *POLYa* (chr. 4), *TA60* (chr. 13), *ARA2* (chr. 11), *Pfg377* and *PfPK2* (chr. 12), and *T487* and *TA109* (chr. 6). The analyses were based on 746 oocysts successfully isolated from 183 mosquito guts: seven loci amplified from 678 oocysts, plus six and five loci genotyped from additional 48 and 20 oocysts, respectively. The allele frequencies are given in supporting information (SI) Table 3.

All loci were highly polymorphic, showing an average (\pm SE) of 15.9 (\pm 2.2) alleles per locus, ranging from 7 in *Pfg377* to 23 in *TA109*. The mean allelic richness of parasite subpopulations within mosquitoes across sites and samples was identical in the two vectors (1.79 ± 0.05 for *A. gambiae* and 1.79 ± 0.04 for *A. funestus*) and did not differ significantly within each site between the two species (Wilcoxon two-sample test, $P = 0.7$).

The genotypic frequencies suggested considerable inbreeding in the *P. falciparum* populations of either vector. The total observed and expected frequencies of heterozygotes were, respectively, $H_O = 0.42 \pm 0.03$ and $H_E = 0.79 \pm 0.05$ in *A. gambiae* and $H_O = 0.32 \pm 0.03$ and $H_E = 0.79 \pm 0.04$ in *A. funestus*. The two species did not differ in the mean expected heterozygosities of their parasite populations (SI Table 3) within each site or within the total sample (Wilcoxon two-sample tests, $P > 0.3$).

The discrepancy between observed and expected heterozygosities remained high and significant for each locus and within each mosquito species when we considered only mosquito guts with 10 or more oocysts per gut ($H_O = 0.38 \pm 0.02$ and $H_E = 0.79 \pm 0.04$ in *A. gambiae* and $H_O = 0.35 \pm 0.05$ and $H_E = 0.70 \pm 0.05$ in *A. funestus*).

Population Structure. We used F statistics to explore the pattern and distribution of heterozygote deficits. For the whole population of oocysts distributed in their respective mosquito hosts (subpopulations), the total heterozygote deficit F_{IT} , which measures the overall

departure from panmixia, was $F_{IT} = 0.53$ (C.I. = 0.49–0.56, $P < 10^{-4}$). For oocyst subpopulations from the two species separately, $F_{IT} = 0.47$ (C.I. = 0.43–0.51, $P < 10^{-4}$) for *A. gambiae* and $F_{IT} = 0.60$ (C.I. = 0.57–0.64, $P < 10^{-4}$) for *A. funestus*. This difference was due to the fraction of the total allelic variance of *P. falciparum* oocysts that was distributed among mosquitoes in the two vector species (see section titled F_{ST} between mosquitoes). The total heterozygote deficit F_{IT} can be partitioned into two components: F_{IS} , which measures the deficit due to the deviation from panmixia within a mosquito gut, i.e., the deviation from random union of gametes within each oocyst relative to gametes from different oocysts within the same mosquito; and F_{ST} , which measures the heterozygote deficit due to the partitioning of the total allelic variance among populations. This latter measure can be further split into a component that measures heterozygote deficit due to differences between subpopulations (oocysts within mosquito guts) within a sample (F_{ST} between mosquitoes) and one that measures heterozygote deficit due to the three additional parameters that contribute to population structure: sampling date, site, and *Anopheles* species.

F_{IS} within mosquitoes. F_{IS} measures departure from panmixia due to the nonrandom association of alleles within oocysts in mosquitoes (23). F_{IS} was calculated for the 112 mosquitoes (subpopulations) with at least two oocysts. The average F_{IS} was 0.18 (C.I. = 0.14–0.23, $P < 10^{-4}$) for *A. gambiae* (68 subpopulations) and 0.23 (C.I. = 0.17–0.28, $P < 10^{-4}$) for *A. funestus* (44 subpopulations). Single-locus F_{IS} estimates were also positive and significant (Fig. 1A) and did not differ between species when all loci were combined (Wilcoxon two-sample test, $P = 0.3$) or treated separately (see C.I. 95% of Fig. 1A).

We estimated the selfing rate (s) from the relationship $F_{IS} = s/(2 - s)$, assuming the F_{IS} within mosquitoes only resulted from self-fertilization. The mean selfing rate for the whole sample was $s = 0.33$ (C.I. = 0.24–0.42); for each vector species, $s = 0.30$ (C.I. = 0.24–0.37) for *A. gambiae* and 0.37 (C.I. = 0.29–0.45) for *A. funestus*.

F_{ST} between mosquitoes. A nonrandom distribution of genotypes among mosquitoes accounted for the largest component of the departure from panmixia. For the total population, $F_{ST} = 0.41$ (C.I. = 0.39–0.43, $P < 10^{-4}$); for *A. gambiae*, $F_{ST} = 0.35$ (C.I. = 0.33–0.37, $P < 10^{-4}$); and for *A. funestus*, $F_{ST} = 0.50$ (C.I. = 0.48–0.52, $P < 10^{-4}$). The variation among samples ranges from $F_{ST} = 0.27$ (C.I. = 0.25–0.29) for *A. gambiae* in Simbock to $F_{ST} = 0.59$ (C.I. = 0.57–0.62) for *A. funestus* in Rota (Fig. 1B). The F_{ST} values observed between mosquitoes were similar to those previously observed for populations of *P. falciparum* from Papua New Guinea (13) or from Kenya (for example, average $F_{ST} = 0.36$ for 11 localities in Kenya; see ref. 19).

F_{ST} between sites. There were no significant differences among sampling sites: F_{ST} ranged from 0.004 to 0.02 ($P > 0.1$) using

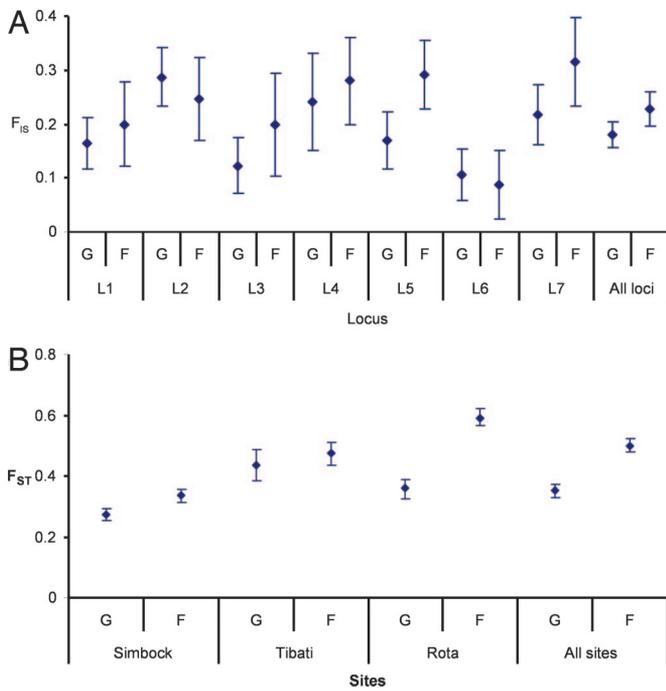


Fig. 1. Inbreeding coefficient statistics for *P. falciparum* oocysts collected from *A. gambiae* (G) and *A. funestus* (F) mosquitoes in Simbock and Tibati (Cameroon) and in Rota (Kenya). (A) F_{15} measures the deficiency of heterozygotes resulting from nonrandom union of gametocytes within individual mosquito guts; bars indicate the 95% C.I. for each F_{15} value. (B) F_{ST} measures the deficiency of heterozygotes resulting from nonrandom distribution of oocyst genotypes among mosquito guts. L1 to L7 are the following seven microsatellite loci, respectively: POLYa, TA60, ARA2, Pfg377, Pfpk2, TA87, and TA109 (ref. 19).

HIERFSTAT (see *Materials and Methods*). We have also used FSTAT version 2.9.4 to assess differentiation among sites because the values obtained can be compared with published data on genetic differentiation of oocysts. The estimates of differentiation between sites ranged from 0.02 to 0.12, indicating weak but significant spatial differentiation in all cases (Table 2).

F_{ST} between sampling dates. Simbock was sampled in 2002, 2003, and 2004; Rota was sampled in 2002 and 2003. The allele frequency distributions were similar at different times (for all HIERFSTAT tests, $P > 0.05$). We therefore combined the samples from different times at these two sites.

Genetic differentiation between *Anopheles* species. We used canonical correspondence analysis (24) to determine the relative contribution of the vector species to the global genetic structure of the *P. falciparum* populations. A graphic representation of the results

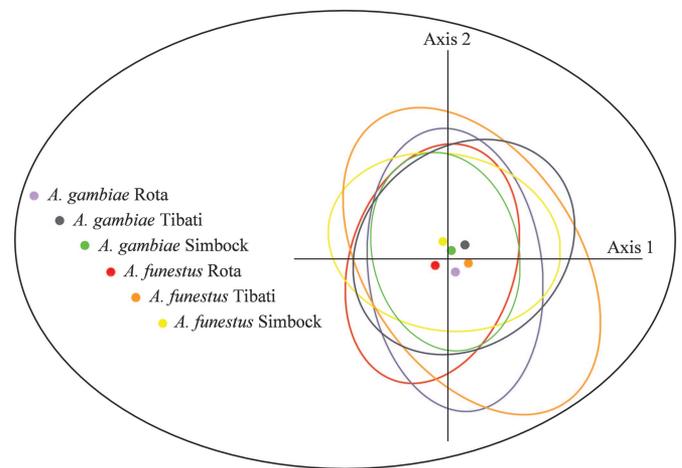


Fig. 2. Results of the canonical correspondence analysis. Relative contribution of the variables “site” and “*Anopheles* species” to the genetic structure of *P. falciparum* populations infecting the two *Anopheles* species in the three sites. Oocyst populations were projected on the first two axes of the canonical analyses. Centroids (dots) of each parasite population are surrounded by the 95% C.I.s (ellipses).

shows largely overlapping distributions (centroids and ellipses of the 95% C.I. in Fig. 2) of the genetic variability of *P. falciparum* between vector species and among sites. Thus, the vector species did not contribute to the genetic population structure of the parasite.

A Monte Carlo permutation test on the first four canonical correspondence analysis axes that combines species and sites is statistically significant ($P = 0.001$). This suggests some degree of geographic differentiation (see F_{ST} between sites; Table 2), although not between species. This interpretation was corroborated by FSTAT version 2.9.4 analysis, performing 20 random samplings of two sets of oocyst subpopulations within each species at each site. The interspecies F_{ST} values obtained were all included inside the range of intraspecies F_{ST} values.

Linkage Disequilibrium. Linkage disequilibrium was significant for each of the 21 pairs of loci in *A. gambiae*, with $R = 0.60$ – 0.69 ($P < 10^{-3}$ with Bonferroni correction), and for 15 of 21 pairs in *A. funestus*, $R = 0.53$ – 0.79 ($P < 10^{-3}$). The difference between the two species is likely due to the smaller number of oocyst subpopulations (i.e., infected mosquitoes with more than one oocyst per gut) in *A. funestus* (44) than in *A. gambiae* (68). In Simbock, 20 of 21 pairs display significant linkage disequilibrium in 2002, 19 of 21 pairs in 2003, and 19 of 21 pairs in 2004. In Rota, all 21 pairs were in linkage disequilibrium in 2002 and 2003. Thus, linkage disequilibrium is stable over years in each site, corroborating that the “clonal” population structure persists over the generations.

Table 2. Geographical genetic differentiation between parasite populations from three African sites within and between *Anopheles* species

Species	<i>A. gambiae</i>		<i>A. funestus</i>	
	Tibati	Rota	Tibati	Rota
<i>A. gambiae</i>				
Simbock	0.04 (0.02–0.07)*	0.02 (0.01–0.02)*	0.03 (0.02–0.04)	0.07 (0.04–0.10)*
Tibati		0.04 (0.02–0.07)*		0.12 (0.07–0.18)*
<i>A. funestus</i>				
Simbock	0.05 (0.03–0.08)*	0.02 (0.01–0.04)*	0.03 (0.02–0.04)*	0.08 (0.04–0.11)*
Tibati		0.03 (0.02–0.04)*		0.10 (0.08–0.13)*

F_{ST} and 95% C.I. (15,000 bootstrap simulations over loci) are shown. Departure of F_{ST} from zero was tested by using the Bonferroni-corrected P value as implemented in FSTAT version 2.9.4.

*Statistically significant ($P < 0.001$).

The seven microsatellite loci are distributed among five different chromosomes; therefore, only 2 of 21 pairwise comparisons involved loci on the same chromosome (19).

Discussion

Our results address three issues with important epidemiological consequences: the degree of inbreeding and the extent to which the population structure of *P. falciparum* is closer to clonal rather than panmictic; the degree of genetic differentiation among geographically separated populations of *P. falciparum*; and the distribution of the *Plasmodium* oocyst pool within its major mosquito vector species, *A. gambiae* and *A. funestus*, which may be indicative of a differential effectiveness in malaria transmission between the two species.

The “clonal theory” of parasitic protozoa (25) proposed that the population structure of many parasitic protozoa, and in particular malaria, appears to be a result of clonal propagation rather than of randomly mating parasites, although the relative importance of both reproductive mechanisms can vary within and among parasitic species in different regions and epidemiological settings. *Plasmodium* was considered a likely exception because this idea seems to be in conflict with the biology of the species: The transmission of the parasite from a human host to another necessarily requires a sexual stage in the mosquito vector and, thus, the formation of gametes, fertilization, and meiosis. However, although the sexual reproduction in the mosquito host is obligatory, it does not necessarily result in recombination between genetically distinct gametes. If the combining gametes both derive from the same clonal population of haploid ancestors, fertilization will occur between genetically identical male and female gametocytes, and thus physiological sexuality does not necessarily imply genetic sexuality. The issue remains of the extent to which fertilization will imply genetically identical or different gametes, in natural populations of *P. falciparum* sampled from different vector species, and/or in different epidemiological settings.

The extent of cross-fertilization and panmixia relative to clonal reproduction in *P. falciparum* has indeed been the subject of considerable debate during the last decade (13, 19, 26–30). The current consensus is that this parasite species displays a range of population structures associated with the levels of transmission intensity (13). Regions of high *P. falciparum* transmission intensity correlate with high prevalence (31–32) and high genetic diversity of the parasite (13, 15, 33), which result in a high proportion of (genetically) mixed infections in humans. Increased genetic diversity in the human host increases the probability that the mosquito will obtain genetically distinct gametocytes with its blood meal. This, in turn, increases the probability of parasite outcrossing within the mosquito gut (34–35). Conversely, higher levels of inbreeding and clonal population structure are expected in regions with lower transmission rates (13, 36).

We collected our mosquitoes in three different African regions of high-transmission intensity, with an annual entomologic inoculation rate ranging between 100 and 300 infective bites per person per year (2, 37). Accordingly, we observed high genetic diversity of *P. falciparum* in each of the two vector species: $H_E = 0.79 \pm 0.05$ for *A. gambiae* and $H_E = 0.79 \pm 0.04$ for *A. funestus*. These values are similar to those obtained in a recent study using the same microsatellite loci to explore the level of genetic diversity in *P. falciparum* oocyst stages in Kenya ($H_E = 0.76$ – 0.88 ; ref. 19). Our results are also consistent with several investigations conducted on haploid blood stages in highly endemic African populations (12, 13, 15, 38, 39).

In agreement with the clonal theory and despite the high endemicity, we found strong and highly significant heterozygote deficits at the subpopulation (mosquito) level: In both *A. gambiae* and *A. funestus*, the observed heterozygosities were only approximately one-half of the expected values under the hypothesis of random union of the gametes. This led to estimates of the self-

fertilization index (s) of 0.30 and 0.37, respectively, for *A. gambiae* and *A. funestus*, i.e., that approximately one gametocyte of every three or four is involved in selfing. These selfing values are similar to those previously reported for the oocyst populations of *A. gambiae* in Kenya: $s = 0.25$ ($F_{IS} = 0.15$) (19).

Read *et al.* (40) estimated from observations of gametocyte sex ratios in the peripheral blood of patients from Madang in Papua New Guinea that 62% of all *P. falciparum* matings are between genetically identical gametes. Based on evidence from oocyst genotyping using antigen-coding loci, overall inbreeding coefficients were estimated to be 0.90 in Papua New Guinea (18) but 0.34 in Tanzania (17). This difference was attributed to the lower levels of malaria transmission in Papua New Guinea as compared with Tanzania (18). However, in an earlier study (19), we observed that selfing in *P. falciparum* is not a local strategy that might occur in some but not other localities or occasions, but rather that it is a generalized life history trait of *P. falciparum*, which occurs even in high-transmission regions. Moreover, the observation made earlier (19) that there is in *P. falciparum* a considerable proportion of additional inbreeding due to nonrandom distribution of oocyst genotypes among mosquito guts (average $F_{ST} = 0.35$ for 11 *P. falciparum* populations from Kenya infecting *A. gambiae*) was confirmed in the present study for the two vectors, *A. gambiae* and *A. funestus* (average $F_{ST} = 0.35$ and 0.50, respectively).

The evidence of considerable inbreeding derived from heterozygote deficits was confirmed by the high level of linkage disequilibrium between loci observed in all three localities and in either vector species. High linkage disequilibrium can be due to the high level of inbreeding arising both from selfing and from the consequent high relatedness among oocysts within each mosquito, so that there is little opportunity for recombination. Similar results have been obtained with parasitized blood samples (13, 17, 19, 39, 41) from different African regions and different years or seasons displaying a very wide variety of transmission intensities. The conclusion is that the population structure of *P. falciparum* is predominantly clonal and that this is the case for parasites obtained from both of the two major vectors of *P. falciparum* in Africa, *A. gambiae* and *A. funestus*. Thus, *P. falciparum* cannot be considered a panmictic species even in African regions with the highest endemicity. This has important epidemiological consequences: nonrandom mating and “clonality” in highly endemic regions can facilitate the spread of antimalarial drug resistance (42) and thus rapidly impair the effectiveness of measures for malaria control if monitoring lags behind.

How much genetic differentiation occurs among different regions or among vector species also has considerable epidemiological consequences, one of the most important being the understanding of the spread of the parasite resistance to drugs and vaccine (42). The degree of geographic differentiation between populations separated by ≈ 320 km (Simbock to Tibati) or $>2,000$ km (Cameroon to Kenya) is significant but quite low, $F_{ST} = 0.02$ to 0.12, by one measure (FSTAT version 2.9.4.) and not significant, $F_{ST} = 0.004$ to 0.02, by a different statistical method (HIERFSTAT; see Results). Bogreau *et al.* (39) have observed in blood samples a substantial degree of differentiation between urban and rural sites at the scale of the African continent ($F_{ST} = 0.17$ – 0.24). However, microsatellite investigations of blood stages, conducted in highly endemic regions, are consistent with those reported in the present paper, showing low levels of geographic differentiation even over considerable distances. Geographic differentiation is weak among four Sudan sites separated by 420 km ($F_{ST} = 0.006$ – 0.11 ; ref. 12). Similarly, the genetic differentiation among microsatellite loci from three different countries is very low ($F_{ST} = 0.04$; ref. 27). From human bloodstages, Anderson *et al.* (13) noted that the genetic variation of *P. falciparum* at the African scale is distributed mostly within localities and not at all or very little among them ($F_{ST} = 0.003$ – 0.012), despite distances $>2,000$ km. We found the same

feature of the genetic variation distribution in Africa at the oocyst level by sampling the parasite within the mosquito definitive host.

Finally, our study addresses the role of the mosquito vector in shaping *P. falciparum* population structure. Approximately 10 *Anopheles* species are vectors of *P. falciparum* in Africa (3, 4). The most important ones are *A. gambiae* and *A. funestus* because they are widely distributed throughout the continent, are highly anthropophilic and endophilic, and exhibit high survival rates (6, 7). In Kenya, the incidence of infected mosquitoes was not significantly different between the two vector species *A. gambiae* and *A. funestus*, but in the two Cameroon populations, the proportion of infected mosquitoes was significantly higher in *A. funestus* than in *A. gambiae* and as it was for all samples combined (3.1% vs. 1.7%, Table 1).

For large-scale malaria vector control, it is critical to understand whether ecological and other biological differences between the two most important vectors affect the population structure of the parasite with possible consequences on their efficiency in malaria transmission. One obvious major concern is the possibility for the *P. falciparum* parasite to evolve and adapt differentially to the different *Anopheles* species present in a malaria transmission area. If this is the case, implementation of a strategy aiming at neutralizing one vector species by introgression of a transgenic resistance trait may buffer the advantage created by the introduction of the transgene because it may liberate a niche for a rare parasite strain adapted to a different vector species to exploit, with major consequences on the efficiency of vector control strategies. Despite its potentially great significance, we know of no study, other than the present one, that has addressed this issue. Our results demonstrate a lack of evidence for any significant influence of malaria vector species diversity on the population structure of the transmitted pathogen, both *A. gambiae* and *A. funestus* being equally prone to be infected by any *P. falciparum* genotype. The population structure of *P. falciparum* is thus similar for the two species, with no segregation of particular *P. falciparum* genotypes within any of the two major African vector species.

Materials and Methods

Sampling Sites. Mosquitoes were collected in two sites from two ecoclimatic areas of Cameroon, Central Africa, Simbock (lat 3°51'N, long 11°30'E) and Tibati (lat 6°28'N, long 12°37'E), and from Rota (lat 0°06.3'S, long 34°40.3'E) in Western Kenya, East Africa. Simbock is a suburb of Yaoundé, the capital of Cameroon, within the equatorial climate zone. Annual rainfall is ≈1,500 mm spread throughout the year. There are two rainy seasons, one from September to November and a shorter one from March to June. Tibati is in a rural setting ≈320 km north of Simbock, within the highland tropical climatic area of the Adamawa Plateau, with annual rainfall >1,500 mm and mean annual temperature of ≈22°C. Vegetation is of the Sudan–Guinean type. The single rainy season extends from March to October (43). Rota is in a rural setting, on the marshes of Lake Victoria in Western Kenya, with a tropical climate and annual rainfall >1,000 mm. In all three highly endemic malaria localities, transmission is perennial, with inoculation rates of ≈200 (Tibati), ≈300 (Simbock), and 100–300 (Rota) infective bites per human per year (2, 3, 37).

Mosquito Collections and Field Processing. *Anopheles* mosquitoes were collected in Simbock in November 2002, March 2003, and November 2004; in Tibati in September 2003; and in Rota from February to May in 2002 and 2003 (two replicate samples). In Cameroon, mosquitoes were captured between 2000 and 0600, indoors and outdoors, before feeding, from 10 houses ≈1 km or less apart in Simbock. In Tibati, mosquitoes were captured from seven houses, <5 km from each other. Specimens from Rota were aspirated from the walls of 10 huts in the morning and reared for 1 week in the laboratory. *A. gambiae* s.s. and *A. funestus* females were found in all three sites surveyed (along with other *P. falciparum*-transmitting *Anopheles* species; ref. 3). Once identified by

means of morphological keys (6, 7), the mosquitoes were dissected in a saline solution on the morning of their collection in Cameroon and 1 week after collection in Rota to allow for the development of oocysts in infected females. Dissected midguts were checked for the presence of oocysts under a compound microscope. Oocyst-infected guts were stored individually, along with the remainder of the mosquito body, in 1.5-ml microtubes with 80% ethanol. Samples were transported to the Montpellier laboratory and stored at 4°C. Infected females belonging to the *A. gambiae* complex and *A. funestus* group were identified to species by PCR diagnostic assays (44, 45).

Oocyst Dissection. Oocysts were dissected from each gut after gradual rehydration of the specimens in distilled water by using a Leica (Deerfield, IL) inverted DMIRB microscope. Individual oocysts were teased from the basal lamina of the midgut epithelium and transferred to individual 0.5-ml tubes with 10 μl of distilled water. Tips and dissecting tools were washed in Javel water and 70% ethanol and changed regularly to avoid contamination. Parasite DNA from each oocyst was extracted by using the DNeasy Tissue Kit of Qiagen (Valencia, CA).

Microsatellite Genotyping. Seven microsatellite loci were selected among the 12 *P. falciparum* loci used by Anderson *et al.* (13), initially described by Su and Wellems (22). The seven microsatellite loci with their chromosome location and GenBank accession number are as follows: POLY_a (chr. 4, G37809), TA60 (chr. 13, G38876), ARA2 (chr. 11, G37848), Pfg377 (chr. 12, G37851), PfpK2 (chr. 12, G37852), TA87 (chr. 6, G38838), and TA109 (chr. 6, G38842). We followed a two-step strategy for amplification (19). The microsatellite PCR products were sized relatively to an internal standard and resolved by using GENESCAN software version 3.1 on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Vector Infection Rate and Parasite Distribution. Rates of mosquito infection, number of oocysts per mosquito, mean intensity, indices of parasite distribution within mosquitoes (variance-to-mean ratio and index of discrepancy; ref. 46), and comparisons between *Anopheles* species were computed by using the QUANTITATIVE PARASITOLOGY 3.0 computer program (47).

Genetic Analysis. Genetic variability was quantified as allelic richness by using FSTAT version 2.9.4 (48, 49), as well as observed (H_O) and expected heterozygosity under panmixia (H_E), by using the unbiased estimator of Nei (50), correcting for small samples. Comparisons between populations were performed by using non-parametric tests on two or more samples (Wilcoxon two-sample and Kruskal–Wallis tests) by using the R software (51, 52).

We used FSTAT version 2.9.4 (49) to calculate *F* statistics. For a two-level population structure (individual and subpopulation levels), the total F_{IT} , measuring the inbreeding coefficient of an individual (I) relative to the total (T), can be partitioned into F_{IS} , inbreeding coefficient of an individual (I) relative to the subpopulation (S), which measures departure from Hardy–Weinberg expectations under the hypothesis of panmixia within each subpopulation; and F_{ST} , which measures genetic differentiation between subpopulations (S) in the total population (T): $F_{IT} = 1 - (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$. The data set was organized into three levels: (i) oocysts within the mosquito (subpopulation or the mosquito level), (ii) oocysts infecting mosquitoes within a site (population or site level), and (iii) all oocysts infecting mosquitoes in the whole geographic area sampled (metapopulation or geographic area level).

F_{IS} was estimated and tested by randomizing alleles between oocysts within each of the 112 oocyst subpopulations (112 infected mosquitoes with more than one oocyst). F_{ST} between subpopulations (the fraction of the total allelic variance due to clustering of mosquitoes within geographical sites) was estimated and tested by

randomizing oocyst genotypes between subpopulations (mosquitoes) within each population (site). Because FSTAT version 2.9.4 is designed for a two-level model and cannot take into account the three-level structure of our data set, differentiation between sites was estimated in two ways. First, the fixation index F_{ST} was tested by using FSTAT version 2.9.4 on all oocysts sampled in each locality by randomizing oocyst genotypes between populations relative to total. Second, because the highly significant differentiation observed between subpopulations strongly affects population differentiation computed between oocyst populations from different vectors, sites, or years (53), the fixation index was also estimated by using HIERFSTAT version 0.04-2 (54), which computes F statistics from any number of hierarchical levels, enabling us to take into account the highly significant effect of the mosquito level on parasite population structure to estimate spatial differentiation between populations. Significance of the hierarchical F statistics was assessed by 1,000 permutations of subpopulations (mosquitoes) among populations (sites). The crossed factor “date of sampling” was also estimated, and its significance was assessed by using HIERFSTAT version 0.04-2.

The *Anopheles* species cannot be considered as a hierarchical level because mosquitoes from different species can feed on the same human host. To measure and illustrate levels of genetic differentiation between *P. falciparum* harbored by the two vectors in the three sites, a canonical correspondence analysis was first carried out by using CANOCO software. Canonical correspondence analysis searches for multivariate relationships between two data sets (e.g., genetic data and species environmental data) (55).

Only oocysts for which all seven microsatellite loci could be scored were considered. The significance of the canonical axes was tested with a Monte Carlo permutation test (24), which allows estimation of the 95% C.I.s of the centroids of each population. A second analysis used FSTAT version 2.9.4., performing 20 random samplings of two equal sets of oocyst subpopulations within each *Anopheles* species in each site, to estimate and assess the significance of 20 F_{ST} pair values for each species. These intraspecies F_{ST} values were compared with the interspecies F_{ST} values of the oocyst subpopulations of the two species in each site.

Linkage disequilibrium between pairs of loci was measured with the correlation coefficient R generalized for the multiallelic case. Statistical significance was assessed by a permutation test: Genotypes at two loci are associated at random a number of times, and the log-likelihood G test statistic is recalculated on the randomized data. We applied a Bonferroni correction to the P values (P value times the number of tests), as implemented in FSTAT version 2.9.4.

We thank Pierre Kengne for technical support on *Anopheles* species identification and Yannis Michalakis, Thierry de Meeüs, and Frank Prugnolle for helpful discussions. We are grateful to the whole teams of the Laboratoire de Recherche sur le Paludisme de l'Organisation de Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) and the Kenya Medical Research Institute (KEMRI) for their help. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Recherche sur le VIH/sida et sur le Paludisme program, and a student fellowship from François Lacoste and the Fondation de France and Fondation pour la Recherche Médicale Grant FDT 20051205940 (to Z.A.).

1. World Health Organization (2005) *World Malaria Report 2005* (World Health Organization and United Nations Children's Fund).
2. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, Meunier JY, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, Wondji CS, Tchuinkam T, Fontenille D (2002) *J Med Entomol* 39:350–355.
3. Antonio-Nkondjio C, Kerah CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D (2006) *J Med Entomol* 43:1215–1221.
4. Fontenille D, Simard F (2004) *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:357–375.
5. Coluzzi M (1999) *Parassitologia* 41:277–283.
6. Gillies MT, Coetzee M (1987) *Publ S Afr Inst Med Res* 55:1–143.
7. Gillies MT, De Meillon B (1968) *Publ S Afr Inst Med Res* 54:1–343.
8. della Torre A, Tu Z, Petrarca V (2005) *Insect Biochem Mol Biol* 35:755–769.
9. Dia I, Diop T, Rakotoarivony I, Kengne P, Fontenille D (2003) *J Med Entomol* 40:279–283.
10. Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Githeko A, Yan G (2002) *J Med Entomol* 39:833–841.
11. Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, Konate L, Faye F, Rogier C, Trape JF (1997) *Am J Trop Med Hyg* 56:247–253.
12. Abdel-Muhsin AA, Mackinnon MJ, Awadalla P, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA (2003) *Parasitology* 126:391–400.
13. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, et al. (2000) *Mol Biol Evol* 17:1467–1482.
14. Conway DJ, Machado RL, Singh B, Dessert P, Mikes ZS, Pova MM, Oduola AM, Roper C (2001) *Mol Biochem Parasitol* 115:145–156.
15. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ (2002) *Nature* 418:320–323.
16. Mu J, Duan J, Makova KD, Joy DA, Huynh CQ, Branch OH, Li WH, Su XZ (2002) *Nature* 418:323–326.
17. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood JD, Billingsley P, Teuscher T, Walliker D (1994) *Parasitology* 109:413–421.
18. Paul RE, Packer MJ, Walmsley M, Lagog M, Ranford-Cartwright LC, Paru R, Day KP (1995) *Science* 269:1709–1711.
19. Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeus T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17388–17393.
20. Medley GF, Sinden RE, Fleck S, Billingsley PF, Tirawanchai N, Rodriguez MH (1993) *Parasitology* 106:441–449.
21. Pichon G, Robert V, Tchuinkam T, Mulder M, Verhave JP (1996) *Parasite* 3:165–167.
22. Su X, Wellem TE (1996) *Genomics* 33:430–444.
23. Weir BS, Cockerham CC (1984) *Evolution (Lawrence, Kans)* 38:1358–1370.
24. Ter Braak CJF (1987). CANOCO – Fortran program for canonical community ordination (Microcomputer Power, Ithaca, NY).
25. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2414–2418.
26. Rich SM, Hudson RR, Ayala FJ (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13040–13045.
27. Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Greenwood BM (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4506–4511.
28. Abderrazak SB, Oury B, Lal AA, Bosseno M-F, Force-Barge P, Dujardin J-P, Fandeur T, Molez J-F, Kjellberg F, Ayala FJ, et al. (1999) *Exp Parasitol* 92:232–238.
29. Urdaneta L, Lal A, Barnabé C, Oury B, Goldman I, Ayala FJ, Tibayrenc M (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6725–6729.
30. Hartl DL, Volkman SK, Nielsen KM, Barry AE, Day KP, Wirth DF, Wenzler EA (2002) *Trends Parasitol* 18:266–272.
31. Beier JC, Killeen GF, Githure JI (1999) *Am J Trop Med Hyg* 61:109–113.
32. Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI (2005) *Nature* 438:492–495.
33. Kidgell C, Volkman SK, Daily J, Borevitz JO, Plouffe D, Zhou Y, Johnson JR, Le Roch KG, Sarr O, Ndir O, et al. (2006) *PLoS Pathog* 2:e57.
34. Dye C, Williams BG (1997) *Proc Biol Sci* 264:61–67.
35. Hill WG, Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D (1995) *Genet Res* 65:53–61.
36. Smith JM, Feil EJ, Smith NH (2000) *Bioessays* 22:1115–1122.
37. Ndenga B, Githeko A, Omukunda E, Munyekenye G, Atieli H, Wamai P, Mbogo C, Minakawa N, Zhou GF, Yan GY (2006) *J Med Entomol* 43:200–206.
38. Pearce R, Malisa A, Kachur SP, Barnes K, Sharp B, Roper C (2005) *Mol Biol Evol* 22:1834–1844.
39. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, et al. (2006) *Am J Trop Med Hyg* 74:953–959.
40. Read AF, Narara A, Nee S, Keymer AE, Day KP (1992) *Parasitology* 104:387–395.
41. Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F (2003) *Am J Trop Med Hyg* 68:345–349.
42. Hastings IM (2006) *Parasitology* 132:615–624.
43. Olivry JC (1986) *Fleuves et Rivières du Cameroun* (Orstom, Bondy, France).
44. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M (2002) *Am J Trop Med Hyg* 66:804–811.
45. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993) *Am J Trop Med Hyg* 49:520–529.
46. Poulin R (1993) *Int J Parasitol* 23:937–944.
47. Rozsa L, Reiczgel J, Majoros G (2000) *J Parasitol* 86:228–232.
48. Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* (Columbia Univ Press, New York).
49. Goudet J (1995) *J Heredity* 86:485–486.
50. Nei M (1978) *Genetics* 89:583–590.
51. Team RDC (2005) *R Foundation for Statistical Computing* (Vienna, Austria).
52. Sokal RR, Rohlf RJ (1995) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (Freeman, New York).
53. Yang RC (1998) *Evolution (Lawrence, Kans)* 52:950–956.
54. Goudet J (2005) *Mol Ecol Notes* 5:184–186.
55. Ter Braak CJF (1984) *Ecology* 67:1167–1179.

1.2 Echelle locale en zone de forêt africaine : le rôle des vecteurs *Anopheles nili* et *Anopheles moucheti*

Article 2. Annan Z., Durand P., Awono-Ambene P., Simard F., Arnathau C., Renaud F. & Fontenille D. *Plasmodium falciparum* genetic structure in its four major sympatric *Anopheles* vector hosts in Equatorial Africa. Article en préparation.

Dans une deuxième partie du travail, nous avons cherché à évaluer l'impact des espèces anophèles hôtes d'importance locale sur la distribution du parasite *P. falciparum* au sein d'un site de transmission palustre intense en Afrique. Cette étude a été menée à Simbock, village situé en zone forestière rurale équatoriale dégradée au sud du Cameroun. La situation particulière de ce village en proche périphérie urbaine, mais ayant conservé sa ruralité (rivière, cultures), lui vaut d'entretenir dans ses environs une grande variété de collections d'eau qui sont autant de gîtes favorables à une large diversité d'espèces anophèles. Parmi elles, les deux vecteurs majeurs africains *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* sont présents tout au long de l'année en sympatrie avec les deux vecteurs plus localisés mais d'importance majeure *An. nili* et *An. moucheti*, « le » vecteur de la forêt équatoriale (voir l'Article 4 en Annexe 3).

Un tel foyer de transmission, où pas moins de quatre espèces de vecteurs sont présentes en abondance et en sympatrie de façon pérenne, offre une opportunité unique pour l'étude de l'impact de la dimension « espèce hôte vecteur » sur la distribution et la structure génétique des parasites. Ces quatre espèces en effet diffèrent entre elles pour de nombreux caractères et traits d'histoire de vie, aussi bien que dans leur histoire évolutive avec le parasite *P. falciparum* (Coluzzi et al. 1999 ; Marshall et al. 2005).

Nous avons échantillonné et disséqué environ 7000 moustiques appartenant à ces quatre espèces anophèles à Simbock au cours de trois échantillonnages ponctuels (considérés comme des répliqués dans l'analyse) au sein des cases d'un même quartier du village. Un total de 345 oocystes ont été analysés génétiquement provenant de 85 estomacs infectés. Les résultats montrent, de la même façon que pour les deux vecteurs majeurs *An. gambiae* et *An. funestus* (Article 1), une consanguinité globale très significative chez les deux espèces locales ($F_{IT}=0,26$ chez *An. moucheti* et 0,62 chez *An. nili*), qui est majoritairement due à la forte différenciation génétique entre les infrapopulations d'oocystes des moustiques. La part de la consanguinité globale due au processus d'autofécondation entre gamétocytes génétiquement identiques au sein des moustiques diffère significativement entre espèces anophèles (plus faible chez *An. moucheti* par rapport aux deux espèces majeures *An. gambiae* et surtout *An.*

funestus). L'influence des oocystes génétiquement identiques et répétés au sein des estomacs sur l'estimation de ces paramètres est détaillée dans les Résultats complémentaires (Par. 3.2). Cet impact significatif de l'hôte vecteur sur la distribution de la variabilité génétique du parasite *P. falciparum* est également mis en évidence par l'analyse de la distribution des stades oocystes du parasite entre les vecteurs, où la proportion de moustiques *An. funestus* infectée en oocystes est significativement plus élevée que pour les autres espèces, alors que dans le même temps ils sont significativement moins chargés en oocystes.

L'impact significatif de l'hôte vecteur constaté à Simbock est discuté en fonction des caractéristiques du recrutement parasitaire par les différents vecteurs, tel qu'il est déterminé par des facteurs aussi bien internes au vecteur (compétence vectorielle) qu'externes (longévité, comportement trophique, distribution, abondance et dynamique des populations, etc.). Les effets potentiels de l'aléa d'échantillonnage sont également mis en avant étant donné les effectifs infectés obtenus par espèce.

L'importance de l'espèce vectrice sur la distribution des parasites *Plasmodium* est cruciale et doit être prise en compte dans les études qui visent à établir sur le terrain de nouveaux vecteurs génétiquement modifiés. Nos résultats démontrent une capacité évolutive du parasite ubiquitaire dans ses différentes espèces hôtes moustiques naturelles. La complexité des interactions du parasite et de ses hôtes vecteurs en milieu naturel est telle que l'introduction d'un vecteur nouveau dans ces conditions risque de n'avoir que très peu de conséquences sur la diminution du risque palustre dans les foyers à vecteurs multiples.

Article 2 :

Article en préparation

***PLASMODIUM FALCIPARUM* GENETIC STRUCTURE IN ITS FOUR
MAJOR SYMPATRIC *ANOPHELES* VECTOR HOSTS IN
EQUATORIAL AFRICA**

ZEINAB ANNAN, PATRICK DURAND, PARFAIT AWONO-AMBENE, FRÉDÉRIC
SIMARD, CÉLINE ARNATHAU, FRANÇOIS RENAUD & DIDIER FONTENILLE

***Plasmodium falciparum* genetic structure in its four major sympatric *Anopheles* vector hosts in Equatorial Africa**

Zeinab Annan^{§, 1, 2}, Patrick Durand², Parfait Awono-Ambene³, Frédéric Simard³, Céline Arnathau², François Renaud², Didier Fontenille¹

¹Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, UR016, Institut de Recherche pour le Développement, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

²Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche 2724, Institut de Recherche pour le Développement/Centre National de la Recherche Scientifique, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

³Laboratoire IRD de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, BP 288, Yaoundé, Cameroun

[§]Corresponding author

Email addresses:

ZA: zei_annan@hotmail.com

PD: patrick.durand@mpl.ird.fr

PAA: ambene_69@yahoo.fr

FS: simard@ird.fr

CA: arnathau@mpl.ird.fr

FR: françois.renaud@mpl.ird.fr

DF: didier.fontenille@mpl.ird.fr

Abstract

Background

In African malaria endemic areas, major *Anopheles* vectors are often sympatric, infected with mixtures of *Plasmodium* species and genotypes. To investigate the vector host impact on general features of *P. falciparum* population structure, we analysed the distribution of oocyst infection and neutral diversity within and among the four major species *Anopheles gambiae* s.s., *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti*, sampled at the scale of a village in a highly endemic malaria area of Equatorial Africa. Results are of major importance as central preliminary knowledge before engineered vector control or vaccine implementation programs in the field.

Methods

Adult *Anopheles* mosquitoes were collected in 2002, 2003 and 2004 in the periurban locality of Simbock, South Cameroon. Individually dissected oocysts were genotyped at 7 *P. falciparum* microsatellite loci. Patterns of parasite infection, genetic diversity and population structure among vectors and samplings were analysed using FSTAT, HIERFSTAT and CANOCO softwares.

Results

A total of 6,848 midguts were checked for oocysts out of 11,148 mosquitoes collected from the four *Anopheles* vectors, and 90 were found infected (1.3%, CI=1.1%-1.6%). *A. funestus* was the most endophagic species, and the most infected while carrying the lowest oocyst load. Genetic analyses were based on 345 individually dissected oocysts from 85 mosquitoes. Allelic polymorphism (13.1±1.9 alleles per locus) and mean expected heterozygosity (0.79±0.04) were high. Heterozygote deficits within and among mosquitoes were high and stable over time (mean $F_{IS}=0.17$ (CI=0.14-0.20, $P<10^{-4}$), mean $F_{ST}=0.37$ (CI=0.36-0.37, $P<10^{-4}$), but varied significantly among *Anopheles* species. A high proportion of midguts was found infected with repeated oocyst genotypes. All significant patterns were consistent over time. Both time (hierarchical analysis, $P<0.03$) and *Anopheles* species (CCA analysis, $P<0.01$) effects were significant on the distribution of oocyst genotypes.

Conclusions

Overall, the genetic population structure of *P. falciparum*, as evaluated by *F* statistics, was predominantly clonal rather than panmictic, a population structure that facilitates the spread of antimalarial drug and vaccine resistance and thus may impair the effectiveness of malaria control efforts. The impact of the *Anopheles* species factor on *P. falciparum* infection and neutral variability distribution within and among mosquitoes and vectors is discussed as a

potential direct consequence of differential host-seeking and blood-feeding behaviors among *Anopheles* vectors.

Background

Among the 484 *Anopheles* species spread worldwide, some 70 species are considered human *Plasmodium spp.* vectors and among them 40 are considered to be of vectorial importance [1, 2]. In Sub Saharan Africa, less than 20 out of 140 anopheline species present on the continent are able to transmit malaria parasites to the human host [3]. Among them, four species complexes are considered to be major malaria vectors, namely, *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti*, responsible for >95% of the total malaria transmission on the continent [4]. In a large variety of endemic areas, these species ensure a simultaneous and sympatric malaria transmission, all year-round or complementing each other to relay the transmission far into the dry season [4, 5]. The complexity of the vectorial system in Africa, finely adapted to the wide range of African ecological settings, thus contributes to the huge variation observed in malaria transmission intensity throughout the continent, often over very short distances and time periods [4, 6]. In the equatorial forest area of Central Africa, the four primary vectors are commonly found in sympatry, simultaneously involved in the transmission of the three *Plasmodium* parasite species *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. ovale*, yielding the high rates of EIR observed in the area [4]. The multiplicity of potential vector hosts is a crucial feature of pathogen populations, being able to affect population evolution and dynamics, with significant implications for field implementation of disease and vector control [7-9]. Consequences of multiple vector hosts on the distribution of particular *Plasmodium* species or, within species, particular parasite genotypes, have been reported. For example, differences in mosquito susceptibility to circumsporozoite protein variant types of *P. vivax* were observed between *A. albimanus* and *A. pseudopunctipennis* [10]. Moreover, numerous evidences have suggested a genetic basis to variation in *A. gambiae s.s.* susceptibility to *P. falciparum*, a mechanism which is likely to occur among vector species [11, 12]. Specificity in host-parasite interaction defined by host genotypes that are resistant to only a subset of parasite genotypes and parasite genotypes being infective to a subset of host genotypes, could potentially occur in malaria foci where the high vector complexity has long been associated with a high level of parasite genotypic and clonal diversity [13]. Yet, this feature has been hardly investigated up to date in the *Anopheles* host-*Plasmodium* parasite system. The four vectors *A. gambiae s.s.*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti*, which are found in sympatry in the African equatorial forest, define two groups of species with potentially different evolutionary history of host-parasite interaction. Initially, malaria transmission is

indeed thought to have been carried out in Neolithic Africa by the more zoophilic and rainforest species *A. nili* and *A. moucheti*, transmitting primate parasites such as *P. reichenowi*. The evolution of the more anthropophilic taxa *A. gambiae* and *A. funestus* occurred much more recently, probably as a direct consequence of the impact of humans on the surrounding environment, and penetration of the forest [14, 15]. Co-evolutionary adaptation may have led to differential adaptation of *Plasmodium spp.* or genotypes to these two groups of *Anopheles* hosts. Moreover, each of the four species have evolved its own life-history traits, differing in their distribution, biology, vectorial competence and trophic behaviour [4, 16, 17], potentially leading to differential patterns of the parasite genetic diversity distribution among individual mosquito hosts among species. We focused our study on the most dangerous *P. falciparum* species, and addressed the following issues at the scale of a highly endemic malaria transmission focus in South Cameroon, Equatorial Africa: (i) how the parasite genetic variability was distributed among mosquitoes and evolved in the four major *Anopheles* African vector hosts; (ii) whether particular *P. falciparum* genotypes may be circulating among the four major *Anopheles* vectors; and, (iii) the stability of the observed patterns over time. Oocysts from each four simultaneously sampled vector host (three temporal replicates) were analyzed using a set of seven potentially neutral microsatellite markers. *P. falciparum* infection parameters and neutral variability distribution were analyzed within and among individual mosquito hosts and vector species, shedding light on the parasite population structure in its multiple major vector hosts at the local scale in an equatorial African malaria focus.

Methods

Sampling site

In order to prevent any potential bias due to geographic origin in our sampling design, we sampled *P. falciparum* parasites from four different *Anopheles* species present in sympatry all over the year at the scale of one village of South-Cameroon, Simbock (3°50'N, 11°30'E). Mosquitoes were collected in 10 households of the village, situated in the close suburb of Yaoundé, the capital city of Cameroon, in the equatorial forest area of the country. Climate is equatorial with two rainy seasons, extending from March to June and September to November. Annual rainfall are around 1500 mm spread all over the year. A variety of breeding sites surrounding the area (river, marshes, pisciculture and water pools) enables the perennial and sympatric presence of the four major African malaria vectors *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti*, along with a few other secondary vectors [5]. This complex vectorial system is responsible for a malaria transmission of around one

infected bite per human per night in the village (around 300 infected bites/human/year, [17]). Malaria in Simbock is hyperendemic, with >80% of children aged 5-9 years being *P. falciparum* infected (data not shown).

Mosquito collections and field processing

Mosquito collections were performed during three consecutive time periods, in November 2002 (end of the long rainy season), March 2003 (end of the following little dry season), and November 2004 (end of the long rainy season). Mosquitoes were captured both indoor and outdoor by landing catches from 08:00 pm to 06:00 am in 10 households from the same quarter of the village, distant from each other by no more than one kilometer. Specimens from the *Anopheles* genus were identified to species according to morphological identification keys [16, 18] and their midguts dissected the morning of their collection in a physiological saline solution. Midguts were checked for the presence of oocysts under a compound microscope. Oocyst-infected stomachs were stored in separate 1.5 ml microtubes containing 80% ethanol along with the remainder of the mosquito. Samples were brought to Montpellier laboratory and stored at +4°C. Infected mosquitoes from the four *Anopheles* species were then identified to their respective subspecies using PCR-based diagnostic assays: females from the *A. gambiae* group were identified to species [19], and *A. gambiae* s.s. was identified to M and S molecular forms [20]. Specimens from the *A. funestus* group were identified to the *A. funestus* subspecies [21], and specimens from the *A. nili* complex to the *A. nili* species [22].

Oocyst dissection and microsatellite genotyping

Oocysts were individually dissected from each stomach after gradual rehydration of the specimens into distilled water using a statif Leica (Deerfield, IL) inverted DMIRB microscope and mounted minuten pins. Individual oocysts were teased from the basal lamina of the midgut epithelium and transferred to individual 0.5 ml tubes containing 10 µl of distilled water using a flame-narrowed Pasteur pipette. Tips and dissecting tools were washed in Javel water and 70% ethanol and changed regularly to avoid contamination. Parasite DNA from each oocyst was extracted using the DNEasy Tissue Kit of Qiagen (Valencia, CA). The seven microsatellite loci employed were chosen among the 12 loci used by Anderson et al. [23] from loci initially described by Su & Wellems [24]. They were distributed on five different *P. falciparum* chromosomes (Genbank accession N°: G37809, G38876, G37848, G37851, G37852, G38838, G38842). We used a two-step heminested strategy for amplification as described in Razakandrainibe et al. [25]. The microsatellite PCR products were sized relatively to an internal size standard and resolved using GENESCAN software version 3.1 on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

***P. falciparum* infection in its mosquito hosts**

Oocyst infection rates and their 95% confidence intervals (CI), mean oocyst intensity per mosquito, indices of parasite distribution within mosquitoes (variance to mean ratio and index of discrepancy), and comparisons between *Anopheles* species and time period were computed using the QUANTITATIVE PARASITOLOGY 3.0 computer program [26].

Genetic analyses

Genetic variability was quantified as allelic richness computed using FSTAT version 2.9.4 [27], as well as observed (H_O) and expected heterozygosity under panmixia (H_E), calculated using the unbiased estimator of Nei, 1978 [27] correcting for small sample sizes. Comparisons between populations were performed using non-parametric tests on two or more samples (Wilcoxon two-sample and Kruskal-Wallis tests) using the R software [28, 29]. We used FSTAT version 2.9.4 [30] to calculate F -statistics, which measure genetic variation within and among populations. The *P. falciparum* oocyst population can be described as a nested hierarchy [31] in which the species-wide (or component) population is the sum of all infrapopulations of oocysts distributed in mosquito hosts. Parasite infrapopulations (i.e. oocysts within individual mosquito hosts) can then be grouped among *Anopheles* vectors, or among time periods, in order to elucidate the boundaries of the appropriate evolving units of the parasite population (i.e. demes).

F_{IS} was estimated and tested by randomizing alleles between oocysts within each of the 57 oocyst infrapopulations harbouring more than one oocyst. F_{ST} between infrapopulations (the fraction of the total allelic variance distributed among mosquitoes) was estimated and tested by randomizing oocyst genotypes between infrapopulations (mosquitoes) within component populations.

Because the highly significant differentiation observed between infrapopulations strongly affects population differentiation computed between oocyst populations from different sampling year [32], the fixation index F_{ST} among temporal replicates was estimated using HIERFSTAT version 0.04-2 [33] to investigate the parasite temporal structure. The package was designed for the statistical software R and computes F -statistics from any number of hierarchical levels, enabling to take into account the highly significant effect of the mosquito level on parasite population structure in order to estimate the significance of higher levels of structure. Significance of the hierarchical F -statistics was assessed by 1000 permutations of infrapopulations (mosquitoes) among populations (time periods).

The *Anopheles* species cannot be considered as a hierarchical level, because two mosquitoes from different species can feed on the same infected human host. In order to measure and illustrate levels of genetic differentiation between *P. falciparum* harboured by the two vectors

A. gambiae and *A. funestus* in the three sites, a canonical correspondence analysis (CCA) was carried out using CANOCO software. CCA searches for the multivariate relationships between two data sets (e.g., a genetic data set and a species environmental data set) [34]. Only oocysts for which all microsatellite loci (i.e., seven) could be scored were considered for the CCA. The significance of the canonical axes was tested with a Monte Carlo permutation test [35]. This also allows estimation of the 95% confidence intervals of the centroids of each population.

Genotypic linkage disequilibrium among polymorphic loci was measured with the correlation coefficient R and its statistical significance tested with a randomization test using the log-likelihood G -test statistic and Bonferroni's corrections applied to the P -values as implemented in FSTAT version 2.9.4.

Results

Density, distribution, and behaviour of *Anopheles* vectors in the village

A total of 11,148 mosquitoes from the four *Anopheles* species *A. gambiae s.s.*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti* were collected in 2002, 2003 and 2004 in the African locality of Simbock, a periurban village in the equatorial forest area of South Cameroon, Central Africa. The two species *A. gambiae* and *A. nili* (mean proportion of 50% and 30.5% across samples respectively) were alternatively the two most abundant over the three time periods, while mean relative abundances of *A. moucheti* (12.4%) and *A. funestus* (8%) were lowest but remained stable over time (Figure 1A). Each of the four *Anopheles* species was sympatric in stable relative proportions within each of the ten collected households, with no species clustering at the scale of our sampling (Figure 1B for the 2004 sampling). This pattern is stable over time in the village, as it was already observed by Antonio-Nkondjio *et al.* [17] in a two-years entomological survey carried out monthly from 1999 to 2000 in the same households of the village (pers. comm.). The only difference with the present study was a noticeable turnover in species proportions, as *A. moucheti* used to be the most abundant vector in the village and tend now to be replaced by *A. gambiae s.s.* and *A. nili*. Rapid urbanization of the area may participate in this evolution of vector populations. Night biting cycles strongly differed among species, relative proportions of collected mosquitoes after midnight being significantly higher for *A. gambiae s.s.* (72%) than for the three other species (Fischer's exact test, $P < 10^{-3}$), and higher for *A. funestus* (65%) than for *A. nili* and *A. moucheti* (both 52%, Fischer's exact test, $P < 10^{-3}$). The exact same trend between the two groups of species was already observed by Antonio-Nkondjio *et al.* in their longitudinal survey of *Anopheles* vectors in the same site, *A. gambiae s.s.* biting late at night, followed by *A. funestus*, the

feature being less pronounced for the two species *A. nili* and *A. moucheti* [17]. Similarly, trophic behaviour differed significantly among species, proportions of *A. funestus* females collected indoor (71%) being significantly higher than for the three other species (Fischer's exact tests, $P < 10^{-3}$), *A. gambiae* and *A. moucheti* being endophagic to a lesser extent. The particular endophagic behaviour of *A. funestus* was also already pointed out by Antonio-Nkondjio *et al.* [17] in the same site two years ago. These behavioural patterns thus appeared to be stable life-history traits of the four *Anopheles* species in the area.

Vector host infection and parasite distribution

We dissected 6,848 wild-caught sympatric female mosquitoes from the four species *A. gambiae s.s.* (32%), *A. funestus* (11%), *A. nili* (42%) and *A. moucheti* (15%) collected in Simbock (Table 1). Midguts of 90 or 1.3% [95% confidence interval (CI) = 1.1-1.6] mosquitoes were infected with *Plasmodium falciparum* oocysts. Proportions of infected mosquitoes varied significantly from the 2003 dry season to the 2004 wet season (2.3% vs. 0.9% respectively, Fischer's exact test, $P < 10^{-3}$). Variation in *P. falciparum* prevalence among *Anopheles* species was significant: the proportion of infected mosquitoes was higher for *A. funestus* (3.5%) than for any other species across samplings (Table 1, Fisher's exact tests, $P = 10^{-3}$) as well as for each sampling (strong tendencies). Infected proportion of *A. gambiae* was similar to *A. moucheti*'s (1.5% and 1.2%, Fisher's exact test, $P = 0.5$), and significantly higher to *A. nili*'s (0.7%, Fischer's exact test, $P = 4.10^{-3}$). Infected proportions of mosquitoes were homogeneous between the two local vectors *A. nili* and *A. moucheti* (Fisher's exact test, $P = 0.1$). The mean number of oocysts per infected mosquito (i.e. infection intensity) across samplings (Table 1) differed significantly between *A. gambiae* (7.0) and *A. funestus* (3.8) (Bootstrap 2-sample t-test, $P = 0.04$), no other significant difference in infection load being detected (all $P > 0.2$). Mean crowding of parasites in *A. gambiae* and *A. nili* were significantly higher to *A. funestus*'s ($P < 0.05$). We also compared the mean abundance of infection among species (i.e. the mean number of parasites found in all hosts, product of prevalence and intensity). Mean abundance of infection in *A. funestus* highly significantly differed from the three other species, this species being thus the most infected, while carrying the lowest oocyst load (Bootstrap 2-sample t-tests, 10,000 replications, all $P < 2.10^{-3}$). The index of discrepancy, quantifying the extent to which the observed oocyst distribution among mosquitoes vary from a uniform distribution [36], ranged from 0.977 for *A. funestus* and 0.997 for *A. nili* across samplings; the variance-to-mean ratios varied from 5.72 for *A. funestus* to 17.54 for *A. nili* (Table 1). All values are characteristic of the aggregated distribution generally observed for parasites within their hosts, with a high proportion of parasites concentrated in a small

fraction of hosts [37]. This pattern was already described for oocysts in their anopheline mosquito hosts [38-40].

Genetic polymorphism

We assayed seven previously described microsatellite loci [23-25], located on five chromosomes (chr.): *POLYa* (chr. 4), *TA60* (chr. 13), *ARA2* (chr. 11), *Pfg377* and *PfPK2* (chr. 12), *TA87* and *TA109* (chr. 6). The population genetics analyses were based on 345 oocysts individually dissected from 85 mosquito guts: seven loci were successfully amplified from 323 oocysts, while six and five loci could be genotyped from an additional 12 and 10 oocysts, respectively.

Identified clones. Identical oocyst multilocus genotypes were found in all four *Anopheles* species surveyed for each time period. In total, 21 multilocus genotypes out of 323 were repeated, the total number of repetition ranging from 2 to 21, while 223 genotypes out of 323 were unique. Within mosquitoes, the range (2-17) and variance in zygote reproductive success (14,9) were high. A total of 22 mosquito guts out of 57 with >1 genotype contained a repeated oocyst genotype (39%). No genotype was shared among years, but for each year, several identical multilocus genotypes were found to be shared among different mosquitoes belonging to different *Anopheles* species. In 2003, a genotype repeated 12 times was shared between three *A. gambiae* and two *A. funestus* mosquitoes. Proportions of repeated genotypes per mosquito gut did not differ significantly among time period, nor among *Anopheles* species across samplings (Kruskal-Wallis tests, all $P>0.07$), although a strong tendency was observed for *A. nili* to carry more repeated genotypes per mosquito than the three other species ($P=0.07$). Repeated genotypes were not removed for subsequent genetic analyses, because they do reflect reproductive events in the previous parental generation of *P. falciparum* gametocytes. Moreover, genetically identical sporozoites originating from identical oocysts do play a subsequent role in the transmission to the human host.

Allelic polymorphism. All loci were highly polymorphic showing an average (\pm SE) of 13.1 (\pm 1.9) alleles per locus, ranging from 7 in *Pfg377* to 21 in *Polya*. Mean allelic richness (\pm SE) of parasite infrapopulations (oocysts within mosquitoes) across samplings was 1.8 (\pm 0.04), the variation among species ranging from 1.76 (\pm 0.04) for *A. funestus* to 2.85 (\pm 0.18) for *A. moucheti*. There was a significant temporal effect (Kruskal-Wallis test, $P=10^{-3}$) on the parasite allelic richness within its mosquito hosts, infrapopulations allelic polymorphism being lower in 2002 (1.74) as compared to the two subsequent samplings (2.86 for both 2003 and 2004).

Heterozygote frequencies. The genotypic frequencies computed across samplings suggested considerable inbreeding in the *P. falciparum* populations of the two vectors *A. gambiae* and *A. funestus*, and lower inbreeding levels for the two vectors *A. nili* and *A. moucheti*. Total

expected frequencies of heterozygotes [27] of the four species-wide parasite populations across time periods were homogeneous among *Anopheles* hosts, ranging from H_E (\pm SE)=0.76 (\pm 0.05) in *A. moucheti* to 0.79 (\pm 0.04) in *A. gambiae*, as illustrated in [Figure 2B](#). By contrast, total observed frequencies of heterozygotes varied highly significantly among *Anopheles* species, ranging from H_O (\pm SE)=0.31 (\pm 0.01) in *A. nili* to 0.59 (\pm 0.05) in *A. moucheti*. Such a discrepancy is remarkable among parasites carried by sympatric vectorial *Anopheles* species within a transmission site. The discrepancy between total expected and observed frequencies of heterozygotes across species were high and stable over time, ranging respectively from H_E =0.73 (\pm 0.03) and H_O =0.48 (\pm 0.05) in 2002, equal to 2003, to H_E =0.78 (\pm 0.05) and H_O =0.31 (\pm 0.03) in 2004.

***P. falciparum* population structure within and among mosquitoes**

We used ***F*-statistics** to explore the distribution of the observed heterozygote deficits within and among parasite populations. Considering the whole population of oocysts distributed in their respective mosquito hosts (infrapopulations), the departure from panmixia was F_{IT} = 0.47 (CI = 0.45-0.49; $P < 10^{-4}$). If we considered oocysts infrapopulations from the four *Anopheles* species across samplings, the values varied greatly among species, ranging from 0.26 (CI = 0.18-0.32; $P < 10^{-4}$) in *A. moucheti* to 0.62 (CI = 0.59-0.64; $P < 10^{-4}$) in *A. nili*. This difference among vector species was due to the fraction of the total allelic variance of *P. falciparum* oocysts distributed among mosquitoes in the four vector species (F_{ST} between mosquitoes), but also to the fraction distributed between oocysts within mosquitoes (F_{IS}).

F_{IS} measures departure from panmixia due to the nonrandom association of alleles within oocysts in mosquitoes [41]. The total average F_{IS} was calculated from the 57 mosquito guts (infrapopulations) with >1 oocysts, and was 0.17 (CI = 0.14-0.20; $P < 10^{-4}$), single loci F_{IS} estimates being positive and statistically significant ([Figure 2A](#)). Significant differences were observed between species when all loci were combined, *A. funestus* displaying the highest F_{IS} value of all four species across samplings (Wilcoxon two-sample test, $P=0.03$): 0.31 (CI=0.26-0.34; $P < 10^{-4}$) for 17 infrapopulations, while F_{IS} was not significant within *A. moucheti* infrapopulations: 0.03 (CI=-0.06-0.10; $P=0.3$) for 10 infrapopulations ([Figure 2B](#)). We estimated the selfing rate (S) from the relationship $F_{IS} = S/(2-S)$, assuming the F_{IS} within mosquitoes only resulted from self-fertilization. The mean selfing rate for the whole sample was $S = 0.29$ (CI=0.25, 0.34). F_{IS} varied across species over time, but remained significant, from 0.18 (CI=0.11-0.25, $P < 10^{-4}$) in 2002 to 0.05 (CI=0.01-0.09; $P=0.03$) in 2003, reaching 0.36 (CI=0.32-0.40; $P < 10^{-4}$) in 2004. Heterozygote deficits F_{IS} were also computed for each infrapopulation containing ≥ 4 oocysts, to obtain individual values for each breeding unit (i.e. parasite deme level within mosquitoes) ([Figure 3](#)).

The non-random distribution of genotypes among mosquitoes estimated by **the parameter F_{ST}** accounted for the largest component of the global departure from panmixia. For the total population, mean F_{ST} was 0.37 (CI=0.36-0.38; $P<10^{-4}$) (Figure 2A); it ranged from $F_{ST}=0.25$ (CI=0.21-0.29; $P<10^{-4}$) for *A. moucheti* to 0.59 (CI=0.57-0.61; $P<10^{-4}$) for *A. nili* across samplings (Wilcoxon two-sample tests, $P<10^{-3}$, Figure 2B). The variation over time ranged from $F_{ST}=0.29$ (CI=0.26-0.30; $P<10^{-4}$) in 2002 to 0.43 (CI=0.41-0.45; $P<10^{-4}$) in 2004. The F_{ST} values observed between mosquitoes across samples were similar to those previously observed for populations of *P. falciparum* from Papua New Guinea [42] or from Kenya [25].

Time and *Anopheles* species effects on *P. falciparum* population structure

F_{ST} between time periods. F_{ST} were computed using HIERFSTAT between oocyst infrapopulations from two consecutive samplings (see Materials and Methods) within each *Anopheles* species. Temporal differentiation within host species between oocyst infrapopulations from two consecutive time periods were not significant (all $P>0.11$). However, we observed a significant temporal heterogeneity between parasites from two consecutive samplings across *Anopheles* species: F_{ST} computed using HIERFSTAT were 0.02 ($P=0.02$) between 2002 and 2003, and 0.04 ($P=0.03$) between 2003 and 2004.

Genetic differentiation between *Anopheles* species. We used CCA to determine the relative contribution of the vector species to the global genetic structure of *P. falciparum* populations. A graphic representation of the results displays the distributions (i.e., centroids and ellipses of the 95% CI in Figure 4) of the genetic variability of *P. falciparum* sampled from the four vectors across time. A Monte Carlo permutation test on the first four canonical axes revealed significantly non-overlapping distributions of *P. falciparum* genetic variability among species ($P=0.006$). This effect was due to *A. moucheti* parasites, grouping significantly apart from *A. gambiae* and *A. nili*'s parasites ($P<0.003$), themselves constituting a homogeneous group of genotypes ($P=0.2$). *A. funestus* parasites were homogeneous to both *A. moucheti* and (*A. gambiae*+*A. nili*) groups ($P>0.08$). However, this significant vector species effect overall samplings was not stable over time, as it was observed in 2002, but not in 2003 (2004 could not be tested, *A. moucheti* being quasi-absent from this sample). Such patterns must be taken cautiously: the overall significant species effect observed across time periods indeed discriminates a group of 200 genotypes from 45 mosquitoes (*A. gambiae*+*A. nili*) from another group of 49 genotypes derived from 12 mosquitoes only (*A. moucheti*). Due to the limited number of infected mosquitoes obtained for *A. moucheti*, such a result can reflect the random sampling of mosquito probing among human hosts, rather than any genuine host species effect. However, the significant number of genotypes tested for the two species *A.*

gambiae and *A. nili*, as well as for *A. funestus* (74 genotypes from 25 mosquitoes), allow for a tendency to be taken into account.

Linkage disequilibrium

Linkage disequilibrium was statistically significant for 19 out of 21 pairs of loci in *A. gambiae*, $R = 0.55-0.70$ and for 8 out of 21 pairs of loci in *A. funestus*, $R = 0.65-0.81$ ($P < 10^{-4}$ for both species with the Bonferroni correction). The difference between the two species may be due to the smaller number of oocysts in infrapopulations (i.e. infected mosquitoes with >1 oocysts per gut) in *A. funestus* (72 oocysts in 17 mosquitoes) than in *A. gambiae* (114 oocysts in 18 mosquitoes). Linkage disequilibrium was not due to close physical linkage between loci, as the seven microsatellite loci are distributed among five different chromosomes, so that only two out of the 21 pairwise comparisons involved loci located on the same chromosome [25]. However, significant linkage disequilibrium was observed for only 1 pair out of 21 in *A. moucheti*, $R = 0.61-0.76$, and zero pair out of 21 for *A. nili*, $R = 0.46-0.73$ ($P > 2.4 \cdot 10^{-4}$ for both species with the Bonferroni correction). The difference between the two groups of vectors may also be due to the smaller number of oocysts per infrapopulations in *A. nili* (83 oocysts in 12 mosquitoes) and *A. moucheti* (48 oocysts in 10 populations) compared to *A. gambiae* and *A. funestus*. For *A. moucheti* however, this result is in accordance with the absence of heterozygote deficit already observed in parasite infrapopulations within mosquitoes (Figure 2B). Linkage disequilibrium were also computed from the whole set of infrapopulations of each sampling period to analyse the stability of the pattern over time: respectively 13 ($R=0.51-0.70$), 18 ($R=0.65-0.74$) and 13 ($R=0.52-0.75$) pairs of loci out of 21 were found in significant linkage in 2002 ($P < 2 \cdot 10^{-4}$), 2003 ($P < 9 \cdot 10^{-5}$) and 2004 ($P < 1.5 \cdot 10^{-4}$).

Discussion

Our results address the global central issue of the distribution of the *P. falciparum* parasite gene pool within and among its four major African mosquito vector species, namely *Anopheles gambiae s.s.*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti* at the local scale and in time in a high endemicity area of Equatorial Africa. Three specific issues are investigated with important epidemiological consequences: (i) patterns of *P. falciparum* infection and oocyst distribution in the four sympatric vector hosts; (ii) the impact of transmission pattern on the distribution of oocysts neutral variability within and among mosquito hosts; and (iii) the time and *Anopheles* species effects on the degree of genetic differentiation among populations of *P. falciparum* sampled in the vector host at the local scale.

Central features of life-history traits of the four main African *Anopheles* vector species *A. gambiae s.s.*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti* have already been described by numerous

authors and studies throughout the African continent [16, 43, 44]. These four species are found in sympatry in the distribution range of the species *A. moucheti*, limited to the equatorial forest river edges. The two species *A. gambiae s.s.* and *A. funestus* are the most widely spread vectors throughout Africa south of the Sahara [45], including dry savannas and humid forest areas. Colonization of the equatorial African forest environment by both species was tightly linked to human presence and, most importantly, human-driven environmental modifications of the forest milieu (such as deforestation for agricultural practices) [46]. This close dependency to human dwellings and activities as both sources of food and shelter is thought to have driven their evolution towards closely human-linked behaviours, and as a by-product, enhanced the transmission and given rise to the highly pathogenic modern human parasite species *Plasmodium falciparum* [15, 47, 48]. By contrast, the two vectors *A. nili* and *A. moucheti* are ancestral equatorial forest species usually found along rivers, their densities being closely related to the flow level; *A. nili* being more largely distributed than *A. moucheti* [43]. These two species are thought to have transmitted primate *Plasmodium* species, having coevolved ancestrally with *Plasmodium* parasites and adapted later to humans and thus transmitted *P. falciparum*. Such differences in respective presumed co-evolutionary history between *P. falciparum* and these two groups of vectors may yield differential patterns of infection and parasite neutral variability distribution among the two vector groups. While the four vectors indeed differ in their distribution and biology, patterns related to *Plasmodium spp.* infection are less clear, and in particular, comparisons between their respective *P. falciparum* infection parameters and oocyst distribution in natural sympatric populations have been hardly investigated at the local scale.

Here we confirm, combining data with a previous study [17] that *A. funestus* seems to be the most competent vector of all four at the scale of the Simbock village, displaying the highest oocyst rates. Such observations for *A. funestus* as the most infected vector species where present in sympatry with other *Anopheles* species corroborate former observations in the same site [17], but also in a West African setting [6], while this difference was not observed in East Africa ecological settings [49]. This feature thus appear to be an intrinsic selected trait of the species in Central and West Africa ranges, being observed in spatially and temporally distant sites, as well as in the same site over time, but not in distantly related populations. Patterns of *P. falciparum* oocyst distribution among individual hosts were similar within the four species, with a highly aggregated distribution of parasites among individual mosquito hosts, a few individuals being infected with a large oocyst load. *Anopheles funestus* however displayed the highest infection rate combined with the lowest infection load of all four species. Prevalence and mean intensity, two different crucial parasite infection

parameters, may reflect different pathways of the infection process [50], a recent study lead on *P. falciparum* infection between isogenic females suggesting a different genetic basis for infection rate and infection load of *P. falciparum* in its *Anopheles* hosts [51]. Differential oocyst rates among *Anopheles* species may reflect a species heterogeneity in susceptibility to infection or in host-parasite encounter rates. Heterogeneity in vector-hosts contacts (i.e. modifications in the biting rate, or a biting behaviour directed preferably towards infectious humans [52]) have been suggested to be largely underestimated for major vector species such as *A. gambiae* and *Aedes* [53, 54]. By contrast, intensity and abundance of infection parameters more directly reflect the vectorial susceptibility of the vector host towards local strains of *P. falciparum*. A better control of *P. falciparum* infection by *A. funestus*; or, a lowest ability for *A. funestus* mosquitoes to cope with high infection load, associated with a higher mortality rate due to risky host-seeking behaviour [55]; or, alternatively, multiple genetically diverse intense infections enhancing the virulence of infectious parasite strains [9], are potential mechanisms which would all result in the observed absence of the most heavily infected part of the *A. funestus* population. As we are not aware of any study describing any enhanced heterogeneous biting for *A. funestus*, data from both oocyst prevalence and intensity may be indicative of a tendency towards higher intrinsic vectorial competence for *A. funestus* compared to the three other sympatric *Anopheles* species (i.e. higher susceptibility to local *P. falciparum* strains). Alternatively, such a pattern might testify for a particular ability developed by this species to limit the intensity of parasite infection.

It has been shown that factors such as lack of sugar potentiates blood-feeding frequency, only for *A. gambiae* mosquitoes surviving >20 days [56]. Nutrients derived from blood are sufficient for mosquito survival. The observed inherent differences in patterns of host-seeking behavior among anophelines species [54] can enhance different blood feeding strategies to be mounted among *Anopheles* species. For example, it has been shown that, for *A. gambiae s.l.* and *A. funestus* mosquitoes of West Kenya to survive primarily by blood-feeding is linked to their endophilic resting behavior: they limit their flights outside in search of sugar or oviposition sites. Patterns of blood-feeding, sugar feeding and oviposition are highly adaptive for survival in endophilic resting mosquitoes of West Kenya. Thus, endophilic resting behavior entails continual re-feeding on humans inside houses, and restricted flights outside, which amplifies their malaria vector potential. Such a pattern observed in Kenya would also perfectly apply to highly endophilic *A. funestus* of the Equatorial African forest, and may explain the highest *P. falciparum* oocyst infection rate observed for this species in Simbock.

One way to test such hypothesis is to analyse and compare *P. falciparum* parasites recruitment among the different vector species through analysis of the neutral variability distribution within and among mosquitoes from the different vector hosts present at the local scale. If *A. funestus* bites more often than the other *Anopheles* species, we might expect a higher species-wide (i.e. total pool of oocyst genotypes) or infrapopulation (i.e. oocysts within mosquito) allelic richness and expected diversity for this species. However, this was not the case across samplings, species-wide genetic diversity parameters being homogeneous among vectors, mean allelic richness of oocyst infrapopulations being even lower for the *A. gambiae* and *A. funestus* group compared to the *A. nili* and *A. moucheti* group. If these highly endophilic species tend to rest and feed and re-feed inside houses, such a pattern is understandable: they limit their flights outside, and thus the diversity of hosts bitten, re-feeding on the same hosts, and thus limit the genetic diversity of their parasite infrapopulations and species-wide populations. Such a behaviour may have a direct consequence on parasite mating structure within this *Anopheles* host: as the same parasites from the same hosts are recruited, mating occur among identical or related parasites.

Indeed, we observed highly significant heterozygote deficits within *A. funestus* infrapopulations with high F_{ST} values between mosquito parasite infrapopulations for each species over time (Figure 2B). Such values were confirmed by similar observations from Papua New Guinea [42] and Kenya ([25], Annan et al. 2007). The heterozygote deficits observed overall *Anopheles* species in this transmission focus is consistent with a similar pattern of population structure from these two sites. The strong between-mosquito differentiation observed imply that each bloodmeal constitutes a genetically distinct infrapopulation, resulting from the random sampling by individual mosquitoes of a few number of genetically distinct parasite gametocytes. Added to this, the effect of heterogeneity in individual mosquito susceptibility to infection [11], if exerted at the parasite genome-wide level, may also enhance the genetic differentiation observed among mosquito oocyst pools. Under such circumstances, interrupted or multiple blood feeding can result in highly genetically differentiated pools of oocysts cohabiting in the same mosquito midgut, with a strong Wahlund effect, contributing to the F_{IS} observed. If we consider that oocysts can last as long as 15 days under natural conditions [57], the chance for a mosquito to perform two or more successive infectious bloodmeals on mature-gametocyte carriers (1 out of 10 in highly endemic area) within a period of time of 4-5 days are not negligible, all the more if the species exhibits a particular biting behaviour with common interrupted or multiple feedings. Additively, these high F_{IS} values might testify for a significant amount of self-fertilization among *P. falciparum* gametocytes within *Anopheles* species. Such a feature was already

observed in distantly related ecological settings of PNG and Kenya, in time and in different *Anopheles* species [25, 58]. The two species *A. gambiae* and *A. nili* also displayed significant heterozygote deficits across samples, while *A. moucheti* did not. If heterozygote deficits are the results of a self-fertilization strategy used by the parasite, we must acknowledge the possibility of a variation of this strategy among *Anopheles* hosts, the parasite being able to outcross more in certain species or under particular conditions. Or, if we consider the Wahlund effect hypothesis, we might argue for different biting behaviours among species, with a weaker tendency towards multiple or interrupted bitings, along with the possibility for random mating among gametocytes from unique infectious bloodmeals for *A. moucheti*. This would be consistent with a different blood feeding behaviour among *Anopheles* hosts: species such as *A. nili* and *A. moucheti* have been shown to have evolved significantly less endophilic behaviours than *A. gambiae* and *A. funestus*, thus dispersing more among houses at the scale of the village. Consequences on their parasite populations are visible: higher genetic polymorphism of their parasite infrapopulations (mean of 2.8 versus 1.8 alleles per infrapopulations), and significantly lower levels of inbreeding, indicative of a more diverse parasite recruitment. Such a hypothesis may be consistent with previous studies on parasite transmission from the human host to the vector [59, 60], emphasising the household level as the primary unit of malaria transmission in Africa.

Our results of observed parasite genetic diversity and infection parameters among mosquito hosts can be understood in the more comprehensive framework of transmission patterns of parasites from host-to host under a metapopulation model. [Figure 3](#) displays F_{IS} values within mosquito guts containing ≥ 4 oocysts. The values are distributed over a large range, from negative to highly positive values. Self-fertilization in the mosquito gut occur between genetically identical male and female gametocytes, resulting in the formation of identical homozygous diploid zygotes, and high F_{IS} values. Negative values testify for an excess of heterozygotes, and are enhanced by the presence of multiple repeated genotypes heterozygous for all locus, products of fertilization events between two crews of genetically distinct parasite gametocytes. Negative F_{IS} values were also shown to occur when computing F_{IS} from a very small number of breeders [61], which might be the case for those values remaining negative after the removal of repeated genotypes (data not shown).

Indeed, previous conclusions from theoretical modelling and empirical data have described important variation of F_{IS} and F_{ST} estimates induced by the presence of identical repeated multilocus genotypes in infrapopulations from complex life-cycle parasites [62, 63]. Such models focused on macroparasites, the difference with the *P. falciparum* life-cycle

residing in the fact that the clonal amplification of sexual stages occurs in the vertebrate host, i.e. male and female gametocytes are clonally amplified from merozoites in the human blood [1], and then are directly ingested by the mosquitoes without any other intermediate host or external phase.

Theoretical framework for parasite population structure among hosts have been proposed under several biological models of parasite transmission [64, 65], and recently applied to experimental studies of parasite natural population structure among hosts [66]. The transmission process of the *P. falciparum* parasite among its vertebrate and mosquito hosts, actual mating system in natural parasite populations, and what constitutes exactly the limits of the parasite deme are crucial to be defined for *P. falciparum*, as it affects levels of genetic diversity, opportunity for local adaptations and other evolutionary processes [67]. If the overall population functions as the evolving unit (i.e. the deme), then specific features of the parasite gene pool distribution among hosts are expected, including high overall expected genetic diversity, low genetic differentiation among infrapopulations and absence of repeated genotypes. If offspring are transmitted as a clump from generation to generation, then the component population will behave more like a traditional subdivided population with infrapopulations as demes. *P. falciparum* has an asexual amplification stage in the human intermediate host. Transmission to the mosquito definitive host will control the variance in clonal reproductive success, which will have a large influence on effective size and rates of inbreeding. Here we have shown that natural populations of *P. falciparum* in multiple vector hosts display a high species-wide genetic diversity (mean 0.79 ± 0.11), similar to observations from Kenya, and throughout Africa [23, 25]), along with a high variance in the reproductive success of clones, and a high proportion of infected midguts containing at least two repeated genotypes. Moreover, as we have seen, infrapopulations are highly structured among individual mosquito hosts, the gene diversity within mosquitoes being significantly reduced compared to the species-wide diversity. Such features of the global parasite population structure among hosts is typical of a low mixing among parasite offspring, with a clumped transmission from intermediate to definitive hosts [66]. In such a population, the mosquito infrapopulations of parasites are the evolving units and represent the boundaries of the demes, the whole parasite population thus differing from the whole panmictic unit of evolution previously described in endemic areas [23].

For *P. falciparum*, such a hypothesis of possible gametocyte clustering in human blood capillaries has been proposed as an explanation of the observed aggregated distribution of *P. falciparum* gametocytes and oocysts among mosquito hosts. Sexual stages were shown by simulation modelling to align forming queues in the blood, thus being ingested as clusters

by the mosquito during its bloodmeal. Indeed, in the absence of any known chemotaxis mechanism to improve recognition between male and female gametocytes in the bloodmeal chamber of the mosquito midgut [1], this feature may have been selected by the parasite as a reproductive strategy for the parasite to increase the number of zygotes and thus enhance its reproductive success [68, 69]. Such a clumped transmission strategy of sexual stages would fit our observation of the presence of numerous genetically identical repeated oocysts in mosquito midguts. Moreover, the overall observation of significant mean F_{IS} values for three *Anopheles* species upon the four surveyed seems to indicate that such a mechanism occur with a higher probability between genetically identical or related male and female gametocytes, gametocytes from a same *P. falciparum* strain having a higher chance to be mature at the same time, and thus cluster together.

Our results thus argue in favour of an overall low mixing reproductive strategy for *P. falciparum* natural populations even in high endemicity areas such as Equatorial Africa, where human prevalence, multiple infections and EIR are among the highest in Africa, especially for the most endophilic and widespread species *A. gambiae* and *A. funestus*. The high levels of genetic diversity observed overall populations are maintained through genetic drift in the human host, along with the various selective forces acting on the parasite. In endemic areas, more than 80% of the human population is found infected with *P. falciparum*, often with multiple parasite strains [70]. The whole parasite population of such an endemic malaria focus, even under the low mixing model with clumped parasite transmission described, bears a sufficiently numerous parasite population to maintain the very high levels of diversity observed, even in the presence of significant self-fertilization events [71].

Observed patterns of global structure within and among mosquitoes and vector species within an equatorial African malaria transmission site were based on limited sample sizes, owing to the difficulty of obtaining large samples of infected vectors from each of the four *Anopheles* species. We replicated our sampling in time to check for the stability of observed patterns of heterozygote deficits partitioning among mosquitoes and vector species, and presence of repeated oocyst genotypes. Such patterns were consistent across the temporal dimension, in particular, *A. funestus* being found the most infected and with the highest levels of inbreeding for each sampling, and thus unlikely to be caused by sampling artefacts, despite relatively low numbers of infected mosquitoes.

We observed significant indications of genetic heterogeneity among temporal samples within the Simbock location. Temporal differentiation was already observed among temporally separated parasite samples from the human host using selected markers,

suggesting a rapid turnover of parasites within hosts, associated to sequestration mechanisms, immune response, and competition among strains. Given the small numbers of infected mosquitoes analysed in comparison to the potential effective size of the parasite in the vector host in the site, the temporal genetic heterogeneity we observed at the global level between parasites sampled from the vector host is more likely to be the reflect of stochastic factors, such as random sampling errors associated with small samples sizes or genetic drift, rather than due to any other factors, such as natural selection, migration, mutation, or a drug treatment effect. However, such factors are likely to occur in the time periods analysed, especially migration from villagers carrying back new infections after travels.

We found a significant differentiation between parasites from the vector *A. moucheti* and the rest of the parasite genotypes. This pattern was observed using the whole four species data sets across time, and was not consistent over time, due to stochastic sampling errors associated with small samples sizes for each year. More infrapopulations must be sampled to confirm or infirm such a tendency, but if we consider our hypothesis of *A. moucheti* as a species with a higher dispersal among households than *A. funestus* or *A. gambiae*, such a differentiation would be consistent with a different, more diversified parasite genotypic recruitment among *Anopheles* species.

Conclusions

Overall, *P. falciparum* infection parameters and genetic variability distribution differed among the four *Anopheles* species: while *A. gambiae* and especially *A. funestus* displayed high infection rates and low oocyst load, with significant heterozygote deficits and linkage disequilibrium, *A. moucheti*, and to a lower extent *A. nili* were more heavily infected (tendencies), but displayed higher allelic richness and lower inbreeding levels. We propose to interpret such pattern as a possible consequence of different parasite recruitment among hosts, linked to different pattern of blood feeding and human host-seeking among the four *Anopheles* vectors. For *A. gambiae* and *A. funestus*, the two most evolutionarily human-linked and endophagic species, feeding and re-feeding within the household, with rare exits outdoors, would enhance a local parasite recruitment within the household, and thus more inbreeding among parasites from these two species, while more exophagic habits for the two forest species *A. nili* and *A. moucheti* would favour a more diversified recruitment, and lower inbreeding levels. Overall, the *P. falciparum* parasite population display population structure features fitting with a low mixing population model.

Authors' contributions

ZA carried out the field work, the molecular genetic studies, the statistical analyses and drafted the manuscript. PD participated in the molecular genetic studies and in the statistical analyses. PAA and FS participated in the field work and the study coordination in Cameroon. CA participated in the molecular genetic studies. FR conceived of the study, participated in its design and coordination and in the statistical analysis. DF conceived of the study, participated in its design and coordination.

Acknowledgements

We thank Pierre Kengne for providing technical support on *Anopheles* species identification. We are grateful to the whole teams of the Laboratoire de Recherche sur le Paludisme of the Organisation de Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) for their kind help. This project was funded by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the VIHPAL program. AZ was supported by a student fellowship from François Lacoste and the Fondation de France and a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT n° 20051205940).

References

1. Sinden RE: **Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors.** *Cell Microbiol* 2002, **4**:713-724.
2. Bruce-Chwatt LJ: **Essential Malariology**, Medical Books Ltd ed. London: Hainemann W; 1980.
3. Hervy JF, Le Goff G, Geoffroy B, Hervé JP, Manga L, Bruhnes J: **Les Anophèles de la région afrotropicale.** CD-ROM, ORSTOM ed. Paris; 1998.
4. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J: **Biodiversité du paludisme dans le monde**, John Libbey Eurotext ed. Montrouge, France; 2004.
5. Antonio-Nkondjio C, Kerah CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D: **Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission.** *J Med Entomol* 2006, **43**:1215-1221.
6. Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, Konate L, Faye F, Rogier C, Trape JF: **High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **56**:247-253.
7. Boëte C: **Malaria-Refractoriness in Mosquito: Just a Matter of Harboring Genes ?** In: *Genetically Modified Mosquitoes for Malaria Control.* Edited by Boëte C. Georgetown: Eureka/Landes Bioscience; 2005.

8. Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT: **Population biology of multihost pathogens.** *Science* 2001, **292**:1109-1112.
9. Gandon S: **Evolution of multihost parasites.** *Evolution Int J Org Evolution* 2004, **58**:455-469.
10. Boëte C, Paul RE: **Can mosquitoes help to unravel the community structure of Plasmodium species?** *Trends Parasitol* 2006, **22**:21-25.
11. Lambrechts L, Halbert J, Durand P, Gouagna LC, Koella JC: **Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to Plasmodium falciparum.** *Malar J* 2005, **4**:3.
12. Luckhart S, Li K, Dunton R, Lewis EE, Crampton AL, Ryan JR, Rosenberg R: **Anopheles gambiae immune gene variants associated with natural Plasmodium infection.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **128**:83-86.
13. Conway DJ: **Molecular epidemiology of malaria.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**:188-204.
14. Coluzzi M: **Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control.** *Bulletin of the World Health Organization* 1984, **62 (Suppl)**:107-113.
15. Coluzzi M: **The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of Plasmodium falciparum.** *Parassitologia* 1999, **41**:277-283.
16. Gillies MT, De Meillon B: **The Anophelinae of Africa South of the Sahara**, vol. 54, 2nd ed. Johannesburg, South Africa; 1968.
17. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, Meunier JY, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, Wondji CS, Tchuinkam T, Fontenille D: **High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon.** *J Med Entomol* 2002, **39**:350-355.
18. Gillies MT, Coetzee M: **A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara**, vol. 55. Johannesburg, South-Africa; 1987.
19. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: **Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
20. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I, Louis C: **Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of Anopheles gambiae s.s.** *Insect Mol Biol* 2001, **10**:19-23.
21. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M: **A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the Anopheles funestus (Diptera: Culicidae) group.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:804-811.
22. Kengne P, Awono-Ambene P, Antonio-Nkondjio C, Simard F, Fontenille D: **Molecular identification of the Anopheles nili group of African malaria vectors.** *Med Vet Entomol* 2003, **17**:67-74.
23. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N *et al*: **Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Mol Biol Evol* 2000, **17(10)**:1467-1482.

24. Su X, Wellem's TE: **Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats.** *Genomics* 1996, **33**(3):430-444.
25. Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeus T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F: **"Clonal" population structure of the malaria agent Plasmodium falciparum in high-infection regions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(48):17388-17393.
26. Rozsa L, Reiczigel J, Majoros G: **Quantifying parasites in samples of hosts.** *J Parasitol* 2000, **86**(2):228-232.
27. Nei M: **Molecular Evolutionary Genetics.** New York, USA: Columbia University Press; 1987.
28. Team RDC: **R: A language and environment for statistical computing.** In., 2.2.1 edn. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2005.
29. Sokal RR, Rohlf RJ: **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research,** 3rd edn. New York, USA: Freeman, W.H. and Co; 1995.
30. Goudet J: **FSTAT vers1.2, a computer program to calculate F-statistics.** *J Heredity* 1995, **8**:485-486.
31. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW: **Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited.** *J Parasitol* 1997, **83**(4):575-583.
32. Yang RC: **Estimating hierarchical F-statistics.** *Evolution* 1998, **52**:950-956.
33. Goudet J: **Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics.** *Molecular Ecology Notes* 2005, **5**:184-186.
34. Ter Braak CJF: **Canonical correspondance analysis : a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis.** *Ecology* 1986, **67**:1167- 1179.
35. Ter Braak C: **CANOCO – Fortran program for canonical community ordination.** NY: Microcomputer Power; 1987.
36. Poulin R: **The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation.** *Int J Parasitol* 1993, **23**(7):937-944.
37. Reiczigel J, Lang Z, Rozsa L, Tothmeresz B: **Properties of crowding indices and statistical tools to analyze parasite crowding data.** *J Parasitol* 2005, **91**(2):245-252.
38. Medley GF, Sinden RE, Fleck S, Billingsley PF, Tirawanchai N, Rodriguez MH: **Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector.** *Parasitology* 1993, **106**:441-449.
39. Pichon G, Robert V, Tchuinkam T, Mulder M, Verhave JP: **Analyse quantitative de la distribution des oocystes de Plasmodium falciparum chez Anopheles gambiae.** *Parasite* 1996, **3**:165-167.
40. Crofton HD: **A model of host-parasite relationships.** *Parasitology* 1971, **63**(3):343-364.
41. Weir BS, Cockerham CC: **Estimating F-statistics for the analysis of population structure.** *Evolution* 1984, **38**:1358-1370.
42. Anderson TJ, Paul RE, Donnelly CA, Day KP: **Do malaria parasites mate non-randomly in the mosquito midgut?** *Genet Res* 2000, **75**(3):285-296.
43. Carnevale P, Le Goff G, Toto JC, Robert V: **Anopheles nili as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon.** *Med Vet Entomol* 1992, **6**(2):135-138.

44. Antonio-Nkondjio C, Ndo C, Awono-Ambene P, Ngassam P, Fontenille D, Simard F: **Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in south Cameroon forest region.** *Acta Trop* 2007, **101**(1):61-68.
45. Michel AP, Ingrassi MJ, Schemerhorn BJ, Kern M, Le Goff G, Coetzee M, Elissa N, Fontenille D, Vulule J, Lehmann T *et al*: **Rangewide population genetic structure of the African malaria vector *Anopheles funestus*.** *Mol Ecol* 2005, **14**(14):4235-4248.
46. Pearce-Duvet JM: **The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease.** *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006, **81**(3):369-382.
47. Hartl DL: **The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**(1):15-22.
48. Ayala FJ, Coluzzi M: **Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102** Suppl 1:6535-6542.
49. Beier JC, Killeen GF, Githure JI: **Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**(1):109-113.
50. Poulin R: **Variation in infection parameters among populations within parasite species: intrinsic properties versus local factors.** *Int J Parasitol* 2006, **36**(8):877-885.
51. Lambrechts L, Chavatte JM, Snounou G, Koella JC: **Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites.** *Proc Biol Sci* 2006, **273**(1593):1501-1506.
52. Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC: **Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes.** *PLoS Biol* 2005, **3**(9):e298.
53. Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouart L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M, Molez JF: **Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera:Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal.** *J Med Entomol* 1997, **34**(4):396-403.
54. Klowden MJ, Briegel H: **Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 1994, **31**(4):618-622.
55. Lyimo EO, Koella JC: **Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s.l. and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Parasitology* 1992, **104**:233-237.
56. Straif SC, Beier JC: **Effects of sugar availability on the blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae).** *J Med Entomol* 1996, **33**(4):608-612.
57. Vaughan JA: **Population dynamics of *Plasmodium sporogony*.** *Trends Parasitol* 2007, **23**(2):63-70.
58. Paul RE, Packer MJ, Walmsley M, Lagog M, Ranford-Cartwright LC, Paru R, Day KP: **Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea.** *Science* 1995, **269**(5231):1709-1711.
59. Arez AP, Pinto J, Palsson K, Snounou G, Jaenson TG, do Rosario VE: **Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**(2):161-168.

60. Huber W, Haji H, Charlwood JD, Certa U, Walliker D, Tanner M: **Genetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the transmission from the host to the vector.** *Parasitology* 1998, **116**:95-101.
61. Balloux F: **Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size.** *Evolution Int J Org Evolution* 2004, **58**(9):1891-1900.
62. Prugnolle F, Liu H, de Meeus T, Balloux F: **Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes.** *Int J Parasitol* 2005, **35**:255-263.
63. Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P: **Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts.** *Parasitology* 2004, **129**:571-585.
64. Pannell JR, Charlesworth B: **Neutral genetic diversity in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization.** *Evolution* 1999, **53**:664-676.
65. Price PW: **General concepts on the evolutionary biology of parasites.** *Evolution* 1977, **31**:405-420.
66. Criscione CD, Blouin MS: **Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation.** *Evolution Int J Org Evolution* 2006, **60**(3):553-562.
67. Criscione CD, Poulin R, Blouin MS: **Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes.** *Mol Ecol* 2005, **14**(8):2247-2257.
68. Gaillard FO, Boudin C, Chau NP, Robert V, Pichon G: **Togetherness among *Plasmodium falciparum* gametocytes: interpretation through simulation and consequences for malaria transmission.** *Parasitology* 2003, **127**:427-435.
69. Pichon G, Awono-Ambene HP, Robert V: **High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host.** *Parasitology* 2000, **121**:115-120.
70. Quakyi IA, Leke RG, Befidi-Mengue R, Tsafack M, Bomba-Nkolo D, Manga L, Tchinda V, Njeungue E, Kouontchou S, Fogako J *et al*: **The epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria in two Cameroonian villages: Simbok and Etoa.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **63**(5-6):222-230.
71. Barry AE, Leliwa-Sytek A, Tavul L, Imrie H, Migot-Nabias F, Brown SM, McVean GA, Day KP: **Population Genomics of the Immune Evasion (var) Genes of *Plasmodium falciparum*.** *PLoS Pathog* 2007, **3**(3):e34.

Table 1 - *P. falciparum* infection in the four *Anopheles* vectors of Simbock for each sampling and overall.

Total number of *Plasmodium* spp. oocysts was counted from each mosquito guts containing *P. falciparum* positive oocysts as assessed by the microsatellite genotyping. Oocysts which did not successfully amplify were removed from the counts as belonging to another *Plasmodium* species. Oocyst prevalence and mean oocyst intensity 95% confidence intervals (CI) were computed using methods implemented in the Quantitative Parasitology 3.0 freeware.

	<i>Anopheles gambiae s.s.</i>						<i>Anopheles funestus</i>					
	Mosquito host sample			<i>P.falciparum</i> oocysts within mosquitoes			Mosquito host sample			<i>P.falciparum</i> oocysts within mosquitoes		
Population	Total	Infected	% Infected (CI)	Total number (range)	Intensity (CI)	Var/mean ratio	Total	Infected	% Infected (CI)	Total number (range)	Intensity (CI)	Var/mean ratio
Simbock 2002	844	13	1.5 (0.9-2.6)	89 (1-33)	6.8 (3.5-13.9)	18.17	127	2	1.6 (0.3-5.7)	13 (2-11)	6.5 (2.0-6.5)	9.59
Simbock 2003	387	9	2.3 (1.2-4.3)	73 (1-19)	8.1 (4.1-12.2)	12.71	340	16	4.7 (2.9-7.6)	65 (1-9)	4.1 (2.7-5.4)	5.75
Simbock 2004	956	11	1.2 (0.6-2.1)	68 (1-25)	6.2 (2.4-12.5)	16.15	267	8	3.0 (1.4-5.7)	21 (1-5)	2.6 (1.7-3.5)	3.22
Across years	2187	33	1.5 (1.1-2.1)	230 (1-33)	7.0 (4.6-10.3)	15.84	734	26	3.5 (2.4-5.1)	99 (1-11)	3.8 (2.8-5.0)	5.72
	<i>Anopheles nili</i>						<i>Anopheles moucheti</i>					
	Mosquito host sample			<i>P.falciparum</i> oocysts within mosquitoes			Mosquito host sample			<i>P. falciparum</i> oocysts within mosquitoes		
Population	Total	Infected	% Infected (CI)	Total number (range)	Intensity (CI)	Var/mean ratio	Total	Infected	% Infected (CI)	Total number (range)	Intensity (CI)	Var/mean ratio
Simbock 2002	445	4	0.9 (0.3-2.3)	29 (1-23)	7.2 (1.5-18.0)	18.70	324	5	1.5 (0.6-3.6)	28 (1-15)	5.6 (2.4-12.2)	9.94
Simbock 2003	593	5	0.8 (0.3-2.0)	26 (2-10)	5.2 (2.8-8.0)	6.81	278	6	2.2 (0.9-4.6)	27 (1-10)	4.5 (2.5-7.0)	6.33
Simbock 2004	1852	10	0.5 (0.3-1.0)	77 (1-28)	7.7 (2.7-15.7)	20.74	435	1	0.2 (0.0-1.3)	3 (-)	3.0 (NS)	3.00
Across years	2890	19	0.7 (0.4-1.0)	132 (1-28)	6.9 (4.0-11.8)	17.54	1037	12	1.2 (0.6-2.0)	58 (1-15)	4.8 (3.1-7.7)	7.92

Figure Legends

Figure 1 - Distribution of the four *Anopheles* vectors densities in time and space in Simbock, South Cameroon.

(A) Relative densities of each vector species for each sampling in Simbock, South Cameroon; (B) Relative proportions of indoor and outdoor human biting rates (numbers of mosquito bites/human/night) for each species in each collected households in 2004 in Simbock, South Cameroon.

Figure 2 - *P. falciparum* neutral variability distribution overall, and within and among *Anopheles* species, and influence of repeated oocyst genotypes.

Main population genetics parameters for *Plasmodium falciparum* oocyst populations (H_E) and infrapopulations (F_{ST} , F_{IS}) collected from each *Anopheles* species in Simbock (Cameroon). (A) H_E was computed on the whole pool of oocyst genotypes, including (H_E w) and removing (H_E wo) repeated oocyst genotypes; Jackknife estimates of F_{ST} and F_{IS} were computed over oocyst infrapopulations across species and samplings for each locus and overall as implemented in FSTAT v 2.9.4., including (w) or excluding (wo) repeated oocyst genotypes within mosquito guts; (B) H_E was computed on the pool of oocyst genotypes for each *Anopheles* species across samplings and overall locus, including (H_E w) and removing (H_E wo) repeated oocyst genotypes; Jackknife estimates of F_{ST} and F_{IS} were computed over oocyst infrapopulations for each *Anopheles* species across samplings and overall locus, including (w) or excluding (wo) repeated oocyst genotypes within mosquito guts. 95% confidence interval for F_{IS} and F_{ST} value were calculated by bootstrapping over loci (10,000 replications) as implemented in FSTAT v 2.9.4. (C) Mean Allelic Richness (\pm SEM) of *P. falciparum* oocyst infrapopulations from the four vector species for each year in Simbock.

Figure 3 - Heterozygote deficits in *P. falciparum* oocysts from individual mosquitoes.

The parameter F_{IS} measures the deficit of heterozygous genotypes as a result of non-random union of gametocytes within individual mosquito guts. Within mosquito heterozygote deficits F_{IS} were computed for each *P. falciparum* infrapopulation containing ≥ 4 oocysts using FSTAT v. 2.9.4.

Figure 4 - Graphical representation of the results of the canonical correspondence analysis (CCA)

Relative contribution of the individual variable “*Anopheles* species” on the genetic structure of *P. falciparum* populations infecting the four *Anopheles* species in Simbock across sampling years. Oocysts populations were projected on the first two axes of the canonical analyses. Centroids (i.e. dots) of each parasite population are surrounded by the 95% confidence interval (i.e. ellipses) of their position.

Figure 1

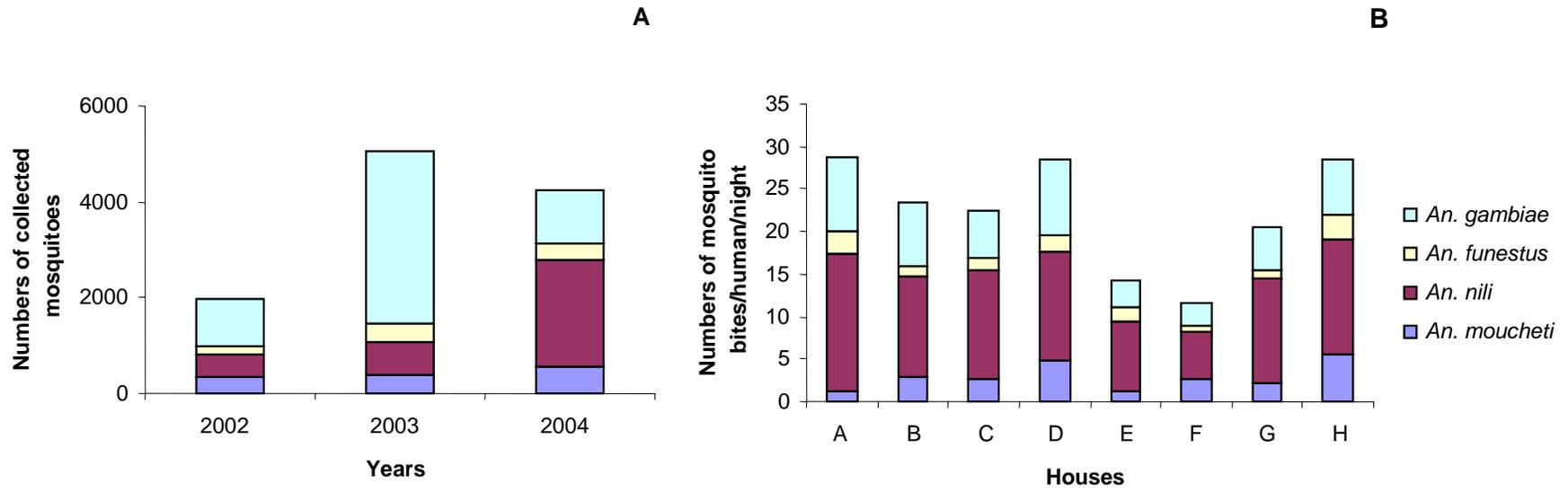


Figure 2

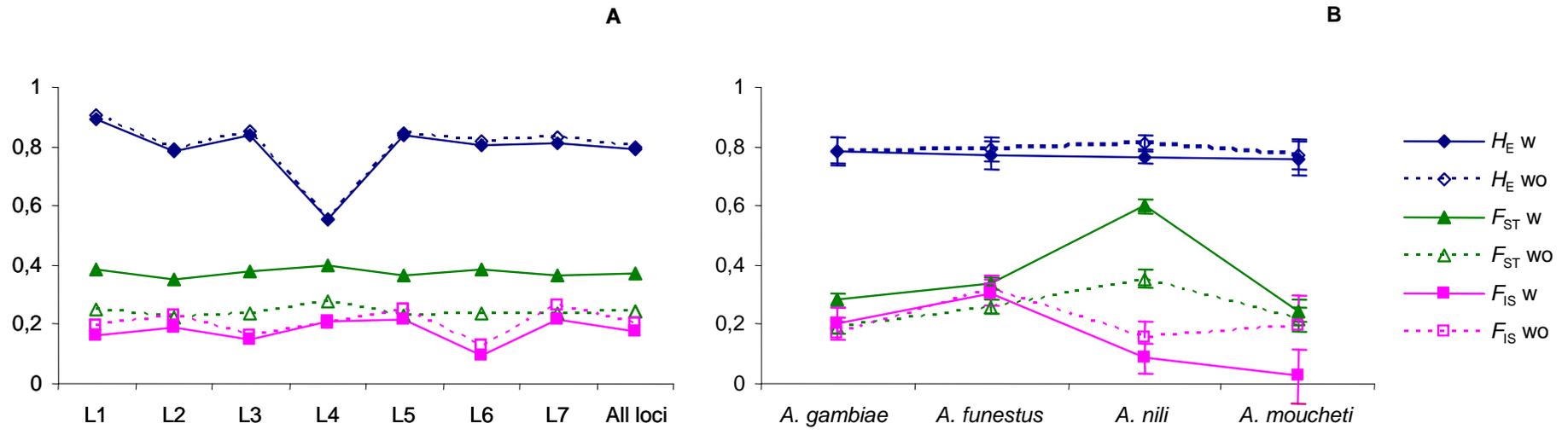


Figure 3

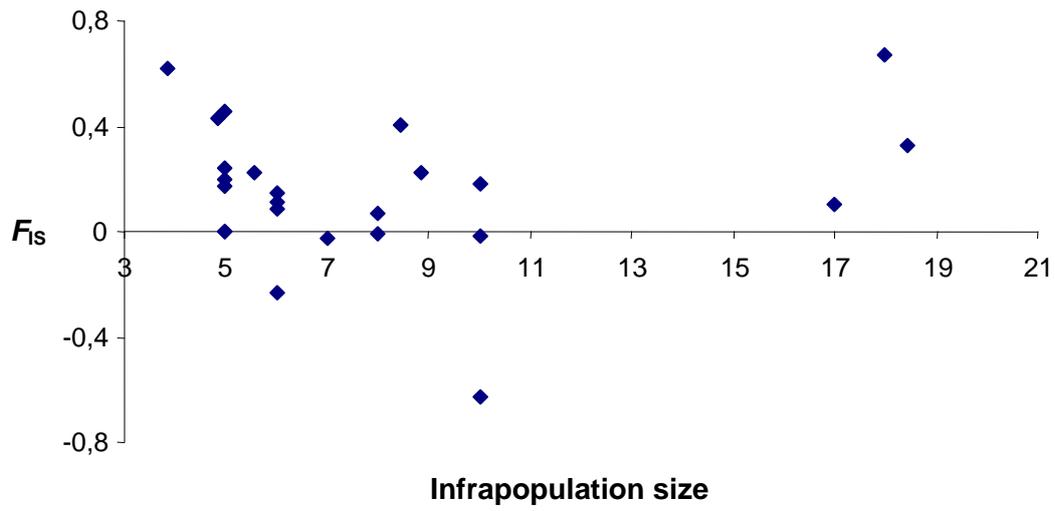
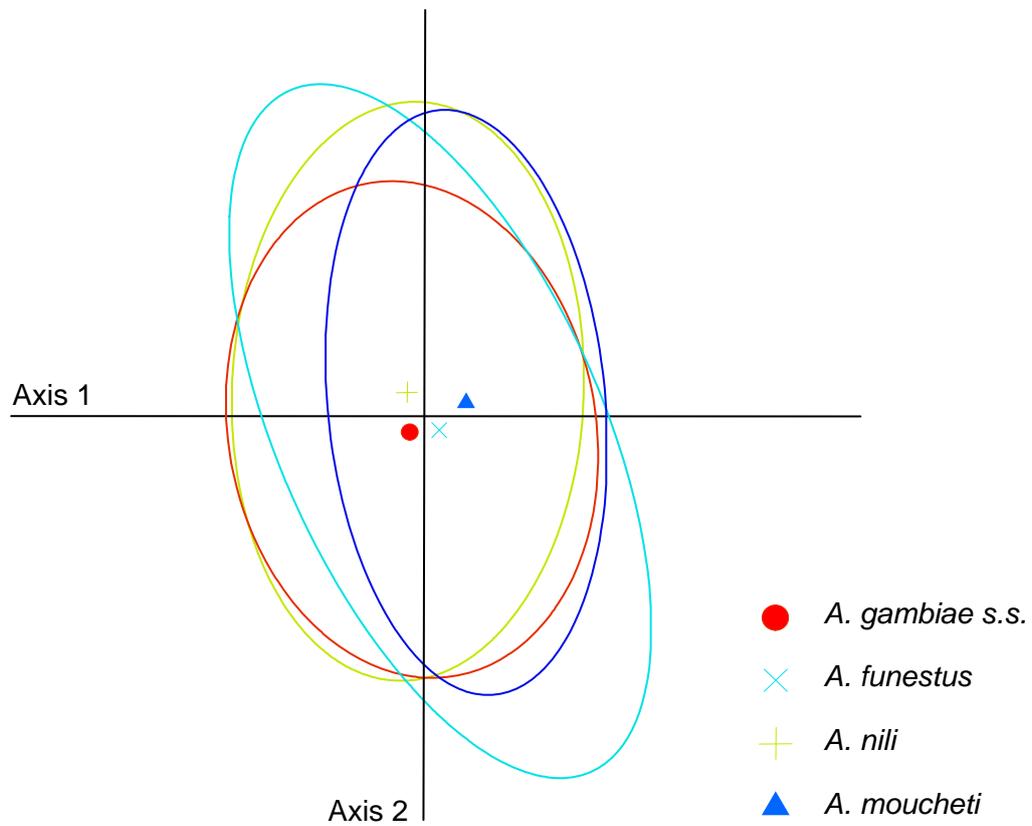


Figure 4



2 Comparaison de la structure génétique de *P. falciparum* chez l'homme et le vecteur au Cameroun

Article 3. Annan Z., Durand P., Awono-Ambene P., Simard F., Arnathau C., Renaud F. & Fontenille D. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* in its human and *Anopheles* vector hosts in Cameroon, Central Africa. Article en préparation.

Pour ce troisième axe de résultats, l'analyse des données obtenues à partir des stades oocystes a été complétée par l'analyse des données obtenues à partir des isolats sanguins dans les deux villages du Cameroun étudiés dans l'Article 1. Nous avons ainsi pu comparer les deux approches utilisées jusqu'à présent pour l'étude de la structure des populations de *P. falciparum*, et établir le lien avec la méthodologie qui a été la plus utilisée jusque là, i.e. l'analyse génétique des isolats sanguins.

La méthodologie du génotypage était la même que celle que nous avons utilisé pour les stades oocystes (7 locus microsatellites étudiés). Plusieurs méthodes inspirées de la littérature ont été mises en œuvre pour la reconstruction des haplotypes multilocus à partir des données alléliques pour les échantillons sanguins porteurs d'infections multiples: (i) soit ce type d'infection était éliminé de l'analyse, et les mono-infections seules étaient conservées ; (ii) soit les haplotypes étaient reconstruits à partir des infections multiples mais pour un locus unique (Bogreau et al. 2006) ou pour plusieurs locus (nombre allèles ≤ 2 ; Leclerc et al. 2002).

Nous avons appliqué pour l'analyse des données obtenues le même protocole et les mêmes méthodes d'analyse que celles qui ont été mises en œuvre sur les stades oocystes dans les Articles 1 et 2. Nous avons mis en évidence une diminution de la multiplicité de l'infection parasitaire à *P. falciparum* avec l'âge dans les deux sites de transmission, malgré les différences du profil de la transmission entre les deux sites. D'autre part, la faiblesse des effectifs en haplotypes multilocus reconstruits de façon fiables limite la portée des conclusions obtenues à partir des stades sanguins comparé à ce qui est obtenu avec les stades oocystes.

Le lien qui a été établi ici avec les données issues de l'infection chez l'homme a été très intéressant pour nous dans l'élaboration de la réflexion sur la structuration des populations de *P. falciparum* : il nous a permis de prendre conscience de l'importance des conditions de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme et du rôle essentiel des facteurs humains pour la transmission de ce parasite vers le vecteur, et donc pour la structuration des populations de ce parasite dans ses deux hôtes en fonction des contextes de la transmission.

Article 3 :

Article en préparation

**GENETIC STRUCTURE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN ITS
HUMAN AND *ANOPHELES* VECTOR HOSTS IN CAMEROON,
CENTRAL AFRICA**

ZEINAB ANNAN, PATRICK DURAND, PARFAIT AWONO-AMBENE, FREDERIC
SIMARD, CELINE ARNATHAU, FRANÇOIS RENAUD & DIDIER FONTENILLE

LRH: ANNAN AND OTHERS

RRH: *P. FALCIPARUM* GENETIC STRUCTURE IN ITS TWO HOSTS IN AFRICA

**GENETIC STRUCTURE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN HUMAN
AND *ANOPHELES* VECTOR HOSTS IN CAMEROON, CENTRAL
AFRICA**

ZEINAB ANNAN^{§, 1, 2}, PATRICK DURAND², PARFAIT AWONO-AMBENE³,
FREDERIC SIMARD³, CELINE ARNATHAU², FRANÇOIS RENAUD², DIDIER
FONTENILLE¹

¹*Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, UR016, Institut de Recherche pour le Développement, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France*

²*Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche 2724, Centre National de la Recherche Scientifique/Institut de Recherche pour le Développement, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France*

³*Laboratoire IRD de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, BP 288, Yaoundé, Cameroun*

[§]Corresponding author

Email address: zei_annan@hotmail.com

ABSTRACT

We investigated patterns of *Plasmodium falciparum* population structure in its human and *Anopheles* vector hosts in two highly endemic areas of Cameroon, Central Africa. Finger-prick blood samples and oocyst-infected *Anopheles* females were sampled in the villages of Simbock, South-Cameroon, and Tibati, 350 km north. *P. falciparum* human prevalences were high (> 79%), while age and multiplicity of infection negatively correlated in both sites. Oocyst prevalence was 3.1% in Simbock and 0.9% in Tibati ($P < 10^{-3}$). Twenty-one mono-infected blood isolates and 306 oocysts were genotyped for 7 *P. falciparum* microsatellite loci. Number of alleles per locus (6--27) and mean H_E (0.7--0.8) were homogeneous among hosts and sites. Linkage disequilibrium (LD) contrasted between parasites from the two hosts: consistent with previous results, it was significant in vectors from both sites, while small data sets prevented a significant analysis from blood parasites. Spatial differentiation estimated either from mono-infected isolates (FSTAT) or from the mosquito data set (HIERFSTAT) was not significant.

INTRODUCTION

Severe malaria is an acute febrile disease caused by *Plasmodium falciparum* mostly in sub-Saharan African countries. More than 500 million cases and about 1.5 million deaths are reported annually on the continent¹. In areas of high malaria endemicity, patterns of *P. falciparum* malaria infection are related to the host immune status, severe malaria occurring mainly in children under five years of age and pregnant women.

In these areas, molecular epidemiology studies of *P. falciparum* infection in the human host have revealed that most infected subjects carry several distinct parasite genotypes at the same time. The multiplicity of *P. falciparum* infection (MOI), defined as the minimum number of parasite genotypes carried by an infected individual, is a crucial parameter of *P. falciparum* epidemiology and biology. The average number of co-infecting genotypes in a population of hosts was shown to have a significant impact on the degree of parasite inbreeding within the mosquito host, and thus on the parasite population structure. Indeed, it determines the number of distinct genotypes the mosquito can probe during its bloodmeal, and thus the probability for two genetically distinct parasite genotypes to outcross in the mosquito host^{2,3}.

Variation in the human *P. falciparum* MOI was shown to be determined by several factors including the intensity of malaria transmission, i.e. infectious biting frequency^{4,5,6}, human-related factors such as host age or immune status, external factors (e.g. drug treatment)

^{7, 8}, or parasite-related factors such as potential within-host competition between genetically distinct conspecific parasite genotypes infecting the same host ⁹. These factors influence both the number of co-infecting parasite genotypes in the human host and their transmissibility to the mosquito definitive host.¹⁰

The question of natural *P. falciparum* population structure in the field was addressed using distinct approaches: studies were lead on parasite blood samples ^{11, 12, 13, 14} in areas of both high and low malaria endemicity, and to a much lesser extent on mosquito stages ^{15, 16} and parasite sex ratios ^{17, 18, 19}. The massive work was carried out on peripheral or venous blood isolates, more easily sampled and managed than oocyst mosquito stages or peripheral gametocytes sex ratios measurement. Contrasted conclusions were drawn either from blood stages genotyping in high malaria transmission settings, or from sex-ratio studies ^{20, 3}. As was already pointed out by Paul *et al.*^{22, 23}, the controversy was due to the high prevalence of multiple *P. falciparum* infections in these areas, which prevented the reconstruction of complete multilocus parasite haplotypes from allelic data and hence the gathering of statistically significant data sets. Alternative analysis methods were designed by several authors to circumvent the issue, but they were based on an arbitrary choice among PCR amplification products and hence little satisfactory. These studies mostly used the two selected antigen coding-loci *MSP-1* and *2* and microsatellite markers to address the issue of the parasite population structure in areas of different transmission intensity, but included parasites sampled from one of its two hosts only.^{11, 26, 13, 27, 14} A few studies included both hosts to investigate the parasite transmissibility from the human host to the vector at the local level in African natural parasite populations ^{28, 29}, but using a few selected markers and a global oocyst sampling scheme, preventing to compare the parasite population structure in the human and vector hosts at the individual and local levels.

The general consensus drawn from these studies pointed towards a crucial impact of malaria transmission intensity and subsequent high MOI in the human host on the extent of *P. falciparum* inbreeding ^{12, 11, 13, 14}. Anderson *et al.*¹¹ observed a mixed population structure for *P. falciparum* from 465 worldwide blood isolates: regions of high transmission intensity displayed low linkage disequilibrium (LD) between markers and high genetic diversity, while the reverse was true for low endemic areas. By contrast, some other studies displayed significant levels of LD in areas of high transmission intensity.

The question was thus raised of the link to be drawn between malaria transmission intensity, the MOI of *P. falciparum* in the human host and the extent of inbreeding in natural parasite populations. Studies lead on individual oocyst neutral genotyping within mosquitoes, much more difficult to access than blood isolates, can shed a new light on the parasite

population structure in areas of high transmission intensity: a significant part of the parasite gametocytes do self-fertilize in the mosquito gut, even in those areas where the parasite population structure was previously thought as panmictic from blood stages analyses.^{16,21}

We addressed here the issue of the *P. falciparum* neutral genetic variability distribution in its human and vector hosts in natural populations of two high transmission areas of Central Africa. We sampled the parasite natural populations simultaneously in both its human and vector hosts at the household level of two villages of south (equatorial forest) and north (savanna-forest transition)-Cameroon, Central Africa. Peripheral blood isolates and individually sampled oocysts were genetically characterized using a set of seven microsatellite markers to assess parameters of *P. falciparum* infection. Results have important consequences on the design of sampling scheme for further large-scale study of the parasite. Describing and understanding patterns of infection multiplicity in both the human and the mosquito hosts at the local level in highly endemic areas and how it is related to the parasite population structure in both hosts is critical to evaluate clinical, epidemiological and evolutionary outcomes of the disease²⁴. Among these, issues such as the understanding of the spread of parasite resistance to drugs among natural *P. falciparum* populations in high transmission areas and the effect of vaccine implementation in the field²⁵ utterly need a clarification of the relationship between transmission intensity, multiplicity of infection and parasite population structure in natural populations of both human and vector hosts.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and *P. falciparum* isolates. The study was undertaken in two villages of south and north-Cameroon, Simbock and Tibati. Inhabitants were recruited as part of a survey including the study of the parasite populations in both vector and human hosts. Investigations were approved by the Cameroon Ministry of Public Health and by the National Ethics Committee of Cameroon. Consent was given also by the local village chief, each person being informed of the nature and aims of the study and told that participation was voluntary. Informed consent was also obtained from the parents or legal guardians of minors.

The village of Simbock (3°50'N, 11°30'E) comprises around 300 inhabitants and is situated in the close suburb of Yaoundé, capital city of Cameroon, in a degraded equatorial forest environment. Climate is characterized by two rainy seasons (March-June and September-November). The four major African anophelian vectors *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. nili* and *A. moucheti* are present in sympatry all over the year and are responsible for a malaria transmission of around one infected bite per human per night in the village (around 300 infected bites/human/year).³⁰ Malaria is hyperendemic in Simbock with about

65% of children aged 5-9 years *P. falciparum* infected.³¹ Cross-sectional samplings were carried out in March 2003 at the end of the little dry season following the big rainy season. Finger-prick blood samples were collected from all inhabitants presenting themselves to the appointment 5 days after the beginning of mosquito collections. A total of 80 inhabitants from 13 households were sampled in 2003 (31 males and 49 females). A proportion of 52% of the population sampled was < 16 years old, age varying between 3 months and 87 years. Mosquitoes were collected during 9 consecutive nights in 10 households from the same quarter of the village, distant from each other by no more than one kilometer and chosen among the blood-sampled houses.

The village of Tibati is situated 320 km north of Simbock, on the Adamaoua plateau in the forest-savanna transition area. The sudano-guinean climate of the region is characterized by a unique rainy season (June-October) and a dry season (November-March). Malaria transmission in the village is nevertheless perennial, owing to the abundance of lakes and rivers surrounding the area. These water pools provide perennial breeding sites for *A. funestus*, main vector of the area, but *A. gambiae*, *A. nili* and *A. pharoensis* also transmit the *P. falciparum* parasite. The total entomological inoculation rate (*EIR*) is around 200 infected bites/human/year all year round. Blood-smears and finger-prick blood samples were collected in September 2003 at the end of the rainy season 5 days after the beginning of mosquito collections. A total of 108 inhabitants from 11 households distributed in different quarters situated at variable distances from anopheline breeding pools were sampled. About 66% of the population was <16 years old, age varying between 4 months and 75 years. Households in this region are organized as “concessions”, each concession can contain one or more houses being the residence of the whole family. Mosquitoes were collected during 11 consecutive nights in 8 households of the village belonging to families included in the blood sampling.

In both villages for each sampling, axillary temperature was systematically taken and Giemsa-stained thick blood films were microscopically examined for detection of *Plasmodium*. Patients with temperature superior to 37,5°C and microscopically detected *Plasmodium* species were treated with standard orally administered doses of sulfadoxine-pyrimethamine (*Fansidar*) and paracetamol. Infants with same symptoms were administered arthemether-lumefantrin or sent to adequate medical structure. *IsoCode Stix*® finger-pricks (Scleicher & Schuell, Keene N.H. 03431 USA) were dried in oven at 80°C and kept with dessicant for microsatellite genotyping.

Anophelines were captured both indoor and outdoor by landing catches from 08:00 pm to 06:00 am. Specimens from the *Anopheles* genus were identified to species according to morphological identification keys³² and their midguts dissected the morning of their

collection in a physiological saline solution. Midguts were checked for the presence of oocysts under a compound microscope. Oocyst-infected stomachs were stored in separate 1.5 ml microtubes containing 80% ethanol along with the remainder of the mosquito. Samples were brought to Montpellier laboratory and stored at +4°C.

Molecular markers and genotyping. Blood and mosquito parasite stages were genotyped using seven microsatellite loci chosen among the 12 loci used by Anderson *et al.* (1999, 2000)^{33, 11} from loci initially described by Su & Wellems.³⁴ The seven markers spanned five different chromosomes: chr.4, 13, 11, 12, 6 and were used on *P. falciparum* blood samples by Durand *et al.*¹³ and on oocysts by Razakandrainibe *et al.*¹⁶ Blood stages DNA was extracted from a single IsoCode Stix® filter triangle following the procedure indicated by the manufacturer's recommendations (Schleicher & Schuell, Keene N.H. 03431 USA) and eluted in 100 µl of distilled water.

Oocysts were individually dissected from each stomach after gradual rehydration of the specimens into distilled water using a statif Leica (Deerfield, IL) inverted DMIRB microscope and mounted minuten pins. Individual oocysts were teased from the basal lamina of the midgut epithelium and transferred to individual 0.5 ml tubes containing 10 µl of distilled water using a flame-narrowed Pasteur pipette. Tips and dissecting tools were washed in Javel water and 70% ethanol and changed regularly to avoid contamination. Parasite DNA from each oocyst was extracted using the DNEasy Tissue Kit of Qiagen (Valencia, CA). We used a two-step hemi-nested strategy with fluorescent second-round end-labeled primers for microsatellite amplification as described in Razakandrainibe *et al.*¹⁶, following protocols developed by Anderson *et al.*¹¹ The microsatellite PCR products were sized relatively to an internal size standard and resolved using GENESCAN software version 3.1 on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Multiplicity of infections. Molecular analysis of blood isolates have shown that *P. falciparum*-infected blood samples may be multi-infected, i.e. contain more than one parasite haplotype. Multi-infection was assessed in a given isolate by the presence of ≥ 2 microsatellite alleles at any of the seven microsatellite locus surveyed. The multiplicity of infection for each isolate, i.e. the number of genetically distinct parasite haplotypes in each isolate, was analyzed locus by locus and was estimated for each isolate from the locus exhibiting the highest number of alleles. The mean multiplicity of infection across isolates was thus expressed for each locus as the mean number of distinct alleles for each genetic marker (excluding the monoclonal isolates) and calculated across locus for the sample from

the average multiplicity of each isolate in the sample. Proportions of multiple infections in a sample were assessed for each locus and across locus in a sample.

Mean genotypic multiplicity of mosquito oocysts was computed for each locus as the mean number of distinct oocyst genotypes per mosquito gut and overall locus from the mean number of distinct oocyst multilocus genotypes. Similarly, genotypic diversity was computed as the ratio between the number of distinct parasite genotypes to the total number of oocyst genotypes within a mosquito gut.

Correlations between age factor and multiplicity of blood infections were examined using Spearman rank-order correlation coefficient. To test the differences in the mean number of alleles per locus and mean multiplicity among age classes and villages, the Kruskal-Wallis one way analysis of variance and Wilcoxon two-sample test by ranks were used. The Quantitative Parasitology 3.0. software was used to compute prevalence and proportions of multiple infections 95% confidence interval using Sterne's exact method,³⁵ and to test differences between prevalence using Fischer exact test.

Genetic diversity and population structure

Multiplicity and blood infection haplotypes. In the case of multiple infections of blood samples, as more than one allele are present at a locus, it is impossible to match alleles of distinct locus to reconstruct a genotype. Analyses of population structure must thus be conducted on mono-infected isolates only, i.e. isolates containing only one allele for each of the seven locus surveyed. However, in areas of high endemicity, the great majority of individuals is found multi-infected (see Table 3) and mono-infections are scarce. In order to increase the mono-infected data set to statistically significant numbers in areas of high endemicity, several methods for reconstructing parasite haplotypes from multi-infected isolates were proposed by different authors. Anderson *et al.*¹¹ derived a method to reconstruct genotypes by matching together alleles on the basis of their peak heights as assessed by GENESCAN genotyping profiles. They applied the method to all their blood isolates whatever their multiplicity of infection, but the method is little satisfying when applied to heavily multi-infected isolates, as PCR amplification was shown to be a random process hardly correlated with template densities. It nevertheless enabled the authors to describe human *P. falciparum* population structure in different transmission contexts worldwide. Following Leclerc *et al.*²⁶, we thus applied this method but only to those isolates containing a maximum of 2 alleles at more than one locus, matching together highest peak-alleles from different locus to reconstruct the dominant genotype. Added to this, Bogreau *et al.*¹⁴ proposed to take into account isolates exhibiting a unique allele for all locus surveyed except one. From such isolates, haplotypes were derived by matching each allele of the variable locus to the

monoclonal invariable set of alleles from the rest of the locus surveyed. Such reconstructed haplotypes were added to the genetic analyses of population structure and increased the sample size. Analyses were thus conducted both on mono-infected isolates and reconstructed haplotypes. Population differentiation was assessed on both data sets separately.

Population structure analyses. Allelic polymorphism of blood isolates was computed from the whole sample of blood infections whereas genetic diversity was measured from the mono-infected and reconstructed data sets allele frequencies and assessed by Nei's unbiased estimate of heterozygosity under panmictic expectations corrected for the sampling bias (H_E) from haploid data using FSTAT version 2.9.4.³⁶ The whole oocyst pool of each site was used for these two measures. Comparisons between populations were performed using non-parametric tests on two or more samples (Wilcoxon signed-rank test and Kruskal-Wallis tests) using the R software. Wright's F_{ST} statistic for population differentiation was estimated using Weir & Cockerham³⁷ method, using the FSTAT version 2.9.4. software for blood and mosquito samples. FSTAT uses the G-statistic³⁶, independent of the process generating population differentiation and best adapted for our microsatellite locus following both SMM and IAM mutation models (see Anderson *et al.*³³). A permutation test is applied (n=15000) permuting alleles among samples for all loci to test whether F_{ST} significantly differ from zero. F_{ST} was also estimated for the mosquito sample using HIERFSTAT version 0.04-4³⁸, a package for the statistical software R which computes F -statistics from any number of hierarchical levels, thus enabling to take into account the highly significant effect of the mosquito level on the parasite population structure to estimate differentiation between sites.

Linkage disequilibrium. As a further indicator of population structure, genotypic linkage disequilibrium values between all pairs of polymorphic loci were measured within each population using FSTAT version 2.9.4. The correlation coefficient R was estimated to describe associations between all pairs of locus and its statistical significance was tested with a randomization test using the log-likelihood G test statistic. The sequential Bonferroni procedure was applied to the P -values to correct for multiple tests as implemented in FSTAT software.

RESULTS

***P. falciparum* allelic polymorphism in the human and vector hosts.** The seven microsatellite locus analysed were previously used by Anderson *et al.*¹¹, Leclerc *et al.*²⁶, Durand *et al.*¹³, Abdel-Muhsin *et al.*²⁷ and Bogreau *et al.*¹⁴ allowing our results to be compared between studies. Numbers of alleles per locus counted from the whole sample of

infected blood isolates in each site ranged from 6 for locus *Pfg377* to 27 for locus *POLYα* (Table 1), and it ranged from 6 to 16 for the two same loci when counted from the two vector oocyst samples. Total allelic polymorphism of *P. falciparum* parasites sampled either in the human or the mosquito hosts did not differ spatially between sites (Wilcoxon rank-sum test, $P>0.5$ between human parasites as well as between mosquito parasites), nor did allelic polymorphism differed between parasites from the two hosts within each site (Wilcoxon rank-sum test, $P>0.2$ in Simbock and Tibati).

***P. falciparum* infection in the human host.**

Prevalence, proportions of multiple infections and mean multiplicity of infection. A total of 188 blood samples were analyzed from the two study sites, 80 isolates from Simbock and 108 from Tibati. The number of *P. falciparum*-infected blood samples as detected by PCR microsatellite genotyping was 70 in Simbock and 85 in Tibati, which yielded a *P. falciparum* prevalence of 87.5% (95%CI=78.3-93.3) and 78.7% (95%CI=70.0-85.6) in the human populations from the two sites respectively. Proportions of *P. falciparum*-infected individuals did not differ significantly between sites (Fischer's exact test, $P=0.13$). Proportions of people carrying multiple infections (infections with a number of alleles ≥ 2 for at least one locus) and mean multiplicity of infection (number of distinct parasite haplotypes per individual) for each microsatellite locus and overall in *P. falciparum* blood samples from each site are shown in Table 1. No spatial difference was detectable in proportions of multi-infected isolates (Fischer's exact test, $P=0.8$) nor in mean multiplicity of infection (Wilcoxon rank-sum test, $P=0.7$) among sites.

Host age effect on infection parameters. We observed a statistically highly significant negative correlation between age and multiplicity of infection both in Tibati and Simbock, the number of parasite haplotypes per infection significantly decreasing with age after 9 years in the two sites (Spearman rank coefficients, $\rho=0.34$, $P<0.001$ in Tibati; $\rho=0.38$, $P<0.001$ in Simbock). Proportions of multiple infections and mean infection multiplicity varied in both localities with age classes as shown in Figure 1, the mean number of parasite populations carried by individual host being the highest in children aged 5-9 years (mean of 3.7 and 2.9 parasite haplotypes per individual in Simbock and Tibati respectively), and the lowest in adults >30 years (mean of 1.4 and 0.6 parasite haplotypes per individual respectively). Young and older children (aged 0-4 and 10-15 years) carried similar numbers of haplotypes (respectively 2.9 and 2.8 in Simbock and 2.4 and 2.6 in Tibati), this number increasing after age 5 up to 9 years, and decreasing after age 16. The same significant host age effect on parasite prevalence was observed both in Simbock and Tibati. For both sites, proportions of infected adults aged >30 years were significantly less important than that of children aged

between 10-15 years (Fisher's exact test, $P<0.03$). In Tibati moreover, the proportion of infected adults aged >30 years was significantly less important than infected proportions of individuals in all other age classes, including the 16-29 age class (Fisher's exact test, $P<0.05$). Differences in *P. falciparum* infection parameters between age classes thus implied older adults only (>30 years) versus all other age groups.

Spatial variation between infection parameters within age groups. The similar levels of allelic polymorphism and genetic diversity assessed between human parasites from both sites (see above and below) allow for the comparison of the multiplicity of infections between them. No significant spatial difference in age group proportions of infected people was observed between sites, people from the south equatorial forest site being infected in the same proportions as people from the north whatever their age group (Fisher's exact test, $P>0.05$, tendency for a lower *P. falciparum* prevalence for adults >30 years in Tibati as compared to Simbock). Spatial variations in mean multiplicity of infection between age groups from Simbock and Tibati were not significant, >30 years age group of older adults in Tibati nevertheless showing a tendency for carrying less parasite haplotypes than in Simbock (Wilcoxon rank-sum test, $P=0.06$).

***P. falciparum* infection in the mosquito host.**

P. falciparum oocyst distribution in the mosquito host. A total of 51 and 59 oocyst-infected mosquito guts were observed from the 1631 and 6316 dissected guts in Simbock and Tibati respectively, which yielded a prevalence of 3.1% (CI95=2.4-4.1) in Simbock and 0.9% (CI95=0.7-1.2) in Tibati, the difference being highly significant (Fischer's exact test, $P<10^{-3}$). From these infected midguts numbers, a total of 540 oocysts (219 in Simbock and 321 in Tibati) were successfully counted from 43 mosquito guts in Simbock and 33 in Tibati, the loss of midguts being mainly due to blood-fed females, from which oocyst infection was visible but oocyst count impossible. Oocyst distribution among mosquitoes was highly aggregated in both sites: index of discrepancy were 0.984 and 0.997 in Simbock and Tibati respectively³⁹, a few mosquitoes carrying large oocyst numbers as is typically observed for parasite distribution among hosts⁴⁰. Mean oocyst intensity in mosquitoes were 5.1 (CI95=3.9-6.3) and 9.7 (CI95=6.7-14.3) in Simbock and Tibati respectively, the difference being significant among sites ($P=0.049$), mosquitoes in Tibati tending to harbor larger parasite infrapopulations than in Simbock. As a complementary feature, mean parasite crowding⁴¹ in Tibati (22.2, CI95=15.3-29.68.3) was significantly higher to mean parasite crowding in mosquito hosts in Simbock (8.3, CI95=6.8-10.0), i.e. parasites within mosquitoes tended to live in much larger infrapopulations in Tibati than in Simbock.

Infection parameters in the vector host. From the total of 540 counted oocysts from 76 midguts in both sites, 306 oocysts were successfully dissected and amplified for at least 5 microsatellite locus out of the 7 used, i.e. respectively 142 and 164 oocyst genotypes from 36 and 32 midguts in Simbock and Tibati. Oocyst loss was due to difficulty in individually dissecting every single oocyst of a midgut while avoiding contamination; to amplification failure due to the presence of *Plasmodium* species other than *P. falciparum* (*P. ovale* and *malariae* are also present in the areas); and to a loss at DNA extraction and amplification (small DNA amounts). Table 1 displays proportions of homozygote genotype for each locus and overall, mean genotypic diversity of oocysts within mosquito guts, and the mean number of genetically distinct oocyst genotypes per mosquito gut for each locus and overall. We observed a highly significant difference among sites in proportions of homozygote genotypes per locus as well as overall (Wilcoxon rank-sum test, $P=0.004$, and Fischer's exact test, $P=0.001$), proportions of homozygote oocysts being higher in Tibati. Difference between the mean number of genetically distinct oocysts within guts between Simbock and Tibati was not significant despite a tendency towards a higher genetically diverse oocyst load in Tibati than in Simbock (Wilcoxon rank-sum test, $P=0.07$). The genotypic diversity of mosquito infected guts was homogeneous among sites (Fischer's exact test, $P=0.6$).

Comparison with the human host. We compared proportions of multi-infected blood isolates and mosquito midguts between human and mosquito within and between sites, and did not find any significant difference (Fischer's exact tests, all $P>0.3$): in Simbock, 26 midguts out of 36 (72.2%) carried more than one oocyst genotype, whereas 53 blood isolates out of 70 contained > 2 alleles for at least one locus (75.7%). In Tibati, 21 midguts out of 32 (65.6%) carried more than one oocyst genotype, whereas 63 isolates out of 85 contained > 2 alleles for at least one locus (74.1%).

Gene diversity. Respectively 22 and 36 *P. falciparum* mono-infected isolates and reconstructed genotypes were retrieved from the 70 and 85 *P. falciparum*-infected blood isolates sampled from Simbock and Tibati, to perform gene diversity and population structure analyses (Tables 2 & 3). We selected all blood haplotypes which successfully amplified at least 5 out of the 7 locus used. Unbiased expected heterozygosities (H_E) estimated per locus, for each site and overall sites, are presented in Table 2. No significant difference in H_E was observed between the two localities, for each host (Wilcoxon rank-sum test, $P>0.3$). Similarly, within each site, parasites sampled from both human and vector hosts displayed similar gene diversity (Wilcoxon rank-sum test, $P>0.5$).

Linkage disequilibrium. We found no repeated haplotypes in blood samples, neither within nor between sites. We thus conducted the linkage disequilibrium analyses on a total of 21 mono-infected haplotypes (9 from Simbock and 12 from Tibati) and 37 reconstructed haplotypes (13 from Simbock and 24 from Tibati). Analyses computed on mono-infected isolates from each site did not display any significant linkage disequilibrium ($R=0.27-0.51$ in Simbock, $R=0.15-0.42$ in Tibati, $P>2.10^{-4}$ with the Bonferroni correction). Results using the reconstructed data sets displayed respectively 1 and 2 significantly associated locus pairs in Simbock and Tibati out of 21 possible pairs ($R=0.27-0.46$ in Simbock, $R=0.22-0.46$ in Tibati, $P<2.10^{-4}$ with the Bonferroni correction).

Results obtained from the mosquito data set contrasted with those obtained from blood samples. Mosquito guts containing only a unique oocyst genotype were discarded from the analysis. The data set was thus composed of a total of 287 oocyst genotypes, 132 from Simbock and 155 from Tibati, distributed in a total of 49 mosquito guts, 26 for Simbock and 23 for Tibati. Linkage disequilibrium was statistically significant for 17 pairs of loci out of 21 in Simbock ($R = 0.65-0.74$, $P<9.10^{-5}$ with the Bonferroni correction) and 19 pairs of loci out of 21 in Tibati ($R = 0.52-0.70$, $P<10^{-4}$ with the Bonferroni correction). Linkage disequilibrium was not due to close physical linkage between loci, as the 7 microsatellite loci are distributed among 5 different chromosomes, so that only 2 out of the 21 pairwise comparisons involved loci located on the same chromosome.

Genetic differentiation. No significant host impact was observed between parasites from human and mosquito hosts: $F_{ST}=0.006$ (CI95=0.0-0.01) using mono-infected isolates, and $F_{ST}=0.005$ (CI95=0.0-0.01) using the whole mono-infected and reconstructed haplotypes, against the pool of oocyst genotypes (computation with FSTAT v.2.9.4.)

Table 3 displays pairwise geographic differentiations (F_{ST}) between sites estimated from mono-infected isolates and reconstructed multilocus genotypes for human host samples, and from diploid oocyst genotypes for mosquito host samples. Differentiation estimated from mono-infected isolates was not significant between the two Cameroon sites Simbock and Tibati, distant from each other of about 320 km, whereas F_{ST} estimated from the reconstructed data set was weak but statistically significant. When computed on the whole data set, pairwise geographic differentiation between the two sites was not significant. When computed from the mosquito data set, differentiation is significant when neglecting the mosquito hierarchical level from the analysis (F_{ST} computed with FSTAT), but non-significant when including it (F_{ST} computed with HIERFSTAT).

DISCUSSION

We have examined *P. falciparum* infection patterns, allelic polymorphism, genetic diversity and population structure (F_{ST} and LD) in natural populations sampled from the human and vector hosts at the local level in two highly endemic areas of Cameroon using a set of seven microsatellite markers already used in previous studies. Results shed light on the conflicting results obtained on *P. falciparum* population structure in high transmission areas of Africa, sampled either from the human^{11, 13, 14} or the mosquito host.^{15, 16, 21}

The two study sites were situated in the two environmentally contrasted epidemiological settings of south and north Cameroon. Both contexts share a high and perennial malaria transmission intensity but differ in some key features, respectively: socio-cultural habits and ethnic origins (Bantu versus Fulani) of the populations surveyed, exposition to drug treatment⁴², eco-climatic environmental settings (urbanized area of the equatorial forest versus rural area in humid savannah-forest transition), or vectorial profiles (four *Anopheles* species equally transmits *P. falciparum* in Simbock while one vector species, *A. funestus* dominates all year long in Tibati in association with *A. gambiae* s.s.).⁴³

Despite these differences between the two sites, we found no significant differences in human *P. falciparum* infection parameters among sites: prevalence, proportions of multiple infections and mean multiplicity of infection in the human host were homogeneous between sites. Proportions of multiple infections and mean multiplicity of infection were shown to correlate with intensity of malaria transmission in a non-linear relationship. The more infected mosquito bites an individual receive, the more chance he had to re-infect himself with different parasite populations accumulating up to a threshold governed by several factors including the host immunity^{44, 45}. This homogeneity of global infection parameters between our sites is thus consistent with the similar transmission level intensities and the perennial pattern of distribution of infected bites throughout the year which are observed in both villages.^{30, 43} A high and perennial malaria transmission imply a particular pattern of immunity acquisition with age leading to a state of premunition, where the host control both the number and density of the parasite asexual stages. Consequences on *P. falciparum* infection patterns among age groups have already been described in numerous studies in a wide variety of transmission settings.^{46, 47, 48} We observed within both sites surveyed a highly significant age effect on parasite prevalence, proportions of multiple infections and multiplicity of infection. Mean multiplicity of infection was highly significantly negatively correlated with age in both sites, a result concordant with studies cited above describing variations of individual human host parasite population diversity with age in high transmission areas. Parasite load as well as the genetic diversity of *P. falciparum* infections,

i.e. number of concurrent genotypes, may reflect the immune status of an individual. *Plasmodium falciparum* is a highly polymorphic parasite, and individuals in malaria-endemic areas are continuously exposed to antigenically diverse parasite genotypes, with higher diversity in high transmission areas.¹¹ In highly endemic areas the number of parasite genotypes decrease with age, whereas in areas of lower transmission, i.e. providing lower herd immunity, the number of genotypes is lower and is not affected by age.^{46, 49, 50} In our study, infection parameters of adults above 30 years were highly significantly lowered as compared to all other age groups, including the younger adults group age of the 16-29 years old. This result is consistent with previous studies in high transmission areas, where children aged 5-10 do not yet control parasite multiplicity while controlling severe clinical accesses.^{6,}

45

Contrasting with human infection parameters homogeneity between sites, three mosquito infection parameters displayed a significant difference among sites: prevalence of oocyst-infected mosquitoes, mean oocyst infrapopulation size and mean crowding. Oocyst-prevalence was much higher in Simbock than in Tibati, while mean intensity and crowding varied in reverse order. Proportions of homozygote oocysts within guts followed the same trend, being much higher in Tibati than in Simbock.

When comparing patterns of *P. falciparum* infections between the human and the mosquito hosts, no significant difference arose from proportions of multiple infection, *P. falciparum*-infected human or mosquito individuals carrying a similar high proportions of multiple infections whatever the site (at least 71% of infected isolates/guts are multi-allelic/genotypic). Mean allelic multiplicity computed from human isolates are not directly comparable to mean genotypic multiplicity of oocysts from mosquito guts, humans carrying a mean of at least 2 genetically distinct haplotypes and mosquito a mean of at least 3 genetically distinct oocyst genotypes per individual. Such features are in accordance with previous observations of mean individual parasite load in areas of high transmission,⁵¹ but also in areas of lower transmission,²⁹ and were slightly superior to Bogreau *et al.*¹⁴ study in lower transmission areas using the same markers.

Parasite diversity, measured either with the number of alleles per locus or unbiased expected heterozygosity was similar among the two hosts, as well as among sites. We found high and homogeneous levels of allelic polymorphism between sites using the whole data set of genotypes and the restricted population genetics data set (a maximum of 27 alleles were observed for locus POLY α in human parasite populations from Tibati, and a maximum of 16 only for the same locus in vector parasite populations of Simbock). Similarly, we found high and homogeneous levels of *P. falciparum* genetic diversity between hosts as well as between

sites: $H_E=0.71$ and 0.76 in Simbock respectively in human and vector hosts, and $H_E=0.81$ for both human and vector hosts in Tibati. Contrary to Arez *et al.*²⁹ study, we did not find any difference between hosts, parasites from human and mosquito populations displaying similar levels of genetic diversity at the local level. H_E levels were moreover similar to those observed in a number of studies lead in high endemic African areas using the same molecular markers, either on parasite populations sampled from the human host (range $0.76-0.80$),^{11, 13, 14, 26} or sampled from the mosquito host (range $0.76-0.88$).^{16, 21} Differences in allelic frequencies between the two parasite populations from each host were not significant, contrary to results from Arez²⁹ using selected markers, which yielded a significant different allelic composition between the two hosts. This highlights the need for a comprehensive study of parasite populations in the field, using both neutral and selected markers.

Plasmodium falciparum population structure between the two sites was not significant, computed either from human mono-infected isolates, or from mosquito oocyst genotypes. This result contrasted with significant levels of *P. falciparum* structure obtained between African rural and urban sites by Abdel-Muhsin *et al.*²⁷ and Bogueau *et al.*¹⁴, but is in accordance with previous results displaying very low levels of parasite structure between distant African sites ($F_{ST} < 0.01$).¹¹ This result is hardly surprising, as Tibati and Simbock are linked by a functional road network, mobility being very frequent between Yaoundé and other places of the country. Moreover *P. falciparum* diversity was shown to be distributed at the local level within localities in Africa, and not at all or much lesser among localities.^{11, 21, 52}

When compared locus by locus, we observed a highly significant difference in mean genotypic diversity among sites, the proportion of repeated oocyst genotypes being significantly higher in Tibati as compared to Simbock. This result is in agreement with the significant F_{IS} difference between sites, which is itself concordant with the difference in proportions of homozygote oocysts among sites. Repeated genotypes within hosts were understood to be indicative of an “epidemic population structure” of the parasite, as the result of a rapid expansion of a particular genotype spreading in the population.⁵³ Differences in EIR levels and dynamics between the two sites may contribute to this pattern,⁵⁴ but it must be noticed that if it is the case, consequences of such a difference between sites is not visible at the human host level, for which prevalence and mean multiplicity were homogeneous among sites. Moreover, such an epidemic population structure was shown to generate linkage disequilibrium between unlinked locus, and indeed, such highly significant linkage was found among unlinked locus in Tibati, but it was found also in Simbock despite lower proportions of repeated genotypes within mosquito guts; no significant linkage was found using the mono-infected haplotypes data sets from the human host in the two sites. Parasite populations

concurrently sampled in human and vector hosts and analysed using the same set of molecular markers thus displayed highly significant linkage disequilibrium and F_{IS} within mosquitoes,^{16, 21} suggesting a contrasted *P. falciparum* population structure in its human and vector hosts. Such results highlights the need to address the question of *P. falciparum* population structure in high endemicity areas using a statistically significant sampling scheme: the proportions of infection multiplicity we obtained in these areas (up to 76%) preclude the use of mono-infected haplotypes data sets to resolve the parasite population structure. As illustrated from our comparative study, the lack of statistical power due to insufficient sample sizes shuffles the results and can lead to misleading conclusions.

These results are in accordance with Read *et al.*²⁰ prediction from largely fluctuating parasite sex-ratio, that *P. falciparum* population structure strongly depends on local epidemiological features, and is susceptible to vary widely between locations. Human infection parameters are homogeneous between sites, and lack of statistical power prevented an accurate study of the parasite structure from human isolates. Complementary study from the vector host displayed highly variable infection and population structure features between the two sites, despite the lack of strong differences in human parasite populations among sites.

Acknowledgements: We are grateful to the whole teams of the Laboratoire de Recherche sur le Paludisme of the Organisation de Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) for their kind help (Rose Nyanbam, Sylvie Zebaze-Kemleu, J.P. Agbor).

Financial support. This project was funded by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the VIHPAL program. Z. Annan was supported by a student fellowship from François Lacoste and the Fondation de France and a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT n° 20051205940).

Disclosure: The authors declare no commercial or other associations that might entail a conflict of interest.

Authors' addresses : Zeinab Annan, Patrick Durand, Céline Arnathau, and François Renaud, Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche 2724, Centre National de la Recherche Scientifique-Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France, Telephone: 33-6-88-309-309 or 33-4-67-41-62-53, FAX: 33-4-67-41-62-99, Emails: zei_annan@hotmail.com, durand@mpl.ird.fr, arnathau@mpl.ird.fr, renaud@mpl.ird.fr. Parfait Awono-Ambene and Frédéric Simard, Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Institut de Recherche pour le Développement, Organisation de lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale, BP 288,

Yaoundé, Cameroon, Emails: ambene_69@yahoo.fr, simard@ird.fr. Zeinab Annan and Didier Fontenille, Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France, Telephone: 33-4-67-04-19-24, FAX: 33-4-67-54-20-44, Email: fontenil@mpl.ird.fr.

REFERENCES

1. Roll Back Malaria, WHO, UNICEF, 2005. World Malaria Report 2005: World Health Organization, UNICEF.
2. Hill WG, Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D, 1995. Estimation of inbreeding coefficients from genotypic data on multiple alleles, and application to estimation of clonality in malaria parasites. *Genet Res* 65: 53-61.
3. Nee S, West SA, Read AF, 2002. Inbreeding and parasite sex ratios. *Proc Biol Sci* 269: 755-60.
4. Arnot D, 1998. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 580-5.
5. Paul RE, Hackford I, Brockman A, Muller-Graf C, Price R, Luxemburger C, White NJ, Nosten F, Day KP, 1998. Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 58: 195-203.
6. Smith T, Felger I, Beck HP, Tanner M, 1999. Consequences of multiple infection with *Plasmodium falciparum* in an area of high endemicity. *Parassitologia* 41: 247-50.
7. Bendixen M, Msangeni HA, Pedersen BV, Shayo D, Bodker R, 2001. Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 143-8.
8. Robert V, Read AF, Essong J, Tchuinkam T, Mulder B, Verhave JP, Carnevale P, 1996. Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 621-4.
9. Bell AS, de Roode JC, Sim D, Read AF, 2006. Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution Int J Org Evolution* 60: 1358-71.
10. Read AF, Taylor LH, 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099-102.
11. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP, 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 17: 1467-82.
12. Babiker HA, Lines J, Hill WG, Walliker D, 1997. Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa. *Am J Trop Med Hyg* 56: 141-7.

13. Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F, 2003. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68: 345-9.
14. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C, 2006. Genetic Diversity and Structure of African *Plasmodium Falciparum* Populations in Urban and Rural Areas. *Am J Trop Med Hyg* 74: 953-959.
15. Paul RE, Packer MJ, Walmsley M, Lagog M, Ranford-Cartwright LC, Paru R, Day KP, 1995. Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science* 269: 1709-11.
16. Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeus T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F, 2005. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17388-93.
17. Read AF, Narara A, Nee S, Keymer AE, Day KP, 1992. Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria. *Parasitology* 104: 387-95.
18. Robert V, Sokhna CS, Rogier C, Ariey F, Trape JF, 2003. Sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. *Parasitology* 127: 1-8.
19. Paul RE, Coulson TN, Raibaud A, Brey PT, 2000. Sex determination in malaria parasites. *Science* 287: 128-31.
20. Read AF, Anwar M, Shutler D, Nee S, 1995. Sex allocation and population structure in malaria and related parasitic protozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 260: 359-63.
21. Annan Z, Durand P, Ayala FJ, Arnathau C, Awono-Ambene P, Simard F, Razakandrainibe FG, Koella JC, Fontenille D, Renaud F, 2007. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7987-92.
22. Paul RE, Day KP, 1998. Mating Patterns of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 14: 197-202.
23. Vitalis R, Couvet D, 2001. Two-locus identity probabilities and identity disequilibrium in a partially selfing subdivided population. *Genet Res* 77: 67-81.
24. Tibayrenc M, 1999. Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annu Rev Genet* 33: 449-77.
25. Hastings IM, 2006. Complex dynamics and stability of resistance to antimalarial drugs. *Parasitology* 132: 615-24.
26. Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F, 2002. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect* 4: 685-92.
27. Abdel-Muhsin AA, Mackinnon MJ, Awadalla P, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA, 2003. Local differentiation in *Plasmodium falciparum* drug resistance genes in Sudan. *Parasitology* 126: 391-400.
28. Huber W, Haji H, Charlwood JD, Certa U, Walliker D, Tanner M, 1998. Genetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the transmission from the host to the vector. *Parasitology* 116: 95-101.

29. Arez AP, Pinto J, Palsson K, Snounou G, Jaenson TG, do Rosario VE, 2003. Transmission of mixed Plasmodium species and Plasmodium falciparum genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 68: 161-8.
30. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, Meunier JY, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, Wondji CS, Tchuinkam T, Fontenill D, 2002. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol* 39: 350-5.
31. Quakyi IA, Leke RG, Befidi-Mengue R, Tsafack M, Bomba-Nkolo D, Manga L, Tchinda V, Njeungue E, Kouontchou S, Fogako J, Nyonglema P, Harun LT, Djokam R, Sama G, Eno A, Megnekou R, Metenou S, Ndountse L, Same-Ekobo A, Alake G, Meli J, Ngu J, Tietche F, Lohoue J, Mvondo JL, Wansi E, Leke R, Folefack A, Bigoga J, Bomba-Nkolo C, Titanji V, Walker-Abbey A, Hickey MA, Johnson AH, Taylor DW, 2000. The epidemiology of Plasmodium falciparum malaria in two Cameroonian villages: Simbok and Etoa. *Am J Trop Med Hyg* 63: 222-30.
32. Gillies MT, De Meillon B, 1968. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. Johannesburg, South Africa.
33. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP, 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples. *Parasitology* 119: 113-25.
34. Su X, Wellems TE, 1996. Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics* 33: 430-44.
35. Reiczigel J, Rózsa L, 2005. *Quantitative Parasitology 3.0*. Budapest.
36. Goudet J, 1995. FSTAT vers1.2, a computer program to calculate F-statistics. *J Heredity* 8: 485-486.
37. Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
38. Goudet J, 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5: 184-186.
39. Poulin R, 1993. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. *Int J Parasitol* 23: 937-44.
40. Crofton HD, 1971. A model of host-parasite relationships. *Parasitology* 63: 343-64.
41. Reiczigel J, Lang Z, Rozsa L, Tothmeresz B, 2005. Properties of crowding indices and statistical tools to analyze parasite crowding data. *J Parasitol* 91: 245-52.
42. Basco LK, Ringwald P, Simon F, Doury JC, Le Bras J, 1993. Evolution of chloroquine resistance in central and west Africa. *Trop Med Parasitol* 44: 111-2.
43. Antonio-Nkondjio C, Kerah CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D, 2006. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol* 43: 1215-21.
44. Arnot DE, 2002. The influence of the genetic complexity of Plasmodium falciparum infections on the epidemiology of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1: S131-6.
45. Mercereau-Puijalon O, 1999. [Molecular analysis of Plasmodium falciparum infections in man]. *Transfus Clin Biol* 6: 44-56.

46. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, 1998. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 59: 726-35.
47. Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, Irion A, Alonso P, Teuscher T, Tanner M, 1999. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 15-20.
48. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Dicko A, Smith DL, Guindo AB, Kone AK, Traore K, Ouattara A, Djimde AA, Sehdev PS, Lyke KE, Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV, 2007. Dynamics of Polymorphism in a Malaria Vaccine Antigen at a Vaccine-Testing Site in Mali. *PLoS Med* 4: e93.
49. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, 1995. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 52: 81-8.
50. Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, 1999. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 21-8.
51. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, 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.
52. Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA, Jr., Daily JP, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT, Lukens A, Derr A, Stange-Thomann N, Waggoner S, Onofrio R, Ziaugra L, Mauceli E, Gnerre S, Jaffe DB, Zainoun J, Wiegand RC, Birren BW, Hartl DL, Galagan JE, Lander ES, Wirth DF, 2007. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 39: 113-9.
53. Maynard Smith J, 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*.
54. Urdaneta L, Lal A, Barnabe C, Oury B, Goldman I, Ayala FJ, Tibayrenc M, 2001. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6725-9.

TABLE 1

Allelic polymorphism and multiplicity of *P. falciparum* populations from the human and vector hosts in Simbock and Tibati.

Locus	Human host				Vector host				
	n	Number of alleles	% Multi-infection	Mean multiplicity (±SEM)	n	Number of alleles	Homozygosity (%)	Genotypic diversity (%)	Mean genotypic multiplicity (±SEM)
Simbock N=70					Simbock N=142				
POLYa	62	19	54.8	1.5 (±0.1)	142	16	42.3	70.4	2,8 (±0.3)
TA60	61	10	45.9	1.5 (±0.2)	142	8	52.8	63.4	2,5 (±0.3)
ARAI	63	10	58.7	1.5 (±0.1)	142	11	43.7	65.5	2,6 (±0.3)
Pfg377	60	6	50.0	1.2 (±0.1)	142	7	66.9	47.9	1,9 (±0.2)
PfPK2	58	13	51.7	1.4 (±0.2)	142	12	47.2	66.9	2,6 (±0.3)
TA87	66	16	53.0	1.5 (±0.1)	142	11	41.5	62.7	2,5 (±0.3)
TA109	60	15	46.7	1.6 (±0.2)	141	15	43.3	70.4	2,8 (±0.3)
Total	61.4	12.7	75.7	2.4 (±0.2)	141.9	11.4	25.4	81.7	3,2 (±0.4)
Tibati N=85					Tibati N=164				
POLYa	83	27	59.0	1.7 (±0.1)	164	14	62.8	49.1	2,4 (±0.3)
TA60	76	12	59.2	1.4 (±0.1)	162	9	69.5	43.4	2,2 (±0.3)
ARAI	78	12	56.4	1.4 (±0.1)	160	11	65.2	50.3	2,5 (±0.4)
Pfg377	78	7	51.3	1.2 (±0.1)	162	6	72.6	39.6	2,0 (±0.2)
PfPK2	78	20	53.8	1.5 (±0.1)	162	11	70.7	44.0	2,2 (±0.3)
TA87	80	13	58.8	1.4 (±0.1)	164	12	59.1	50.3	2,5 (±0.3)
TA109	77	18	59.7	1.6 (±0.1)	160	14	68.9	45.9	2,3 (±0.3)
Total	78.6	15.6	74.1	2.1 (±0.2)	162,0	11.0	43.9	69.2	3,4 (±0.5)

N, n = number of blood isolates or mosquitoes with PCR-detected *P. falciparum* parasites, in total and for each locus; % Multi-infection = proportion of isolates that exhibit ≥ 2 allele at least at one locus; Mean multiplicity = mean number of parasite haplotype per isolate; Total = multi-infections and mean multiplicity are calculated for the whole population from the locus exhibiting the highest number of alleles; % Homozygosity = proportion of homozygote genotype for each locus and overall; % Genotypic diversity = ratio of the number of distinct oocyst genotypes to the total number of genotypes within a mosquito host; Mean genotypic multiplicity = mean number of genetically distinct oocyst genotypes per mosquito host.

TABLE 2

P. falciparum unbiased expected heterozygosities (H_E) in its human and vector hosts in each site Simbock and Tibati, for the 7 microsatellite locus.

Locus	Human host				Vector host			
	Simbock		Tibati		Simbock		Tibati	
	n	H_E	n	H_E	n	H_E	n	H_E
POLYa	22	0,90	36	0,93	142	0,87	164	0,90
TA60	22	0,83	36	0,82	142	0,72	162	0,83
ARAII	22	0,81	35	0,83	142	0,80	160	0,80
Pfg377	20	0,10	33	0,64	142	0,47	162	0,61
PfPK2	21	0,80	34	0,79	142	0,86	162	0,86
TA87	22	0,73	36	0,83	142	0,79	164	0,84
TA109	21	0,81	35	0,82	141	0,80	160	0,83
Mean	21,4	0,71	35,0	0,81	141,9	0,76	162,0	0,81
SE		0,10		0,03		0,05		0,04

n = sample size per locus and total, i.e. number of genetically analyzed genotypes for each site obtained following methods described in the Materials & Methods section. Unbiased expected heterozygosities (H_E) was corrected for haploid data for the human host sample.

TABLE 3

Genetic differentiation between *P. falciparum* populations from Simbock and Tibati computed from the human* and vector data sets. The F_{ST} statistic (Weir & Cockerham 1984) was computed using FSTAT version 2.9.4 and HIERFSTAT version 0.04-4.

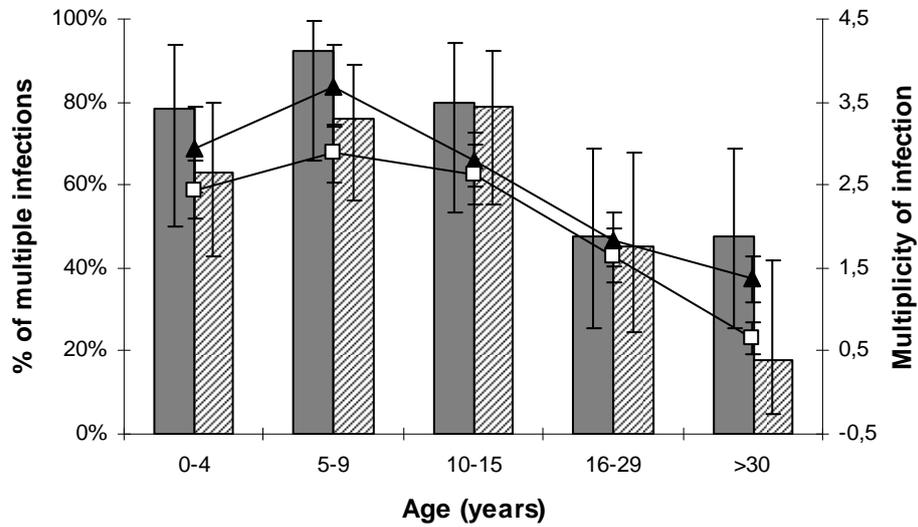
	Simbock		
	Sample size	F_{ST}	95% CI
Human host			
Mono-infected isolates (FSTAT v. 2.9.4)			
Simbock	9		
Tibati	12	0.013‡	-0.025 - 0.061
Reconstructed multi-locus genotypes (FSTAT v. 2.9.4)			
Simbock	13		
Tibati	24	0.057†	0.008 - 0.115
Vector host			
FSTAT v. 2.9.4			
Simbock	142		
Tibati	164	0.026†	0.014 - 0.042
HIERFSTAT v. 0.04-4			
Simbock	142		
Tibati	164	0.012‡	P=0.65

*Results from the human host data set were computed on both mono-infected isolates and reconstructed genotypes (see Material & Methods) as shown in the two first parts of the table. For each pairwise comparison, sample size, F_{ST} and 95% confidence interval (CI) are shown. Sample size is averaged over locus. CI were estimated after 15000 bootstrap simulations over loci. Departure of F_{ST} from zero was tested using permutation procedure and Bonferroni corrected P -value as implemented in FSTAT. From the mosquito data set, F_{ST} was also computed using HIERFSTAT v. 0.04-4 in order to take into account the mosquito level of fragmentation. Significance of the hierarchical F -statistics was assessed by 1000 permutations of subpopulations (mosquitoes) among populations (sites).

† Statistically significant; ‡ Not significant

FIGURE 1

P. falciparum proportions of multiple infections (percentages of isolates that exhibit more than one parasite haplotype) and multiplicity of infection (mean number of haplotypes per individual) per age group for each site Simbock and Tibati.



Proportions (%) of multiple infections per age class for Simbock (plain bars) and Tibati (filled bars). 95% confidence intervals were computed using Sterne's exact method (Reiczigel 2003). Mean multiplicity per age group is represented by plain triangle (▲) for Simbock and empty square (□) for Tibati. Standard error of the mean was given for mean multiplicity of infection per age group.

3 Résultats complémentaires

3.1 Le système vectoriel dans les deux sites camerounais

3.1.1 Composition et effectif de la faune anophélienne

- **Simbock :**

Les moustiques capturés sur homme à Simbock appartenait à trois genres principaux : *Culex*, *Mansonia*, et *Anopheles*. Au sein de la faune anophélienne, seules les quatre espèces vectrices majeures *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* ont été dénombrées, mais quatre autres espèces sont également récoltées sur homme dans ce site : *An. coustani*, *An. paludis*, *An. ziemanni* et *An. hancocki*. Leur rôle vecteur est négligeable (voir Antonio-Nkondjio et al. 2006).

Au total 11292 anophèles ont été récoltés à Simbock sur les trois missions de novembre 2002, mars 2003 et novembre 2004. Les proportions relatives des 4 espèces vectrices *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* étaient homogènes pour les 3 échantillonnages réalisés (Figure 9a), *An. gambiae* (50% de l'effectif en moyenne sur les 3 ans) et *An. nili* (30.5%) étant présents en majorité, suivis de *An. moucheti* (12,4%) puis *An. funestus*, dont les proportions récoltées sont restées stables pour chaque échantillonnage (8%). En 2004, l'effectif d'*An. nili* est majoritaire, essentiellement constitué de nouvelles émergences. Ces proportions représentent une évolution notable par rapport aux effectifs observés par Antonio-Nkondjio (2002) deux ans plus tôt, où *An. moucheti* était encore l'espèce vectrice majoritaire (voir la Figure 7).

- **Tibati :**

A Tibati, la faune culicidienne capturée de nuit sur homme en septembre 2003 était composée des genres *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* et *Aedes*. Sept espèces anophèles différentes ont été recensées lors de nos captures : *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. pharoensis*, *An. nili*, *An. ziemanni*, *An. paludis* et *An. wellcomei*.

Au total 7690 anophèles ont été récoltés et disséqués à Tibati, la composition de l'effectif étant la suivante : 58,2% *An. gambiae*, 25,1% *An. nili*, 16,6% *An. funestus*. Les autres espèces d'anophèles citées plus haut n'ont pas été dénombrées.

Les espèces *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili*, *An. ziemanni* et *An. paludis* sont communes aux deux sites échantillonnés. Parmi ces 5 espèces, les 3 premières sont

d'importance vectrice majeure. Aux moments où les échantillonnages ont été effectués, leurs proportions respectives étaient homogènes entre les deux sites, *An. gambiae* et *An. nili* étant les espèces les plus abondantes, l'effectif de *An. funestus* étant plus réduit.

3.1.2 Distribution spatiale de l'agressivité anophélienne

▪ **Simbock :**

Les captures sur homme ont été réalisées dans 10 cases du « bloc 6 » les deux premières années, et dans 8 cases en 2004. Les cases sont distribuées sur 600 m le long d'une piste de terre qui les sépare de divers gîtes favorables aux anophèles vecteurs.

La Figure 9a présente les densités agressives anophéliennes (taux de piqûres/homme /nuit, i.e. le *ma* de la capacité vectorielle, voir l'Encadré 1) par case pour chaque espèce vectrice en 2004, seule année où l'identification des cases a été prise en compte dans la collecte entomologique à Simbock. Les densités agressives globales varient spatialement entre cases, les cases 5 et 6 recevant significativement moins de piqûres que les autres cases. On ne peut pas exclure une moins bonne efficacité des captureurs de ces cases dans la récolte des moustiques pour expliquer ce patron, les captureurs n'ayant pas été permutés entre cases, mais aussi une plus grande distance par rapport aux gîtes ou une pulvérisation récente d'insecticides.

Cependant, les 4 espèces anophèles sont présentes en sympatrie dans chacune des 8 cases échantillonnées, et dans les mêmes proportions. *Anopheles nili* est l'espèce la plus abondante à cette période, suivie de *An. gambiae*, *An. moucheti* et *An. funestus*. L'étude menée par Antonio-Nkondjio et al. (2002) dans ces mêmes maisons du « bloc 6 » de Simbock de 1998 à 2000 faisait également état d'une distribution homogène des 4 espèces vectrices en sympatrie au sein de chacune des cases de captures (Antonio-Nkondjio, comm. pers.). Il est donc fortement probable qu'en dépit de l'évolution globale des densités relatives de ces 4 espèces, chacune des cases échantillonnées en novembre 2002 et mars 2003 hébergeaient également les 4 espèces en sympatrie comme on l'observe toujours en novembre 2004, ce qui laisse supposer une capacité de dispersion égale pour les 4 espèces dans la zone du « bloc 6 ».

Les densités agressives relatives des différentes espèces à Simbock ont évoluées par rapport aux résultats observés par Antonio-Nkondjio et al. (2002) d'octobre 1998 à novembre 2000. Ces auteurs ont observé une part dominante de l'espèce *An. moucheti* dans la composition de la faune aggressive pendant cette période, alors que nos observations menées 2 à 4 ans plus tard font état de la dominance de *An. gambiae*.

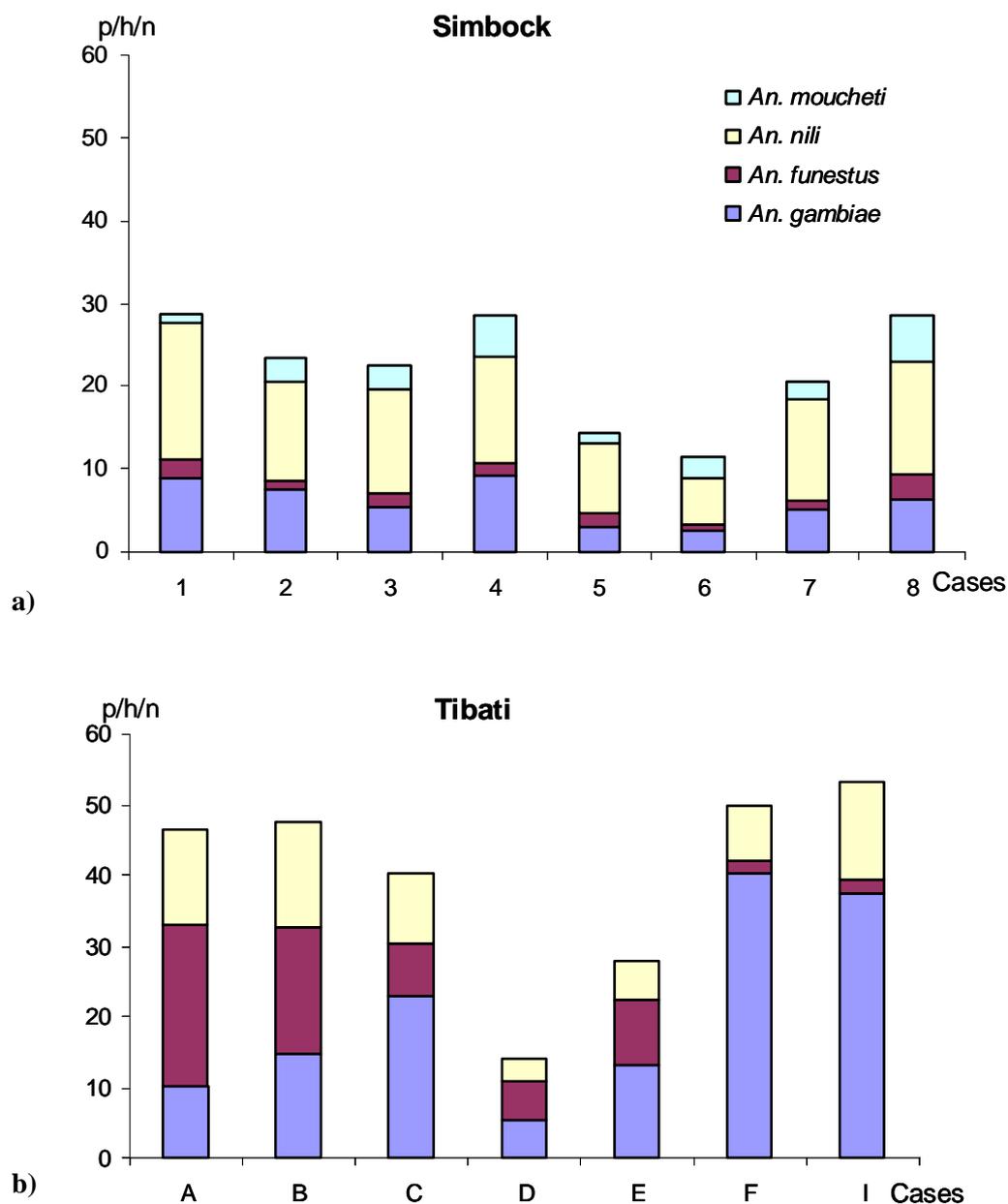


Figure 9. Fréquence des piqûres reçues par homme et par nuit ($p/h/n$) par espèce vectrice et par case à Simbock (a) et à Tibati (b). Les taux de piqûres reçues par homme par nuit ($p/h/n$) par case pour chaque espèce vectrice sont calculés pour l'échantillonnage de novembre 2004 à Simbock et pour l'échantillonnage de septembre 2003 à Tibati.

Comme le prévoyaient les auteurs, la déforestation et l'urbanisation croissante de la zone ont modifié le profil entomologique de ce village, et donc la part relative des différentes espèces dans la transmission.

▪ **Tibati :**

Les captures sur homme ont été réalisées dans 9 cases au cours de 8,9 nuits de captures en moyenne par case. Certaines cases ont été écartées certaines nuits à cause du trop grand effectif anophélien récolté par nuit par rapport à nos capacités de dissection journalière, et une case initialement incluse a été écartée à cause de sa trop faible densité en anophèles. Les 9 cases étaient réparties dans trois quartiers distincts du village, à proximité de gîtes larvaires différents : les cases A, B, C appartiennent à un même bloc de maisons situées en très proche bordure du Lac Panyéré ; les cases D, E, distantes de 100 m du premier bloc, un peu plus loin du lac et en bordure de zones de maraîchages ; les cases F et G (la case G sera éliminée au deuxième jour de capture), distante de 3 km de ce bloc, sont situées le long d'une route goudronnée menant à l'extérieur du village, elles sont distantes des proches abords du lac et de la rivière ; enfin les cases H et I appartiennent à un bloc de maison distant de 1 km du bloc F et G, situé proche de la sortie du village en bordure du lac et de la rivière Meng (voir le Plan des cases échantillonnées à Tibati en Annexe 1).

La Figure 9b présente les taux d'agressivité de chaque espèce vectrice pour chaque case échantillonnée. La case H a été retirée du lot pour le calcul du *ma*, les effectifs récoltés par homme ayant été biaisés par l'initiative personnelle du captureur principal de recruter un nombre inconnu de captureurs supplémentaires. Les taux d'agressivité globaux toutes espèces confondues varient spatialement, entre 14,1 p/h/n pour la case D et 53 p/h/n pour la case I. Les cinq espèces anophèles dénombrées sont retrouvées en sympatrie dans chacune des cases récoltées, mais leurs densités relatives diffèrent en fonction du quartier auquel elles appartiennent : les densités de *An. funestus* sont globalement plus élevées dans les cases du bloc A, B, D, E bordant le lac Panyéré (Test Chi², $P < 0.05$), à l'exception de la case C, où la densité de *An. gambiae* est augmentée ; *An. gambiae* redevient l'espèce majoritaire dans les deux cases situées à l'autre bout du village (H, I), les densités de *An. funestus* y diminuant significativement (Test Chi², $P < 0.05$); les densités de *An. nili* sont relativement homogènes quel que soit le quartier considéré (Test Chi², $P > 0.05$).

Au sein d'un village, on constate donc une sympatrie effective des différentes espèces anophèles agressives pour l'homme au sein de chacune des maisons échantillonnées, quel que soit le quartier concerné, mais les proportions relatives de ces différentes espèces au sein des cases varient fortement dans l'espace, cette variation étant plus accentuée pour *An. funestus* que pour les deux autres espèces *An. gambiae* et *An. nili*. Cette variation spatiale des densités traduit la proximité de gîtes larvaires différents adaptés à la biologie de ces différentes espèces : le rivage du lac Panyéré au niveau du bloc A, B, C, D, E est une vaste étendue d'eau de type marécageuse plantée de hautes herbes, et constitue un gîte idéal pour *An. funestus* (Illustration 2). La présence de flaques le long des chemins de terre et de cultures maraîchères



a)



b)

Illustration 2. Gîtes favorables aux vecteurs *An. funestus* et *An. gambiae* à Tibati. **(a)** Végétation dressée sur les bords du Lac Panyéré, favorable à *An. funestus* ; **(b)** les maraîchages irrigués derrière les maisons offrent des gîtes favorables aux moustiques *An. gambiae*.

dans les jardins fournissent les gîtes à *An. gambiae* (Illustration 2). La dispersion des différentes espèces dans le village est donc différente : *An. funestus* étant plus inféodé à ses gîtes larvaires disperserait moins que *An. gambiae*, pour lequel la diversité et l'abondance de ses gîtes (flaques, irrigation, etc.) favoriseraient une distribution homogène de l'espèce dans tout le village et donc une plus grande dispersion.

Les dynamiques des densités des vecteurs majeurs présents dans ces deux sites sont très différentes au cours de l'année. Les fluctuations des densités agressives des 4 espèces vectrices à Simbock varient ensembles de façon homogène au cours de l'année en suivant le rythme des pluies, avec un pic très marqué en octobre-novembre à la fin de la grande saison des pluies (voir la Figure 7). Les dynamiques des densités agressives à Tibati varient de façon hétérogène pour les différentes espèces, les pics d'abondances des différentes espèces étant décalés dans l'année (*An. funestus* et *An. pharoensis* abondants en saison sèche, *An. gambiae* et *An. nili* plus inféodés aux pluies) (données F. Simard, UR016 IRD, comm. pers.).

Toutes les espèces anophèles vectrices présentes dans les deux sites sont observées en sympatrie dans les habitations choisies pour chacun des échantillonnages réalisés. On observe cependant une différence dans la distribution spatiale des différentes espèces entre les deux sites : alors que les 4 espèces vectrices à Simbock sont retrouvées en densités homogènes au sein de chacune des cases, les densités relatives des différentes espèces au sein des cases à Tibati varient spatialement. La différence entre les patrons de distribution des espèces au sein des cases entre les deux sites est d'abord due au fait que les cases ont été choisies à Tibati dans différents quartiers, soumis chacun à une qualité de gîtes distincte. Les maisons des différents quartiers à Tibati sont plus distantes entre elles qu'à Simbock (1-2 km contre 600 m), où les cases ont été choisies au sein du « bloc 6 » soumis aux mêmes gîtes.

3.1.3 Cycle d'agressivité nocturne par espèce

▪ **Simbock :**

Pour chacune des espèces, la proportion de moustiques ayant piqué après 01H du matin est significativement supérieure à celle ayant piqué entre 20H et 01H (Test Chi², $P < 0,05$). Le suivi longitudinal de Antonio-Nkondjio et al. (2002) montre une stabilité dans le temps de ce comportement quelle que soit l'espèce considérée à Simbock.

▪ **Tibati :**

On constate à Tibati une hétérogénéité du comportement nocturne de recherche de l'hôte en fonction de l'espèce vectrice. Alors que les densités agressives de *An. gambiae* (pour 5 cases/8 analysées) et *An. funestus* (très net pour 8 cases/8) sont significativement supérieures après 01H du matin, ce comportement n'est pas retrouvé pour *An. nili*, puisque la densité aggressive de cette espèce est significativement supérieure en première partie de nuit pour 6 cases sur 8 (résultats non montrés). Un suivi longitudinal effectué à Tibati de 2002 à 2003 n'a cependant pas constaté de variations dans les densités agressives relatives des différentes espèces au cours de la nuit (données F. Simard, UR016 IRD, comm. pers.).

3.1.4 Comportement trophique

▪ **Simbock :**

Les proportions de chaque espèce vectrice échantillonnées par les captureurs placés en extérieur et intérieur ne sont pas indicatives de l'endophilie ou de l'exophilie d'une espèce, puisque une espèce qui se nourrit à l'intérieur peut très bien ressortir pour chercher son lieu de repos à l'extérieur. Elles donnent cependant une indication quand à la préférence du lieu et du type d'hôte choisi lorsque l'anophèle a le choix entre prendre son repas de sang à l'intérieur sur un dormeur ou le prendre à l'extérieur sur le captureur éveillé.

Sur les trois années, aussi bien que par année, nous observons une dichotomie comportementale *An. gambiae*/*An. moucheti*, ces deux vecteurs étant indifférents ou exophages, versus *An. funestus*/*An. nili* endophages (Test χ^2 , $P < 0.01$). Nous ne constatons pas d'endophagie significative pour les deux premières espèces, comme rapporté par Antonio-Nkondjio et al. (2002), qui observe une préférence pour l'endophagie pour les 4 espèces étudiées, *An. funestus* étant significativement plus endophage que *An. moucheti*. Ces observations ne sont cependant que ponctuelles.

▪ **Tibati :**

Les trois espèces échantillonnées à Tibati ont un comportement homogène, avec une proportion significativement supérieure de moustiques ayant pénétré à l'intérieur de la maison (ou, y étant déjà, n'en étant pas ressorti) pour la prise du repas de sang pour chaque espèce, mais également une proportion non négligeable de moustiques ayant choisi de prendre le repas de sang sur l'hôte extérieur.

De la même manière qu'à Simbock, la part endophage de *An. funestus* est significativement supérieure à celle de *An. gambiae* à Tibati, et équivalente à celle de *An. nili*.

Quel que soit le site, *An. funestus* est une espèce plus endophage que les autres espèces anophèles, en accord avec les observations rapportées dans la littérature au sujet du comportement particulièrement endophile de cette espèce, historiquement plus vulnérable aux mesures de lutte par aspersion intra-domiciliaire (Coetzee & Fontenille 2004 ; Gillies & De Meillon 1968).

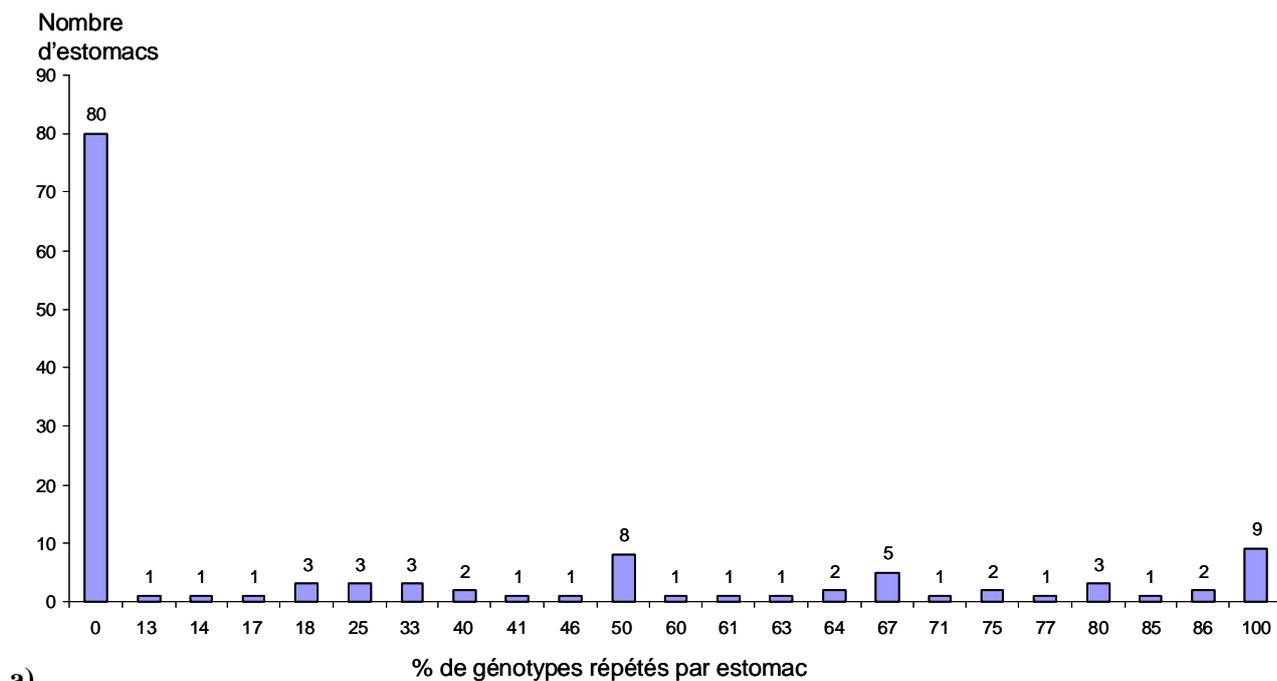
3.2 L'effet des clones sur l'estimation des paramètres de génétique des populations

3.2.1 Importance des clones de *P. falciparum* dans les moustiques

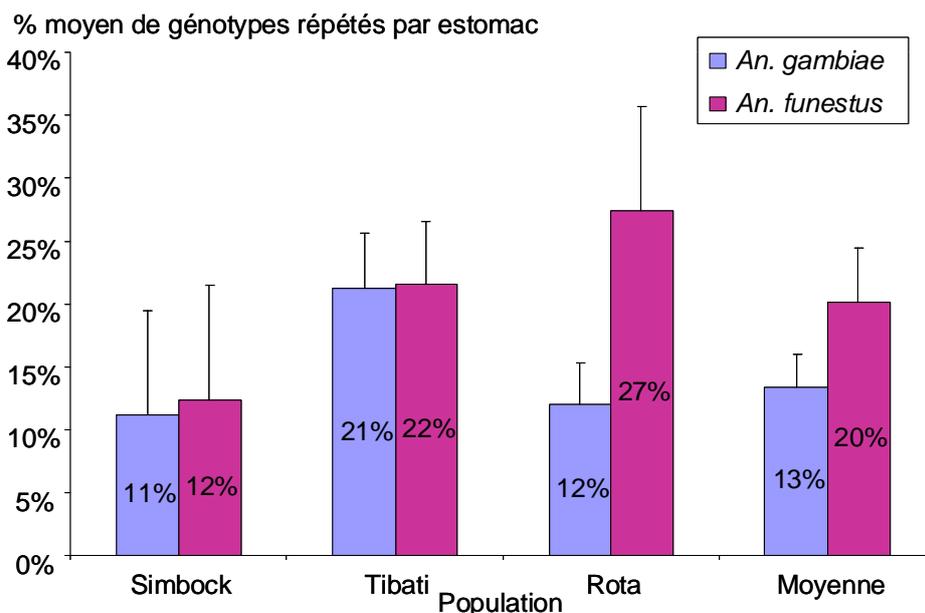
L'agrégation des parasites au sein des individus hôtes est un trait caractéristique de l'infection des hôtes par les parasites, un nombre limité d'hôtes concentrant un nombre élevé de parasites. Des études essentiellement menées sur les infrapopulations de macroparasites pour leur accès plus aisé ont mis en évidence la présence de nombreux génotypes multilocus parasitaires génétiquement identiques et répétés plusieurs fois au sein des infrapopulations (Mulvey et al. 1991 ; Nadler 1995 ; Theron et al. 2004). La présence de génotypes clonaux est caractéristique des parasites à cycle complexe, alternant au cours de leur cycle de vie une phase de multiplication asexuée avec une phase de reproduction sexuée au sein des hôtes successifs. Au cours de la phase asexuée, les génotypes parasitaires sont dupliqués en de multiples copies, notamment pour optimiser la transmission.

Ces génotypes multilocus génétiquement identiques sont distribués de façon agrégée entre les hôtes, et affectent la distribution de la diversité génétique parasitaire au sein et entre les individus hôtes (Mulvey et al. 1991). De très nombreuses espèces, parasites ou libres, alternent ainsi des phases de reproduction sexuée et asexuée au cours de leur cycle de vie (insectes, plantes, champignons, rotifères, trématodes, cestodes, protozoaires, etc.), mais l'impact de ce cycle alterné sur la structure génétique de leurs populations n'a pas été analysé jusqu'à récemment.

Dans l'échantillonnage des oocystes de *P. falciparum* que nous avons effectué au sein des anophèles, environ 40% (2 sur 5) des estomacs infectés analysés contenaient au moins un génotype répété au moins deux fois (Figure 10a). Le nombre de répétitions des génotypes clonaux par estomac (268 génotypes répétés ont été observés sur les 686 génotypes multilocus complets obtenus) variait de 2 (pour n = 33 estomacs) à 17 (pour n = 2 estomacs), avec une distribution agrégée du nombre de répétitions par estomac (i.e. peu d'estomacs avec de nombreuses copies d'un ou plusieurs clones, la majorité des estomacs contenant au moins un génotype répété deux fois).



a)



b)

Figure 10. Importance des génotypes oocystes répétés de *P. falciparum* dans les estomacs infectés analysés des vecteurs échantillonnés au Cameroun et au Kenya. **(a)** Distribution des estomacs en fonction de la proportion de génotypes répétés au moins deux fois qu'ils contiennent. Sur un total de 133 estomacs infectés analysés (échantillonnage total : 4 vecteurs, 3 sites, toutes les années) contenant au moins deux oocystes aux génotypes multilocus complets, 53 contiennent au moins un génotype répété au moins deux fois (39,8%) ; **(b)** proportion moyenne de génotypes identiques répétés par estomac, pour chaque espèce *An. gambiae* et *An. funestus*, par site, et globale.

La Figure 10b présente les proportions moyennes de génotypes répétés identiques par infrapopulation de *P. falciparum* dans les populations des vecteurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* échantillonnées dans les trois sites africains en 2002, 2003 et 2004. Jusqu'à 27% en moyenne des oocystes dans les estomacs d'*An. funestus* à Rota, au Kenya, sont génétiquement identiques, les proportions variant significativement d'une année à l'autre à Simbock et Rota (données non montrées).

3.2.2 Modélisation de l'effet des clones

L'impact de la distribution agrégée des parasites dans les hôtes sur les paramètres de génétique des populations a été étudié quand les outils de la biologie moléculaire ont permis de caractériser génétiquement les parasites présents au sein de chaque hôte, ce qui nécessite un échantillonnage réalisé au niveau de l'infrapopulation parasitaire. De tels protocoles n'ont pas été applicables pour les microparasites comme *P. falciparum* jusqu'à récemment, aussi la majorité des études sur le sujet concerne-t-elle les macroparasites.

Un modèle appliqué au cycle de vie du trématode *Schistosoma mansoni* visant à déterminer l'impact de la variance dans le succès reproducteur des clones par individu hôte (i.e. la variance du nombre de copies des génotypes multilocus répétés au sein de l'infrapopulation) sur l'estimation des F -statistiques a été élaboré (Prugnolle et al. 2005a ; Prugnolle et al. 2005b). La Figure 11 illustre les effets du taux d'autofécondation (s) et de la variance dans le succès reproducteur des clones (c) sur les paramètres F_{IS} (Figure 11a) et F_{ST} (Figure 11b). Le taux d'autofécondation et le biais de reproduction clonal ont des effets opposés sur le F_{IS} : celui-ci augmente avec l'autofécondation, mais diminue avec la force du biais reproducteur au cours de la phase clonale.

En fait, l'augmentation de la variance dans le succès reproducteur des clones au sein de l'infrapopulation augmente la probabilité (Q_1) que deux allèles homologues tirés au hasard dans deux individus parasites de l'infrapopulation descendent du même allèle ancêtre commun, et donc diminue le F_{IS} . En revanche, la probabilité d'identité des allèles homologues à un locus donné au sein d'un individu (Q_0) augmente avec l'autofécondation.

Contrairement à ce qui a été proposé précédemment (Mulvey et al. 1991 ; Vilas et al. 2003 cité par Prugnolle et al. 2005b), l'agrégation des clones dans les hôtes définitifs n'est donc pas responsable des F_{IS} positifs. Même si des génotypes multilocus identiques sont présents en grand nombre au sein d'un hôte, aucun déficit en hétérozygote ne sera mesuré dans l'infrapopulation si la reproduction sexuée a été panmictique au stade adulte.

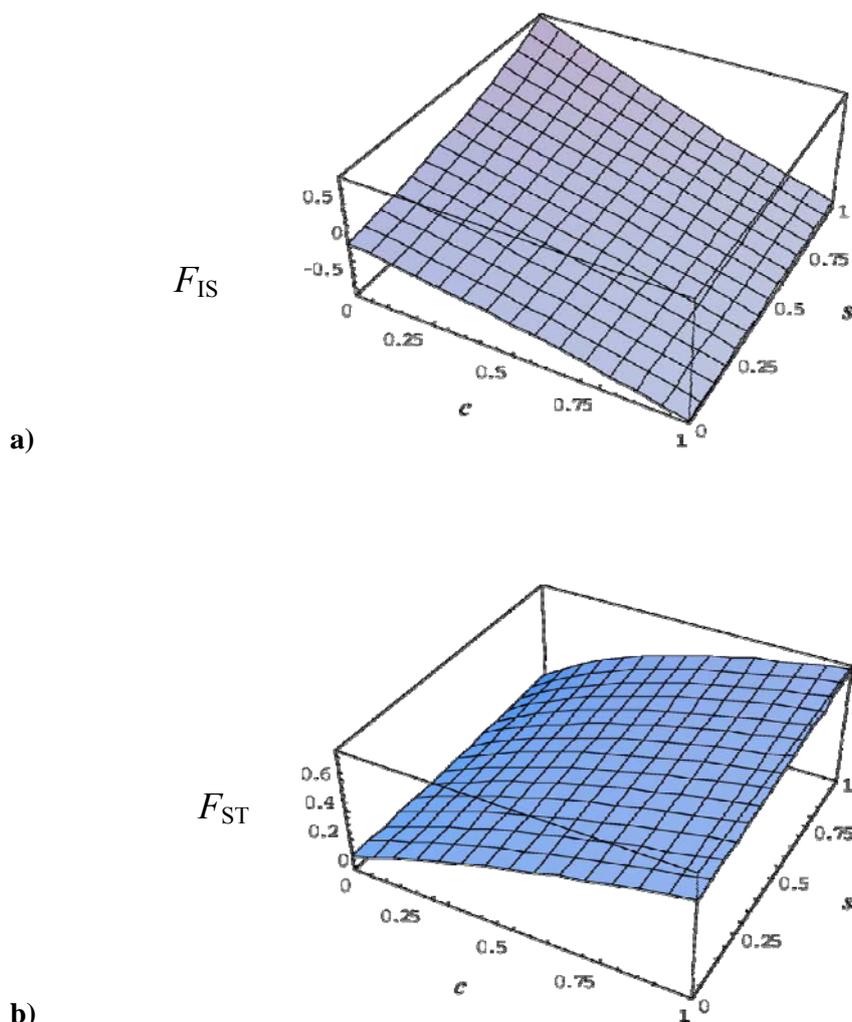


Figure 11. Relations entre le taux d'autofécondation (s), la variation dans la variance du succès reproducteur des clones (c) et (a) le F_{IS} dans les hôtes définitifs et (b) le F_{ST} . (c) est le paramètre qui fait varier la variance du succès reproducteur des clones entre la variance du modèle de Wright-Fischer ($c=0$) et la variance maximale ($c=1$). Le paramètre c représente l'intensité du biais à la reproduction entre parasites larvaires au sein d'une infrapopulation, et mesure donc la variance du succès reproducteur pendant la phase clonale. (Source : Prugnolle et al. 2005b).

L'effet de l'agrégation des clones sur le F_{ST} a été mieux compris (Mulvey et al. 1991 ; Théron et al. 2004) : le F_{ST} inter-infrapopulations et inter-populations augmente avec la variance du succès reproducteur des clones au sein des infrapopulations (Q_1 augmente) (Figure 11b)

Les auteurs précisent que ces résultats sont applicables à tous les parasites alternant des phases de reproduction sexuée et asexuée. Cependant, les cycles de *S. mansoni* et *P. falciparum* diffèrent en des points cruciaux : dans le cycle de *P. falciparum*, l'amplification clonale a lieu dans l'hôte vertébré pour les stades gamètes, i.e. les gamétocytes mâles et

femelles sont amplifiés clonalement à partir des mérozoïtes dans le sang humain, puis ingérés par le moustique. C'est-à-dire que l'amplification clonale a lieu avant la phase de reproduction sexuée qui implique des stades gamètes haploïdes, et non pas des stades adultes diploïdes comme c'est le cas pour les schistosomes. La fécondation au sein de l'estomac du moustique, si elle a lieu entre gamètes mâle et femelle génétiquement identiques (autofécondation), aboutit directement à la formation de zygotes puis d'oocystes diploïdes homozygotes à tous les locus (systématiquement 100% des individus produits seront homozygotes à tous les locus, et non pas 50% comme c'est le cas lorsque l'autofécondation a lieu entre des stades adultes diploïdes).

Dans ce cas, et si il existe une variance dans le succès reproducteur des gamétocytes ingérés, à la fois la probabilité d'identité des allèles homologues à un locus donné au sein d'un individu (Q_0) mais également la probabilité d'identité d'allèles à un locus donné dans deux individus différents de la même infrapopulation (Q_1) vont augmenter avec la présence et la variance dans le succès reproducteur des zygotes génétiquement identiques au sein des infrapopulations parasitaires (voir l'Intro. biblio., Partie 2, Par. 1.2).

Ainsi, les estimateurs des F_{ST} par paires entre infrapopulations devraient augmenter, alors que les estimateurs de F_{IS} , calculés au sein des infrapopulations, ne devraient pas être affectés par les génotypes répétés (en effet, Q_0 et Q_1 sont affectés dans le même sens par la variance dans le succès reproducteur des génotypes répétés).

Dans ces conditions, les conséquences sur l'estimation du F_{IS} sont loin d'être claires, et nécessiteraient l'élaboration d'un nouveau modèle. Contrairement à *S. mansoni*, si on prend le cas d'un hôte définitif moustique n'hébergeant qu'un seul génotype clonal oocyste de *P. falciparum* présent en plusieurs exemplaires (variance du succès reproducteur entre clones maximale, $c = 1$), et si ce clone a été produit par autofécondation, on aura un F_{IS} indéterminé, car il sera homozygote à tous les locus. Pour *S. mansoni*, ce clone même autofécondé peut être homozygote à certains locus (F_{IS} indéterminé) et hétérozygotes à d'autres ($F_{IS} = -1$), avec un F_{IS} global sur tous les locus = -1 malgré l'autofécondation au stade adulte.

3.2.3 L'effet des clones de *P. falciparum* : données empiriques

L'influence de la présence de génotypes oocystes multilocus identiques répétés (que nous nommons clones avec les précautions émises en Intro. biblio., Partie 2, Par. 2.1) dans les infrapopulations d'oocystes de *P. falciparum* sur les estimations des paramètres F_{ST} , F_{IS} et H_S a été recherchée empiriquement : nous avons calculé pour chaque infrapopulation d'oocyste la diversité génotypique multilocus ($\%dist$) comme le ratio du nombre de génotypes multilocus distincts sur le nombre total de génotypes multilocus par infrapopulation. La différence $I-$

%dist est la proportion de génotypes multilocus identiques au sein de chaque infrapopulation (*%id*), variable qui est prise comme indice d'identité génotypique au sein de chaque infrapopulation.

La moyenne des *%id* sur toutes les infrapopulations a été prise comme indice de la proportion de génotypes multilocus identiques dans chaque population d'infrapopulations, avec 12 populations au total : 6 à Simbock (2 par année, i.e. les populations de *P. falciparum* échantillonnées chez *An. gambiae* et *An. funestus*, seuls vecteurs pris en compte pour l'analyse, 2 pour Tibati et 4 pour Rota, Kenya).

La relation entre l'indice moyen par infrapopulation d'identité multilocus et la variation dans les paramètres F_{ST} (estimé par θ), F_{IS} (estimé par f) et H_E due à la présence de génotypes répétés au sein des infrapopulations a été étudiée. Les estimateurs θ , f et H_E moyennés sur les infrapopulations ont été calculés avec FSTAT V.2.9.3 pour chaque population en incluant puis en retirant du jeu de données les génotypes répétés contenus dans chaque infrapopulation. La différence entre les valeurs θ , f et H_S obtenues avec et sans les génotypes répétés a été calculée : $(\theta_C - \theta_{SC}) = \theta$ inter-infrapopulation moyen par population avec génotypes répétés – θ inter-infrapopulation moyen par population sans génotypes répétés (Figure 12a) ; $(f_C - f_{SC}) = f$ infrapopulation moyen par population avec génotypes répétés – f moyen par population sans les génotypes répétés (Figure 12b) ; $(H_{EC} - H_{ESC}) = H_E$ intra-infrapopulation moyen par population avec génotypes répétés – H_S moyen par population sans génotypes répétés (Figure 12c).

Les corrélations entre le pourcentage moyen d'identité dans chaque population (*%id*) et la différence entre les valeurs de f , de θ et de H_E avec et sans génotypes répétés sont illustrées Figure 12 (a, b, c).

La Figure 12a montre une corrélation positive significative (relation linéaire) entre l'écart des deux valeurs θ estimées avec et sans clones, et le pourcentage moyen de génotypes multilocus identiques dans les infrapopulations pour chaque population. L'estimation du F_{ST} augmente donc significativement dans notre jeu de données avec la proportion de clones dans les infrapopulations (test de corrélation de Spearman, $S = 7$, $P < 0,001$).

En revanche, ce résultat n'est pas observé pour le paramètre F_{IS} , qui montre une faible tendance non significative (test de corrélation de Spearman, $S = 120$, $P = 0,0504$) à décroître avec la proportion de clones dans l'infrapopulation.

Le paramètre H_E , de la même façon que pour le F_{ST} , augmente linéairement avec la proportion de clones dans les infrapopulations (test de corrélation de Spearman, $S = 555$, $P < 0,001$).

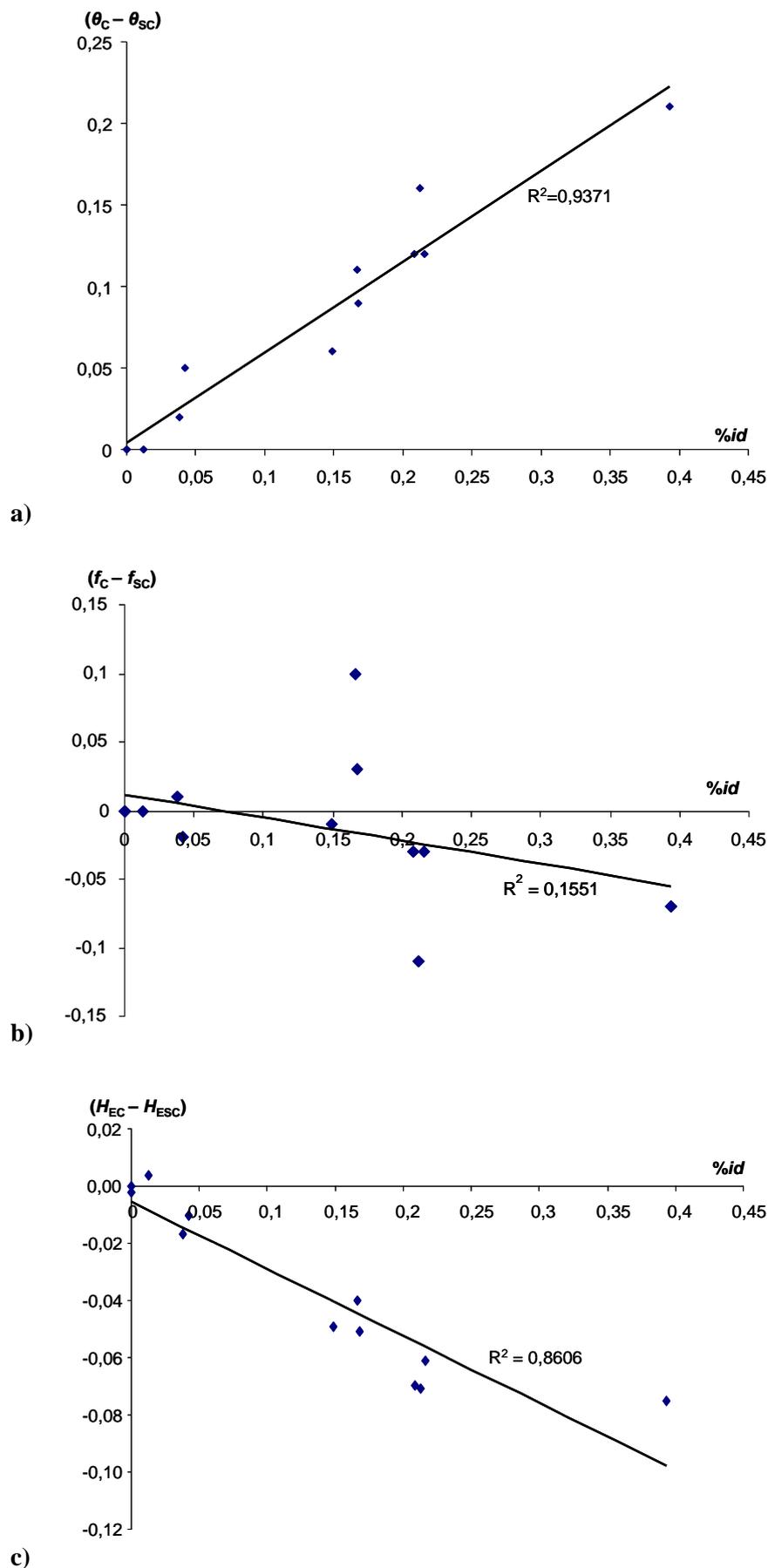


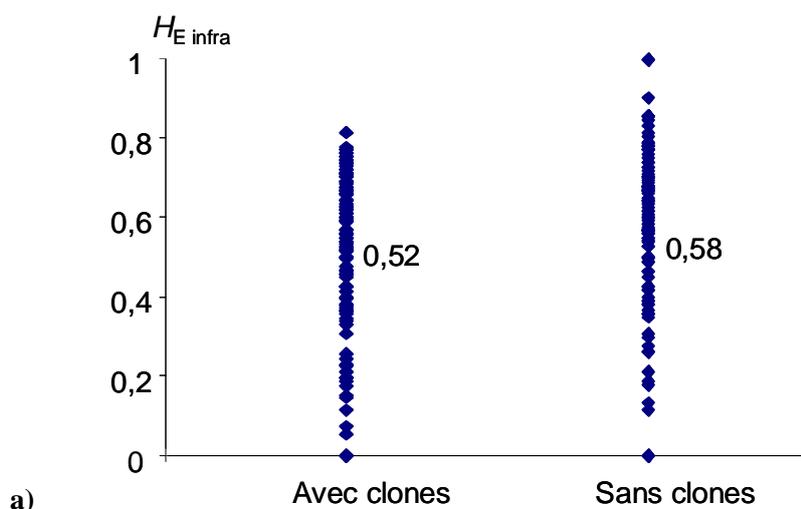
Figure 12. Influence des génotypes multilocus répétés présents dans les infrapopulations de *P. falciparum* sur l'estimation des F -statistiques et de H_E . Corrélation entre l'indice d'identité

génotypique moyen par infrapopulation (*%id*) et la différence entre les estimateurs des paramètres F_{ST} , F_{IS} et H_E estimés avec et sans génotypes répétés : $(\theta_C - \theta_{SC})$ (a), $(f_C - f_{SC})$ (b), $(H_{EC} - H_{ESC})$ (c). $\%id = 1 - \%dist$ avec $\%dist = \text{ratio du nombre de génotypes distincts sur le nombre total de génotypes présents dans chaque infrapopulations, moyenné sur le total des infrapopulations pour chaque population (n=12)}$. $(\theta_C - \theta_{SC})$, $(f_C - f_{SC})$, $(H_{EC} - H_{ESC}) = \text{différence entre la moyenne sur le total des infrapopulations des paramètres } \theta \text{ (moyen par paires d'infrapopulations), } f \text{ (par infrapopulation) et } H_E \text{ (par infrapopulation) calculés avec clones (C) et sans clones (SC), pour chaque population (n=12)}$.

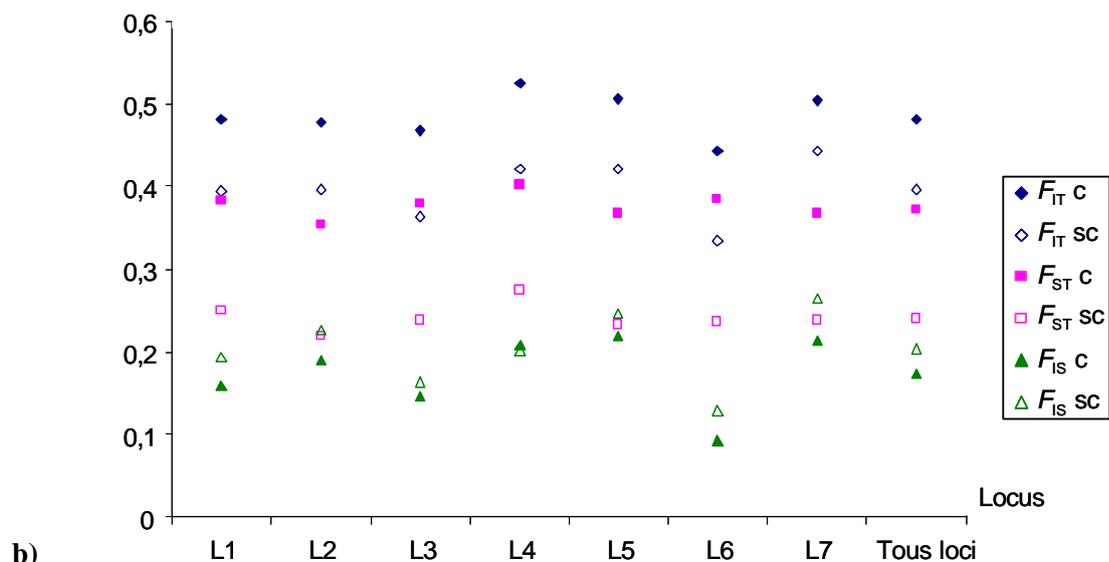
Ces résultats obtenus sur des populations naturelles de *P. falciparum* s'accordent avec des conclusions antérieures dérivées des modèles théoriques et de données empiriques sur la variation des estimations de F_{IS} et F_{ST} induites par la présence de génotypes répétés identiques dans les infrapopulations des parasites à cycle complexe (Théron et al. 2004 ; Prugnolle et al. 2005a ; Prugnolle et al. 2005b).

D'autre part, la diversité génétique infrapopulationnelle moyenne estimée sur les infrapopulations des deux vecteurs *An. gambiae* et *An. funestus* sur les trois sites diffère significativement entre l'estimation faite avec les génotypes répétés et l'estimation faite sur un échantillonnage qui ne conserve qu'une seule copie de chaque clone par infrapopulation (Figure 13a) (test de Wilcoxon, $N=107$, $P=0,048$).

Les paramètres F_{IS} et F_{ST} ne sont pas affectés de la même façon par la présence des génotypes répétés : alors que les estimations diffèrent significativement pour les F_{ST} avec et sans génotypes répétés, les conséquences sur le F_{IS} ne sont pas significatives (Figure 13b).



Avec clones : les génotypes répétés sont conservés au sein des infrapopulations ; Sans clones : une seule copie de chaque génotype répété est conservée dans les infrapopulations. $H_E \text{ infra}$: diversité génétique attendue moyenne par infrapopulation.



$F_{IT} C/F_{ST} C/F_{IS} C$: clones conservés dans le jeu de données; $F_{IT} SC/F_{ST} SC/F_{IS} SC$: une seule copie est conservée par clone dans le jeu de données

Figure 13. Effets des génotypes répétés sur la diversité et la structure de *P. falciparum* dans les vecteurs. **(a)** Effet des clones sur le H_E moyen par infrapopulation pour les infrapopulations de *An. gambiae* et *An. funestus* à Simbock, Tibati et Rota ; **(b)** Effet des clones sur les estimateurs des F_{IT} , F_{ST} et F_{IS} par locus estimés sur la population de *P. falciparum* échantillonnée en 2002, 2003, 2004 au sein des quatre espèces vectrices à Simbock, structurée en infrapopulations (oocystes par moustique).

Discussion générale

1 Distribution de *P. falciparum* dans ses hôtes homme et anophèles vecteurs en Afrique

1.1 Impact de l'espèce vectrice sur la distribution de *P. falciparum*

1.1.1 Le parasite *P. falciparum* et les anophèles en zone de forêt équatoriale africaine

Quatre vecteurs majeurs africains des parasite *Plasmodium*, *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* sont présents en sympatrie de façon pérenne dans la localité de Simbock, village de la proche banlieue de Yaoundé, au Sud-Cameroun. La particularité du milieu forestier équatorial pour la transmission palustre a été exposée dans l'Introduction. La zone équatoriale est considérée comme la zone d'origine du parasite *P. falciparum*. Le parasite y aurait évolué récemment (environ 10000 ans) en parasite virulent pour l'homme, transmis efficacement par les espèces vectrices *An. gambiae* et *An. funestus* façonnées par l'homme lors de sa pénétration du milieu forestier.

Coluzzi (1999) a proposé une théorie pour rendre compte de l'origine de la forte virulence observée chez le parasite *P. falciparum*, et de la forte anthropophilie des vecteurs africains les plus abondants et les plus répandus, *An. gambiae* s.s. et *An. funestus*. L'auteur suppose que la colonisation du milieu forestier équatorial africain par l'homme aurait favorisé l'évolution du comportement très anthropophile qui caractérise ces deux vecteurs : l'absence des hôtes vertébrés alternatifs majeurs que représentent les bovidés en zone de savane africaine, due à la trypanosomiase bovine, ainsi que les modifications environnementales induites par l'action de l'homme (déforestation du milieu pour l'agriculture), auraient favorisé l'émergence de gîtes propices à ces deux espèces, les hommes fournissant le « couvert ». Le parasite *P. falciparum* aurait évolué relativement récemment, ce qui expliquerait sa virulence, dans le contexte d'une transmission accrue due à l'évolution vers l'anthropophilie et finalement la spéciation des deux taxons *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* s.s. Ces vecteurs auraient ensuite disséminé sur le reste du continent africain sub-saharien à partir de ces foyers équatoriaux primitifs. Les histoires évolutives de ces deux espèces vectrices se différencieraient donc de celles des deux espèces *An. nili* et surtout *An. moucheti*, vecteurs « indigènes » du milieu forestier équatorial ayant colonisé les abords des cours d'eau forestiers, se nourrissant sur singes et transmettant les parasite des primates tels *P. reichenowi*. Elles se seraient plus tard adaptées à se nourrir sur l'homme, en gardant leurs spécificités de gîtes, *An. nili* diffusant toutefois plus largement que *An. moucheti*, colonisant

les cours d'eau des zones de galeries forestières en zone de savane, alors que *An. moucheti* est exclusivement inféodé à la zone forestière équatoriale africaine .

1.1.2 Variation de l'infection entre espèces vectrices

Le parasite *P. falciparum* infecte l'ensemble des espèces vectrices échantillonnées dans les deux sites camerounais et dans le site kenyan. A Simbock, où les quatre vecteurs majeurs sont présents en sympatrie, et à Tibati, où trois sont présents, on observe des variations significatives dans la prévalence (proportion des individus infectés) et l'abondance (nombre moyen de parasites par hôte) du parasite entre les espèces vectrices (Article 1 et 2) : la proportion de femelles *An. funestus* infectées en oocyste est significativement supérieure à celle des autres espèces vectrices, pour tous les échantillonnages effectués. L'espèce hôte est donc un facteur significatif qui détermine l'abondance des parasites dans les deux sites camerounais. Cet effet de l'espèce sur la prévalence en oocyste n'est pas observé dans le site kenyan, en Afrique de l'Est.

Ce patron est cohérent avec les résultats obtenus antérieurement au Cameroun dans le même village, mais le stade parasitaire mesuré était les sporozoïtes dans les glandes salivaires, dont les prévalences globales sur les deux années étaient supérieures pour les deux espèces *An. gambiae* et *An. funestus* par rapport aux deux vecteurs « locaux » *An. nili* et *An. moucheti* (Antonio-Nkondjio et al. 2002). Le trait particulier du vecteur *An. funestus*, plus infecté que les autres vecteurs sympatriques a été mis en évidence par Fontenille et al. (1997) dans la zone écoclimatique de l'Afrique de l'Ouest (Dielmo, Sénégal) : les taux d'infections des glandes salivaires des populations naturelles de *An. funestus* (2,6% en moyenne sur 3 ans) étaient systématiquement supérieurs sur les trois ans aux *IS* des vecteurs majeurs sympatriques *An. gambiae* s.s. ou *An. arabiensis*. Dia et al. (2001) dans une autre zone du Sénégal n'observe cependant pas cette différence. Cette hétérogénéité des taux d'infection entre vecteurs sympatriques n'a pas été reportée en Afrique de l'Est, où les trois vecteurs *An. funestus*, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*, assurent pourtant l'essentiel de la transmission des *Plasmodium* très souvent en sympatrie (Beier et al. 1991 ; Gillies & De Meillon 1968).

Deux paramètres sont essentiels pour définir la capacité vectrice d'une espèce anophèle : une composante intrinsèque au vecteur, et une composante déterminée par son comportement et par l'environnement. La composante intrinsèque, ou compétence vectorielle, est déterminée par l'aptitude génétique du vecteur à supporter le cycle complet du développement sporogonique du parasite. Les études abordant la question de la comparaison de ce développement entre les quatre espèces anophèles vectrices majeures de notre étude

sont rares (Robert et al. 1998, Czeher et al. 2006). Robert et al. (1998) ont comparé le développement sporogonique de souches naturelles de *P. falciparum* entre les trois espèces *An. gambiae*, *A. funestus* et *An. nili* par infections expérimentales. Les cinétiques du cycle sporogonique précoce étaient similaires pour les trois espèces étudiées, mais les auteurs notent que les prévalences des stades zygotes et ookinètes sont supérieures chez les deux vecteurs *An. gambiae* et *An. funestus* par rapport à celles de *An. nili*. Les auteurs expliquent ces différences de prévalence, concordantes avec les faibles *IS* mesurés sur le terrain, par la taille réduite du vecteur *An. nili*, qui ingérerait une quantité de sang plus faible et donc moins de gamétocytes que les deux autres espèces.

Antonio-Nkondjio et al. (2002) à Simbock notent pour leur part que la parité et la proportion de femelles endophiles gorgées sur homme étant similaires entre les quatre espèces, les *IS* plus élevés des deux vecteurs *An. gambiae* et *An. funestus* proviendraient d'une compétence vectorielle supérieure à celle de *An. moucheti* et *An. nili*.

Gouagna et al. (1998) ont montré que la phase sporogonique précoce dans le bolus sanguin n'affecte pas les prévalences parasitaires dans les vecteurs, mais uniquement les densités ; c'est la transition ookinète-oocyste, donc les facteurs de résistance propres aux moustiques, qui affecte les prévalences, en même temps que les densités, car à ce stade le vecteur peut éliminer le parasite. Le nombre d'oocystes, phénotype utilisé dans l'immense majorité des études de l'immunité des anophèles pour évaluer la résistance/susceptibilité d'un système moustique/parasite à l'infection, est ainsi le reflet des étapes de contrôle par les facteurs immuns propres au moustique, postérieures au contrôle de l'infection par les facteurs du sang et du parasite. Robert et al. (1998) notent ainsi que la rapidité de l'infection en conditions naturelles est bien supérieure à celle des souches de *P. falciparum* de laboratoire, autre indice de la coadaptation dans le système anophèle/*Plasmodium*.

Fontenille et al. (1997) avancent deux causes pour expliquer les *IS* plus élevés chez *An. funestus* à Dielmo : le taux de piqûres et le taux d'infection plus élevés, à cause d'une longévité et d'un taux d'anthropophilie supérieurs chez cette espèce. C'est l'espèce qui assure la continuité de la transmission toute l'année à Dielmo, et donc le maintien de l'immunité chez l'homme, profil de transmission en cela très proche de celui de Tibati, au Cameroun, où *An. funestus* est également présent toute l'année (données F. Simard, UR016 IRD, non montrées).

Une étude menée par Czeher et al. (2006) appuie cette hypothèse d'une longévité et d'une anthropophilie supérieures chez *An. funestus*. Leur analyse de la sporogonie tardive chez *An. gambiae* et *An. funestus* naturellement infectés au Niger montre que les prévalences des stades oocyste tardif et sporozoïte sont similaires entre les deux espèces, ce qui indique

que la transition entre les stades oocyste tardif et sporozoïte est comparable dans les populations testées, et confirme que l'essentiel du contrôle de l'infection se joue aux stades antérieurs. Les auteurs soulignent la grande variabilité des indices mesurés pour *An. gambiae* s.l. au cours de l'échantillonnage, corrélée aux variations climatiques, et mettent en évidence l'effet du ratio *An. arabiensis*/*An. gambiae* s.s dans la composition de la population vectrice. Les indices sont en revanche stables pour *An. funestus*, dont le comportement très anthropophile et endophile le protège selon les auteurs des aléas du climat (abri au sein des maisons) et augmente ainsi sa capacité vectorielle. *An. gambiae* s.s. tend à se comporter de la même façon que *An. funestus*, mais cette espèce est surtout prévalente en saison des pluies, où l'indice oocystique augmente drastiquement.

La deuxième composante qui peut expliquer un taux d'infection différentiel entre espèces vectrices, essentielle pour déterminer la capacité vectrice d'un anophèle, est en effet celle du comportement. Le comportement trophique d'un vecteur détermine la fréquence des contacts homme-vecteur, et ainsi la probabilité d'acquérir ou de transmettre le parasite à l'homme (cf. Intro. biblio.). La fréquence des piqûres telle qu'elle est déterminée par la biologie « normale » du vecteur, est gouvernée par le cycle gonotrophique (du repas de sang à l'oviposition), avec une prise de repas de sang normalement une fois par cycle (concordance gonotrophique). Tout écart à ce comportement régulier (i.e. discordance gonotrophique, où le vecteur se sera nourri plus d'une fois au cours du même cycle) augmente la probabilité de transmettre son parasite à un hôte ou de s'y infecter. Ainsi, le type d'hôte choisi pour effectuer la prise de repas de sang (anthropophilie ou non), la fréquence des piqûres au cours d'un cycle gonotrophique (concordance ou discordance gonotrophiques), l'importance relative de l'apport en jus sucré par rapport au sang, etc., seront autant de facteurs déterminants pour la fréquence des contacts homme-vecteur.

De nombreuses études ont montré que les piqûres interrompues (changement d'hôte au cours du repas de sang) ou multiples (plusieurs repas de sang par cycle gonotrophique) sont fréquentes dans les populations naturelles de vecteurs. Lemasson et al. (1997) au Sénégal ont montré que 18% des repas sanguins de *An. gambiae* y sont constitués d'un mélange de sang humain et bovin. La proportion est en fait sous-estimée, car la méthode utilisée par les auteurs ne leur permet pas de discriminer les repas pris sur un même hôte vertébré. Une étude compare les profils ADN des repas sanguins de *An. gambiae* et *An. funestus* avec ceux des hommes ayant dormi dans les cases où les vecteurs ont été capturés au matin et rapporte l'observation d'une part importante de repas multiples (Scott et al. 2006). Les auteurs ont ainsi montré que 14% (*An. funestus*) et 11% (*An. gambiae*) des anophèles capturés dans les

cases au matin s'étaient nourris pendant la nuit sur les habitants de la case, la dispersion étant très limitée entre cases une fois le repas de sang pris. Cette étude a également mis en évidence une très forte hétérogénéité inter-homme dans la distribution des piqûres d'anophèles par case au Kenya, certaines personnes concentrant la grande majorité des repas sanguins pris par les différents moustiques présents au matin dans la case (avec toutes les conséquences envisageables sur la diversité génétique des gamétocytes recrutés) (Scott et al. 2006).

Des études ont également été menées sur le régime trophique des populations naturelles de vecteurs, et notamment sur l'importance du repas de jus sucré pour les femelles anophèles (Straif & Beier 1996; Beier 1996). En effet, il a été montré chez d'autres genres de moustiques (*Aedes*) que ces espèces pouvaient se passer de nectar si elles étaient suffisamment alimentées en sang, le sang contenant tous les nutriments nécessaires à leur développement. Chez *An. gambiae*, ces études ont démontré la capacité des populations naturelles à se passer de nectar dans la mesure où elles étaient alimentées suffisamment fréquemment en sang humain. Beier (1996) dans une étude menée sur les populations naturelles de *An. gambiae* et *An. funestus* au Kenya, montre comment ces deux espèces très anthropophiles ont développé un comportement de prises répétées de repas sanguins à l'intérieur des maisons, où les conditions de température et d'humidité sont stables, de façon à limiter au maximum les sorties à l'extérieur, dangereuses et coûteuses en énergie, surtout pendant la saison sèche. Les anophèles prendraient ainsi plusieurs repas de sang au cours d'un même cycle gonotrophique sur les habitants de la maison, et parmi eux, sur les personnes les plus attirantes (Scott et al. 2006), pour remplacer le jus sucré. La dispersion très limitée de ces anophèles, conséquence de leur comportement fortement anthropophile, aurait comme conséquence principale la limitation de la diversité des parasites recrutés par les femelles de telles espèces.

McCall & Kelly (2002) ont d'autre part montré que les anophèles, comme d'autres insectes, ont pu développer une « mémoire de site », et reviennent vers la case où ils ont piqué la première fois, gardant en mémoire le trajet de la case au lieu de ponte. Les lieux de ponte stables et localisés de l'espèce *An. funestus*, pourraient favoriser un tel comportement à l'échelle du site de transmission, contrairement à l'espèce *An. gambiae* s.s., dont les gîtes multiples et dispersés en saison des pluies (flaques d'eau) favoriseraient une plus grande dispersion entre case dans le village. Ce patron de dispersion des différentes espèces à l'échelle du site correspond à celui que nous avons observé à Tibati (Résultats, Par. 3.1.2). Cette hypothèse serait corroborée par la mesure des taux de dispersion relatifs des deux espèces à l'échelle d'un village au Kenya par marquage-recapture, qui montre une dispersion

significativement plus faible pour *An. funestus* par rapport à *An. gambiae* (Takken & Knols 1999).

La littérature mentionne une anthropophilie très affirmée pour *An. funestus* (Gillies & De Meillon 1968). Molineaux & Gramiccia (1980) ont montré comment l'impact des pulvérisations intra-domiciliaires entreprises dans les années 1950-60 pour éradiquer le paludisme se sont révélées particulièrement efficaces dans les zones où la transmission était majoritairement assurée par le vecteur *An. funestus* très endophile. En revanche, dans les zones infestées de vecteurs plus exophiles, comme *An. nili*, *An. moucheti*, ou *An. arabiensis*, ces traitements n'ont pas permis de réduire significativement la transmission.

Dans la zone forestière périurbaine dégradée de la banlieue de Yaoundé, où se trouve le village de Simbock, des différences significatives de comportement entre les quatre vecteurs ont été mis en évidence par notre étude et celle d'Antonio-Nkondjio et al. (2002), avec un comportement anthropophile plus affirmé pour *An. funestus* que pour les autres espèces (la proportions de femelles ayant piqué à l'intérieur est plus élevée chez cette espèce). Ces différences ont également été mises en évidence en zones de savane (Costantini et al. 1999; Fontenille et al. 1997; Lemasson et al. 1997), mais pas sur les hauts-plateaux d'Afrique de l'Est (Beier 1998).

Ces composantes du comportement, très variables entre les quatre vecteurs équatoriaux, peuvent donc avoir des conséquences non seulement sur la fréquence des contacts homme-vecteur, et donc sur leurs probabilités d'infection respectives, mais également des conséquences épidémiologiquement très importantes sur les patrons du recrutement de la diversité parasitaire par ces différents vecteurs au sein des foyers de transmission palustre.

1.2 Distribution de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme

La multiplicité des infections du parasite *P. falciparum* chez l'homme a été analysée à Simbock en 2003 et 2004 et à Tibati en 2003, conjointement à la diversité des populations parasitaires échantillonnées chez le vecteur dans les mêmes cases au même moment. L'avènement des techniques de biologie moléculaire a initié un très grand nombre d'études menées sur les stades sanguins du parasite, sexués et asexués, pour élucider l'épidémiologie moléculaire de *P. falciparum* chez son hôte humain. Plusieurs facteurs revus en Introduction (Partie 1) influencent la complexité de l'infection chez l'homme, leur effet variant avec l'intensité de la transmission : la diversité des génotypes parasitaires varie en effet avec l'âge et le statut immun de l'hôte (ces deux facteurs étant corrélés dans les zones de forte transmission), le type d'hémoglobine, etc.

Nous avons échantillonné les individus vivant dans les cases dans lesquelles les captures de moustiques ont été effectuées dans les deux sites au Cameroun. Les échantillons sanguins ont été génotypés pour les sept marqueurs microsatellites utilisés pour le génotypage des stades oocystes chez les vecteurs infectés capturés dans ces mêmes cases. Les proportions d'individus porteurs d'infection multiples sont très élevées à Simbock et à Tibati (Article 3), et le nombre de génotypes parasitaires différents observés par individu est négativement corrélé à l'âge dans les deux sites, comme c'est le cas dans les zones de forte transmission (Konaté et al. 1999; Arnot et al. 1998; Smith et al. 1999). Un tel effet de l'âge sur la complexité de l'infection à *P. falciparum* est un phénomène déjà bien décrit dans les zones de transmission intense, où la fréquence élevée des piqûres infectées reçues par les hommes dès le plus jeune âge crée une immunité protectrice en fonction de l'âge : les adultes sont capables de réguler le nombre de clones, les enfants étant capables de réguler l'intensité de l'infection mais pas encore la multiplicité (Mercereau-Puijalon 1999).

Bogreau et al. (2006) ont d'autre part analysé avec des marqueurs microsatellites, dont plusieurs communs aux nôtres, la diversité des infections parasitaires à *P. falciparum* chez les habitants de sites ruraux et urbains, et constaté que les sites urbains se diversifiaient avec l'apport de nouveaux génotypes à partir des sites ruraux. Les diversités sont homogènes entre sites dans notre étude, ce résultat étant en accord avec l'importance de la mobilité humaine entre les deux villages camerounais.

2 Structuration génétique de *P. falciparum* en zone endémique africaine

2.1 Régime de reproduction et structure haplotypique de *P. falciparum*

2.1.1 Les études du déséquilibre de liaison

Plusieurs des inconvénients de l'analyse du DL énumérés plus hauts concernant l'échantillonnage des isolats africains se retrouvent dans l'étude d'Anderson et al. (2000b):

- (i) Ouganda : les échantillons ont été récupérés dans une clinique sur des patients infectés par le HIV (possibilités d'interactions HIV-*Plasmodium*) ;
- (ii) RDC : dans une clinique, sur des femmes enceintes (là encore, statut immunologique particulier) ;
- (iii) Zimbabwe : patients symptomatiques visitant une clinique ;
- (iv) Les autres échantillons sont issus de patients de cliniques également sauf pour la PNG.

Cependant, si l'on examine de plus près les résultats obtenus à partir des échantillons : 6 populations sur 9 étaient en déséquilibre de liaison, ces populations provenant des 3 sites d'Amérique du Sud et d'un site Asiatique, ainsi que d'un site en PNG et d'un site africain au Zimbabwe. Un DL significatif a été trouvé pour toutes les zones de faible transmission, où il était dû à la présence de génotypes multilocus répétés : 27 génotypes multilocus étaient répétés en tout dans leur échantillonnage, ces génotypes étant plus couramment observés dans les zones de faible transmission, mais également présents en zones de forte transmission (PNG et Zimbabwe). En ne considérant que les génotypes uniques, le DL était conservé pour le Bolivie et le Zimbabwe uniquement.

Maynard Smith (1993) en analysant la structure des populations de pathogènes fait la différence entre les organismes clonaux comme *Salmonella* et *Escherichia coli*, où les niveaux de recombinaison sont insuffisants pour casser les lignées clonales, et la structure de population de type « épidémique » des organismes tel *Neisseria meningitidis*, où le DL résulte de l'expansion temporelle de clones particuliers dans une population à reproduction sexuée. Les structures de population de type épidémiques peuvent être détectées en retirant du jeu de données les génotypes répétés, et en recalculant le DL sur les génotypes uniques. Cette procédure a restauré l'équilibre génétique dans 4 des 6 populations analysées par Anderson et al. (2000b), excepté la Bolivie et le Zimbabwe.

Anderson et al. (2000b) comparent deux indicateurs de l'intensité de la transmission, la prévalence et la proportion des infections contenant des clones multiples, avec l'index d'association I^A_s , qui mesure l'intensité du DL. Ces indices sont en corrélation positive, mais les auteurs restent prudents, ce paramètre n'étant pas directement comparable entre populations quand N_e varie (Hudson 1994 cité par les auteurs).

Les auteurs en déduisent donc que la structure des populations de *P. falciparum* varie de « épidémique en zone de faible transmission à panmictique en zone de forte transmission ». Pour la Bolivie, les auteurs invoquent l'effet Wahlund : la forte structuration qui existe à faible échelle géographique sur ce continent, pourrait expliquer que leur échantillonnage soit en fait constitué de deux populations distinctes. En revanche, l'échantillon du Zimbabwe semble être constitué de façon homogène (deux populations homogènes entre elles, et de plus chacune avec un DL significatif, même quand les génotypes répétés sont retirés). Ce résultat semble mettre en doute la structure des populations comme étant corrélée à l'intensité de transmission, car comment interpréter ce DL conservé du Zimbabwe ?

Les DL significatifs que nous avons mesurés dans les populations d'oocystes échantillonnées dans les deux vecteurs majeurs communs à trois sites de forte transmission en

Afrique témoignent d'une structure des populations de *P. falciparum* en accord avec le résultat d'Anderson et al. (2000b) au Zimbabwe. Même dans les zones de forte transmission, lorsque les populations de parasites sont suffisamment diversifiées pour permettre « un choix » entre des gamétocytes de génotypes distincts ou identiques pour la fécondation au sein du moustique, divers mécanismes interviennent pour favoriser une proportion suffisamment importante d'autofécondation pour générer les DL significatifs observés au sein des populations naturelles de *P. falciparum*.

2.1.2 Quel est le lien entre la multiplicité clonale, la fréquence de l'autofécondation et l'intensité de la transmission ?

Le lien établi entre intensité de la transmission et multiplicité clonale, qui justifie la corrélation établie entre intensité de la transmission et structure des populations de *P. falciparum* est il aussi direct que cela ? Plusieurs études ont montré que même dans des zones de transmission très faible (moins de 1 piqûre infectante/homme/an), la diversité clonale au sein des hommes pouvait être élevée. Paul et al. (1998) sur la frontière thaï-birmane, où la transmission est basse, ont observé une multiplicité clonale supérieure ou égale à deux. D'autres études ont montré que la richesse clonale d'un inoculum unique de moustique pouvait être très élevée (Druilhe et al. 1998). Les nombreuses études menées sur les isolats sanguins dans le temps montrent d'autre part que la richesse clonale d'une infection est sans doute beaucoup plus élevée que ce que les prélèvements uniques au bout du doigt laissent penser (voir l'Intro. biblio. Partie 1, Par. 2 pour tous ces aspects). D'autre part, les études sur la persistance dans le temps des gamétocytes, les mécanismes de compétition/facilitation qui ont lieu entre gamétocytes distincts génétiquement pour augmenter cette persistance (Nassir et al. 2005), la régulation du sex-ratio des souches de *P. falciparum*, l'agrégation éventuelle des gamétocytes dans le sang (Gaillard et al. 2003), etc., constituent autant de mécanismes qui vont influencer pour faire de la transmission des stades gamétocytes vers les moustiques un événement non-aléatoire, y compris dans les zones de forte transmission. Dans ce contexte, le lien direct établi entre le portage de clones multiples et l'autofécondation (F), i.e. la linéarité de la relation entre richesse clonale, intensité de la transmission et panmixie de *P. falciparum* méritent d'être nuancés, la situation étant loin d'être claire pour les zones de forte transmission (Anderson 2004).

2.1.3 L'apport des approches génomiques pour l'étude de la structure haplotypique de *P. falciparum*

L'étude du DL dans le cadre des approches de génétique des populations menées avec un nombre limité de marqueurs revient en fait à détecter sa présence ou son absence, mais ne permet pas de quantifier le taux de recombinaison ni l'étendue du DL le long du génome. Les approches de séquençage « haut-débit », par l'énorme quantité de marqueurs criblés, ont permis de quantifier ces paramètres à partir d'un petit nombre d'isolats du monde entier.

Le criblage du génome de *P. falciparum* a été réalisé avec différents types de marqueurs (microsatellites, SNPs) criblant d'abord un chromosome (Mu et al. 2005 ; Mu et al. 2002 ; Wootton et al. 2002), puis le génome entier (Mu et al. 2007 ; Volkman et al. 2007). Ces études permettent de localiser les zones de variabilité différentielle, et de mettre ainsi en évidence les régions soumises aux pressions de sélection, susceptibles de jouer un rôle dans les interactions du parasite avec ses deux environnements hôtes et d'être impliquées dans des phénotypes de résistance aux agents antiparasitaires (drogues, vaccins). Elles permettent également de retracer l'histoire évolutive et les événements démographiques de ce parasite. Récemment, plusieurs études ont utilisé les avancées génomiques et précisé la structure de la diversité du parasite à l'échelle de son génome en fonction des contextes de la transmission (Barry et al. 2007 ; Kidgell et al. 2006 ; Mu et al. 2007 ; Volkman et al. 2007).

Ces études menées à l'échelle du génome entier ont montré comment la diversité et l'étendue du DL variaient en fonction des régions du génome et de la fonction des séquences génomiques. (Volkman et al. 2007) ont effectué un séquençage partiel du génome de 16 isolats d'origines géographiques diverses et un séquençage ciblé de 54 isolats additionnels. Les résultats de l'étude de la structure des populations, menée à partir du génotypage de 372 SNPs de 20 régions génomiques sur 54 isolats du monde entier (26 africains, 24 asiatiques, et 4 sud-américains, isolats de culture ou prélèvements directs sur individus infectés) montrent classiquement un DL affectant de courtes régions du génome en Afrique, et des régions plus longues en Asie. Comme montré précédemment avec l'utilisation d'une poignée de marqueurs microsatellites (Anderson et al. 2000b), les populations parasitaires de continents différents varient dans les fréquences alléliques et dans l'étendue du DL.

Le déséquilibre de liaison chez *P. falciparum* concerne donc des séquences de longueur variable dans le génome, suivant : (i) la localisation dans le génome : des régions en déséquilibre de liaison sur une grande étendue sont en fait soumises à une sélection naturelle positive (*selective sweep*), sur un arrière-plan de régions où les marqueurs sont en déséquilibres de liaison sur de plus courtes distances ; existence de zones où les événements

de recombinaison sont très fréquents (*recombination hotspots* télomériques et centraux, Mu 2005) ; (ii) la longueur du déséquilibre de liaison d'arrière-plan dépendrait elle-même du régime de reproduction du parasite, qui est fonction de la localisation géographique des isolats, c'est à dire, ultimement, du contexte de la transmission palustre et de la multiplicité des infections.

2.1.4 Impact épidémiologique de la structure des populations naturelles du parasite

Les conséquences d'un DL fort et d'un taux élevé de recombinaison sont importantes pour de nombreux aspects de la biologie de *P. falciparum*. Le taux auquel la recombinaison casse les associations entre gènes peut influencer la persistance des génotypes clonaux (Hastings & Watkins 2006 ; Paul et al. 1995), la persistance des « souches » distinctes antigéniquement (Grenfell et al. 2004 ; Gupta & Day 1994), et la vitesse de propagation de la résistance aux médicaments (Hastings 2006).

La forte variabilité et les DL courts observés chez *P. falciparum* en Afrique ne favorisent pas à première vue les stratégies de cartographie du génome et l'utilisation du DL dans les études d'association pour localiser des gènes d'intérêts, comme ceux de la résistance aux médicaments ou impliqués dans la virulence (le principe étant que les marqueurs ségrégent avec le gène d'intérêt si la recombinaison n'a pas eu lieu, permettant de cibler la zone où chercher le locus d'intérêt ; la carte doit être d'autant plus résolutive que le taux de recombinaison est fort, ou que le DL est court).

L'impact de l'intensité de la sélection et de l'autofécondation sur l'étendue du balayage sélectif (*selective sweep*) a été revu (Anderson 2004). En Afrique, le taux s de la sélection imposée par la pression médicamenteuse est estimé faible. Comme le taux effectif de recombinaison y est estimé fort, la trace du balayage sélectif ne sera donc pas très visible. Mais il faut compter avec le fait que la diversité génétique d'arrière plan est très forte, et donc un événement de sélection entraînant un balayage sélectif a plus de chance d'être détecté que dans une population où la diversité est déjà faible. D'autre part, des signatures de balayages sélectifs partiels peuvent être découvertes grâce aux allèles qui montrent un grand DL dans un arrière plan de DL courts (comme ce serait le cas pour l'Afrique). Le signal du DL est donc utile pour la détection des allèles sélectionnés récents, mais pour les autres, les études d'associations d'allèles avec des phénotypes particuliers sont plus indiquées.

2.2 Différentiation géographique entre sous-populations

2.2.1 Etudes de la diversité neutre

En plus de l'autofécondation des individus au sein d'une population locale, mesurée par le F_{IS} , un autre type de consanguinité provient de l'isolement géographique et de la migration limitée entre les sous-populations de parasites. Par rapport à une situation où les sous-populations sont en panmixie, l'isolement géographique entraîne une réduction de l'hétérozygotie moyenne et du taux effectif de recombinaison. Ce déficit dû à la structuration géographique est mesuré par un autre type de coefficient de consanguinité, le F_{ST} (voir Intro. biblio., Partie 2, Par. 1.1.3).

Les études menées à l'échelle régionale avec de nombreux marqueurs ont contribué à la clarification de la structure des populations de *P. falciparum* (Anderson et al. 2000b ; Bogreau et al. 2006 ; Mu et al. 2005 ; Volkman et al. 2007). Dans les régions de faible intensité de transmission, comme l'Amérique du Sud, où moins de 20% des patients infectés sont porteurs de multi-infections (génotypes multiples), le taux d'autofécondation au sein des populations est élevé et la différenciation géographique est significative entre les sous populations ($F_{ST} = 0,3-0,4$) (Anderson et al. 2000b ; Urdaneta et al. 2001). Dans les régions de forte intensité de transmission, comme l'Afrique centrale, où plus de 65% des patients sont multi-infectés, le F_{ST} est plus faible et on n'observe pas de différenciation géographique entre les sous-populations ($F_{ST} = 0,003-0,012$).

La variabilité génétique est également plus élevée en Afrique que sur les autres continents. L'hétérozygotie attendue (i.e. la fréquence des génotypes hétérozygotes qui seraient obtenues dans une population panmictique, étant données les fréquences alléliques observées dans un échantillon d'individus haploïdes) est 0,76-0,80 dans les échantillons africains, 0,51-0,65 dans les échantillons d'Asie du Sud-Est et du Pacifique, et 0,30-0,40 en Amérique du Sud. Une forte structuration géographique des parasites en fonction de leur origine géographique est observée, à partir d'une analyse par assignation (*clusters*) ou par une mesure de F_{ST} classiques (0,1-0,4) entre parasites de continents différents (Mu et al. 2005).

La diversité génétique est donc distribuée différemment dans les zones de forte transmission par rapport aux zones de transmission plus faible : en Afrique, la diversité est distribuée au niveau local, au sein des sous-populations, et très peu régionalement entre sous-populations géographiquement séparées, patron que nous observons dans notre étude (Article 1, 2 et 3). En Amérique du Sud, c'est l'inverse, il y a très peu de diversité locale, et toute la diversité est structurée entre les sous-populations, au niveau régional. En Asie du Sud-Est, le patron de structuration de la diversité des populations parasitaires est intermédiaire.

D'autres études ont été menées entre localités géographiques distantes en Afrique à l'aide des mêmes marqueurs microsatellites neutres : au Soudan, Abdel-Muhsin et al. (2003) mesurent un $F_{ST} = 0,11$ supérieur à ceux estimés par Anderson et al. (2000b) entre des villages ruraux et un site urbain. Bogreau et al. (2006) mesure la structure locale et continentale de populations de *P. falciparum* entre 4 sites africains : Djibouti, Dakar et Niamey et Danané en Côte d'Ivoire. Les stades sanguins ($N = 240$) sont génotypés pour 22 microsatellites dont ceux qui ont été utilisés par Anderson et al. (2000b). La diversité mesurée varie de 0,53 à 0,76. Les populations sont clairement structurées à l'échelle continentale (la population de Djibouti diffère fortement des 3 autres populations, $F_{ST} = 0,189-0,246$). La différenciation entre le site rural ivoirien et les deux sites urbains Dakar et Niamey est intermédiaire ($F_{ST} = 0,084-0,105$), et elle est inexistante entre Dakar et Niamey ($F_{ST} = 0,026$), reliés par la route. En utilisant uniquement le sous-groupe de microsatellites utilisés par Anderson et al. (2000b), les auteurs obtiennent un F_{ST} de 0,193 au niveau continental (Djibouti *versus* Afrique de l'Ouest), et concluent donc à une structuration évidente du parasite au niveau continental. Ces résultats montrent donc une structure des populations plus importante que celle observée à ce jour à partir de marqueurs microsatellites chez *P. falciparum*.

2.2.2 Etudes de la diversité sélectionnée

Barry et al. (2007) ont analysé la diversité géographique sélectionnée du parasite en utilisant comme marqueur une séquence de 500 pb du domaine DBL α (*Duffy Binding Like α*) du gène *var* aux échelles globale (59 isolats d'origines géographiques diverses), et locale (30 isolats de la province Madang, PNG). L'analyse des 8000 séquences obtenues a permis d'isoler 895 types de séquences DBL α et montre une très forte diversité des gènes *var* au niveau global : à ce niveau, la diversité est tellement immense que les 1000 séquences analysées étaient insuffisantes pour en caractériser l'ampleur ; au niveau local au contraire, la majorité de la diversité du gène *var* a été échantillonnée (185 types DBL α), et montre la présence de types de gènes *var* spécifiques majoritaires présents à haute fréquence au sein du site. Malgré les différences de diversité aux niveaux local et global, qui pointent vers une structuration géographique forte, 40% des types présents en PNG sont partagés à l'échelle globale, ce qui indique aussi une distribution cosmopolite de la diversité. Les types majoritaires présents localement en PNG sont interprétés comme la conséquence possible de balayages sélectifs dans une partie du génome, ayant mené à leur fixation locale. Les auteurs invoquent également des événements démographiques (goulots d'étranglements, taille efficace réduite) ainsi qu'une structure clonale de *P. falciparum* (avec une faible proportion

d'infections multiples chez les hommes) pour expliquer la réduction du répertoire de diversité du gène *var* dans cette région. Ces résultats peuvent être rapprochés des résultats obtenus par Takala et al. (2007) qui ont montré également l'existence d'haplotypes majoritaires du gène *msp-1*, circulants dans les infections humaines au niveau local au Mali (40% des infections).

2.2.3 Conclusion pour la structure des populations africaines de *P. falciparum*

Le consensus à propos du régime de reproduction et de la structure des populations de *P. falciparum* met en avant l'impact du contexte de la transmission. Le parasite dans les zones de forte transmission dispose d'une plus grande opportunité pour effectuer des croisements impliquant des gamètes génétiquement distincts, comme en témoignent les différences de taille de l'haplotype en DL observées selon l'origine géographique des isolats. Cependant, l'étude des processus évolutifs (reproduction, migration) en fonction des caractéristiques des populations naturelles du parasite n'a pas été suffisamment menée à l'échelle locale, et notamment à l'échelle de l'individu-hôte, homme ou vecteur, et aux échelles supérieures qui structurent les populations humaines et vectrices.

Dans les zones de faible transmission, la diversité est faible, les infections sont majoritairement monoclonales, et la transmission est épidémique. Les déséquilibres de liaison mesurés dans ces zones témoignent de faibles taux de recombinaison, avec de forts DL observés entre locus sur de longues distances. La diversité est faible et structurée majoritairement entre les sous-populations. Dans les zones de forte transmission, les DL sont courts, la diversité est forte et structurée au sein des sites et peu entre sites (Anderson et al. 2000b ; Mu et al. 2005 ; Kidgell et al. 2006 ; Volkman et al. 2007).

En fonction de la méthode utilisée (mesure directe des F_{IS} , mesure des sex-ratios du parasite, ou mesure du DL sur les stades sanguins du parasite), et en fonction des marqueurs utilisés, neutres (microsatellites, SNPs), ou sélectionnés (MSP-1 et 2, séquences de gènes), les taux d'autofécondation estimés sont variables mais indiquent tous une proportion significative de reproduction par autofécondation y compris dans les zones de forte transmission. Les mesures de la différenciation géographique sont plus contrastées (Anderson et al. 2000b : homogénéité des sous-populations, versus Mu et al. 2005 ; Bogreau et al. 2006 ; Barry et al. 2007 : forte structurations des sous-populations).

Les nouvelles méthodes d'analyse à l'échelle du génome entier ont permis de préciser la structure haplotypique du parasite et la distribution de la diversité à l'échelle du génome, et ont confirmé l'impact de l'origine géographique des isolats, c'est-à-dire de l'intensité de la transmission, sur ces patrons : (i) la structure haplotypique du génome du parasite est plus courte en Afrique que sur les autres continents ; dans le même temps (ii) la variabilité du

parasite est structurée à l'échelle de son génome, avec des variations importantes en fonction de la localisation et de la fonction des séquences. Ces travaux sont précieux pour le choix de marqueurs appropriés de la diversité génétique du parasite pour de futures études de génomique des populations aux échelles locales, régionales, et continentales sur un grand nombre de parasites chez ses deux hôtes humain et vecteur dans une variété de contextes éco-épidémiologiques.

2.3 Impact de l'espèce anophèle vecteur sur la structuration génétique de *P. falciparum*

2.3.1 Le rôle des vecteurs majeurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus*

- **Régime de reproduction autofécondant du parasite chez ses deux vecteurs majeurs en zone endémique africaine :**

Une première publication avait montré la présence de déficits en hétérozygotes significatifs au sein des infrapopulations d'oocystes d'*An. gambiae* s.s. en Afrique, en zone de forte transmission au Kenya, au bord du Lac Victoria (Razakandrainibe et al. 2005). Ainsi le parasite *P. falciparum*, y compris en zone de forte endémicité, semblait capable de privilégier de façon significative une stratégie de reproduction par autofécondation. Les forts déséquilibres de liaison observés renforçaient encore l'hypothèse d'une faible mixité globale des gamètes au sein de la population vectorielle du parasite.

Les résultats que nous avons obtenus corroborent cette hypothèse à l'échelle du continent africain chez *Anopheles gambiae* s.s., et la confirme au sein de l'autre espèce vectrice majeure en Afrique, *Anopheles funestus*. Nous avons échantillonné à l'échelle locale les parasites des deux vecteurs africains majeurs *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* dans trois villages africains tous situés dans des zones de forte endémicité palustre où plus de 80% de la population est infectée à *P. falciparum* (Article 3), les taux d'inoculation entomologiques atteignant jusqu'à 300 piqûres infectées par homme par an à Simbock. Dans un tel contexte, l'analyse des stades diploïdes oocystes de *P. falciparum* au sein des moustiques permet un accès direct à l'estimation des proportions en hétérozygotes.

Chez les deux vecteurs dans les trois sites africains, le déficit en hétérozygotes moyen global de la population parasitaire était élevé (0,53), une grande partie du déficit étant distribuée entre les infrapopulations d'oocystes (les F_{ST} inter-moustiques sont très élevés, Figure 12b), le reste étant distribué entre les individus oocystes au sein des infrapopulations. Le déficit en hétérozygote observé au sein des infrapopulations chez les deux espèces vectrices était de 0,18 pour *An. gambiae* et 0,23 pour *An. funestus*, avec une variation inter-

site significative. Ce déficit témoigne d'une stratégie d'autofécondation potentiellement sélectionnée par les deux populations vectrices dans les trois sites africains échantillonnés.

De plus, il est intéressant de noter la différence significative dans les F_{IS} entre les deux espèces : les déficits en hétérozygotes observés chez *An. funestus* sont significativement supérieurs à ceux de *An. gambiae*. Un résultat semblable a été également observé par Babiker et al. (1994) en Tanzanie (ces résultats n'ont pas été publiés par les auteurs, mais sont cités par Billingsley & Sinden 1997). Le rôle joué par le comportement de recrutement particulier de cette espèce d'anophèle (très endophile et très anthropophile, avec moins de dispersion à l'échelle du site, voir la Discussion générale, Par.1.1) est intéressant à mettre en rapport avec ce résultat (Beier 1996 ; Scott et al. 2006 ; Straif & Beier 1996). Cependant, les richesses alléliques moyennes des infrapopulations de ce vecteur ne différaient pas significativement de celles d'*An. gambiae* (voir les Articles 1 et 2 pour Simbock).

▪ **Le portage parasitaire des deux vecteurs majeurs :**

Aucune différence significative dans le portage parasitaire des deux espèces vectrices majeures africaines, *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* n'a été mise en évidence dans notre étude. Alors que ces deux vecteurs semblent différer dans leur capacité vectorielle au moins pour le stade oocyste du parasite (Discussion générale, Par.1.1), et que leurs comportements et biologie sont très différents, avec un impact potentiel sur le recrutement des populations de parasite, les populations transmises étaient génétiquement homogènes pour les populations échantillonnées dans notre étude.

2.3.2 Structuration génétique du parasite en zone de forêt : le rôle des espèces

An. nili et *An. moucheti*

▪ **Régime de reproduction autofécondant du parasite chez les deux vecteurs locaux de la zone endémique équatoriale africaine :**

Les déficits en hétérozygotes observés au sein des populations de *P. falciparum* échantillonnées chez *An. moucheti* n'étaient pas significatifs si les génotypes répétés étaient inclus dans le jeu de données, mais le devenaient s'ils en étaient retirés (ceci étant dû à la présence de génotypes répétés hétérozygotes à tous les locus, issus de la fécondation entre haplotypes génétiquement distincts, et produisant donc des $F_{IS} = -1$, négatifs, voir les Résultats complémentaires, Par.3.2.). Les déficits en hétérozygotes observés chez *An. nili* étaient significatifs. Les effectifs étant cependant beaucoup plus faibles pour ces deux espèces

(Tableau 1 de l'Article 2), il convient de mettre en avant l'effet de l'échantillonnage sur ces résultats. Néanmoins, certaines spécificités dans les capacités vectorielles des différentes espèces vectrices à Simbock peuvent être soulignées.

Les facteurs comportementaux concourent pour limiter la diversité parasitaire des repas sanguins pris par les populations naturelles d'anophèles *An. funestus* ayant développé un comportement très anthropophile dans le milieu particulier de la forêt équatorial dégradée, c'est à dire essentiellement : d'une part une dispersion potentiellement limitée entre cases, due à une potentielle « mémoire du site » d'un gîte stable par rapport à la case d'une part, mais aussi due à la stabilité du milieu de la case et à la possibilité d'y substituer le repas sanguin au nectar ; d'autre part une forte hétérogénéité entre hommes pour l'attrance vis-à-vis des femelles anophèles, certains hommes concentrant l'essentiel des piqûres (Scott et al. 2006). Si les repas répétés sont fréquents mais pris sur les mêmes hommes, la diversité génétique de la population de parasite du moustique n'en sera pas augmentée significativement.

A l'inverse, les populations moins anthropophiles, comme *An. nili* et *An. moucheti*, pourront avoir une capacité de dispersion plus grande, étant moins inféodée à la case de prise de repas de sanguin, ou préférant prendre le repas sanguin à l'extérieur. La dispersion entre cases pour ces espèces pourrait donc être supérieure à celle de l'espèce la plus endophile *An. funestus*, et ainsi contribuer à une diversité accrue des parasites recrutés par *An. nili* et *An. moucheti* par rapport aux deux vecteurs principaux.

Les conséquences du recrutement réduit des parasites seraient plus visibles chez *An. funestus*, espèce la plus endophile à Simbock. Ayant recruté ses parasites sur les mêmes hommes, la probabilité de recruter des gamétocytes issus de lignées clonales identiques est plus forte (même si plus de 77% des individus à Simbock sont porteurs d'infections multiples). A l'inverse, le recrutement plus diversifié d'*An. moucheti* favoriserait les possibilités d'allofécondation entre gamétocytes issus de souches clonales sanguines génétiquement distinctes. Les effectifs échantillonnés n'ont cependant pas permis de mettre en évidence de différence significative dans la richesse allélique des infrapopulations parasitaires recrutées par les quatre espèces vectrices à Simbock.

Il convient également de différencier la nature des infections multiples : dans une infection multiple par portage chronique de souches à bas niveau, les gamétocytes sont présents en faible quantité, et toutes les souches sont peut-être présentes aux même taux de multiplication, d'où égalité dans le taux de développement des différentes souches. Dans un tel contexte, la théorie évolutive du sex-ratio chez les *Plasmodium* prédit un sex-ratio plus équilibré en faveur des mâles, pour optimiser le succès de la transmission, ce qui ne favorise pas l'autofécondation. Mais dans un contexte d'infections multiples enfantines, c'est peut être

différent : les différentes souches se multiplient à des densités asexuées plus élevées, avec souvent un ou quelques haplotypes majoritaires (Takala et al. 2007), donc la probabilité d'autofécondation est plus élevée. En PNG, où les taux de multiplicité de l'infection chez les enfants sont élevés (Bruce et al. 2000), le sex-ratio mesuré est néanmoins fortement biaisé en faveur des femelles (0,18), ce qui est en accord avec 64% à 100% des oocystes produits de la fécondation entre gamètes mâles et femelles frères-sœurs (Read et al. 1992). La tranche d'âge qui contribue le plus au réservoir de gamétocytes pour les vecteurs dans les zones de transmission intense a donc un impact (si c'est celle des enfants en bas âge, avec une probabilité élevée d'autofécondation ; ou les enfants de 5 à 15 ans ; ou si ce sont les adultes porteurs d'infections chroniques).

▪ **Le portage parasitaire des vecteurs locaux :**

L'analyse canonique par correspondance pour l'évaluation de l'impact du facteur espèce anophèle vectrice sur la distribution de la variabilité génétique échantillonnée les trois années à Simbock met en évidence un impact significatif de l'hôte vecteur dû à l'espèce *An. moucheti*. Là encore, il convient de souligner l'effet possible du hasard de l'échantillonnage sur cette distribution différentielle, mais les histoires coévolutives potentiellement distinctes du système *An. moucheti/P. falciparum* (*An. moucheti* étant « le » vecteur de la forêt équatoriale) et des autres systèmes plus récents *An. gambiae* s.s./*P. falciparum* et *An. funestus/P. falciparum* (Coluzzi 1999 ; Hume et al. 2003), ainsi que les différences de comportement et de capacités vectorielles entre ces quatre vecteurs sont en faveur d'une étude plus approfondie (infections expérimentales) pour l'évaluation de l'impact de l'espèce *An. moucheti* sur la transmission de *P. falciparum* en région équatoriale.

2.4 Un modèle pour la structuration globale des populations de *P. falciparum* chez ses hôtes vecteurs

La structure des populations de *P. falciparum* peut être également envisagée à la lumière des travaux récents réalisés sur les populations parasitaires subdivisées dans les individus hôtes, grâce aux techniques de biologie moléculaire de génotypage multilocus, qui ont montré l'existence de génotypes multilocus identiques et répétés un grand nombre de fois au sein des individus hôtes. Les conséquences de ce phénomène d'expansion « clonale » de certains génotypes parasitaires dans les individus hôtes sur la structure globale des populations parasitaires n'ont été formalisées théoriquement que récemment (Balloux et al. 2003 ; de Meeus & Balloux 2004 ; de Meeus et al. 2007 ; Prugnolle et al. 2005b), et plusieurs

études expérimentales, dans leurs grandes majorité menées sur les macroparasites, beaucoup plus faciles d'accès pour une analyse individuelle du parasite, ont permis de vérifier les résultats des modèles théoriques. Toutefois, ces analyses ont été menées en très grande majorité sur les macroparasites (trématodes), dont l'analyse des stades infectants de façon individuelle est beaucoup plus aisée que pour les microparasites.

En Afrique plus qu'ailleurs, et pour l'étude de *P. falciparum*, parasite dont la très grande diversité africaine a été amplement démontrée, la nécessité d'une étude menée à l'échelle locale, celle du foyer de transmission, est cruciale si l'on veut appréhender correctement l'influence des divers facteurs qui gouvernent l'évolution du parasite aux échelles supérieures. Etant donnée la diversité des contextes africains de la transmission, la prise de conscience de l'importance de l'échelle locale a été prise en compte tôt dans les études de la diversité du parasite *P. falciparum*, mais surtout pour les études d'épidémiologie moléculaire, où le niveau individu-hôte est pris en compte pour le suivi des dynamiques de l'infection. Dans leur quasi-totalité, les études de la structure des populations du parasite, de son mode de reproduction (Day & Read 1992 ; Day et al. 1992 ; Babiker et al. 1997 ; Anderson 2000b), et des flux de gènes spatiaux et temporels (Anderson et al. 2000 ; Bogreau et al. 2006 ; Barry et al. 2007 ; Volkman et al. 2007), se sont focalisées sur les stades du parasites humains et à une échelle régionale, ignorant le niveau de structure local de l'individu-hôte homme ou vecteur.

Les interactions hôtes-parasites ont lieu dans un contexte spatial ou explicitement métapopulationnel dans des populations finies, subdivisées, qui échangent des gènes dans des environnements hétérogènes. Cette structure peut conduire à des interactions complexes entre les processus intra et inter-populations dans l'espace et dans le temps (Thompson 1994). Les métapopulations sont des groupes de populations caractérisées par l'extinction et la recolonisation, et liées entre elles par le flux génique. La plupart des modèles de métapopulations se concentrent sur le rôle de l'extinction et de la recolonisation dans la stabilisation de la coexistence et dans le maintien de la diversité génétique sélectionnée chez l'hôte et le parasite.

Criscione & Blouin (2006) ont proposé une interprétation de résultats expérimentaux obtenus pour un macroparasite dans un cadre global d'analyse des patrons de transmission des parasites entre hôtes, et de leurs conséquences sur la structuration globale des populations naturelles de parasites chez leurs hôtes intermédiaires et définitifs. La structure des populations parasitaires au sein et entre les individus hôtes et les populations d'hôtes avait été

interprétée théoriquement dans le cadre de modèles en métapopulation avec extinction et recolonisation, et modèle en île. Les grands traits généraux définissant la structuration du parasite chez ses hôtes sous l'hypothèse de différents modèles de transmission d'hôte à hôte ont été théorisés par ces auteurs, mais l'avancement des techniques d'échantillonnages et d'analyse moléculaire n'avaient pas jusqu'à présent permis de valider ces hypothèses.

Sous l'hypothèse d'un modèle en métapopulation avec extinction des sous-populations et recolonisation d'autres sous-populations, avec une transmission agrégée de l'hôte intermédiaire vers l'hôte définitif, les paramètres attendus de structuration du parasite chez son hôte sont les suivants (Criscione & Blouin 2006) : forte structuration des parasites entre individus hôtes définitifs (vecteurs), déficits en hétérozygotes significatifs au sein des hôtes définitifs, forte diversité de la population parasitaire globale, mais diversité plus faible intra-hôte, et présence significative de génotypes répétés dans les infrapopulations parasitaires des hôtes définitifs. Ce modèle global correspond à un faible taux d'allofécondation entre les descendants.

Les données que nous avons obtenues interprétées dans le cadre de ce modèle suggèrent donc pour le parasite *P. falciparum* chez ses hôtes vecteurs l'hypothèse d'une transmission agrégée des stades sexuels et une faible mixité entre ces stades. En effet, pour les deux vecteurs majeurs, et dans trois sites différents (Tibati et Simbock, Cameroun, Afrique Centrale, et Rota, Kenya, Afrique de l'Est), des déficits en hétérozygote significatifs sont observés au sein des moustiques, associés à une forte structuration entre infrapopulations parasitaires au sein des moustiques. La diversité globale est forte pour tous les sites (0,79), et la présence de génotypes répétés est mise en évidence dans chacun des sites et chacun des vecteurs en forte proportion (40% des estomacs porteurs d'au moins deux génotypes à Simbock, Figure 10).

Criscione & Blouin (2006) citent l'exemple d'une telle structuration observée chez un macroparasite avec une forte diversité de la population totale, une diversité plus faible au sein des infrapopulations, et une forte différenciation entre infrapopulations. Or ce parasite s'agrège sur des herbes, le pool de parasites étant ingéré en une seule fois par l'hôte définitif.

Pour le parasite *P. falciparum*, une telle transmission agrégée des stades sexués a été proposée (Gaillard et al. 2003 ; Pichon et al. 2000) pour rendre compte du caractère agrégé des distributions des gamétocytes et des oocystes chez les vecteurs. Comme c'est le cas pour les filaires, les gamétocytes chez *P. falciparum* auraient ainsi la capacité de s'agréger entre eux dans les microcapillaires de l'hôte humain, grâce à un mécanisme d'adhésion proches de celui responsables du phénomène d'autoadhérence, ou *rosetting*, des globules rouges infectés entre eux. Cette stratégie permettrait au parasite de maximiser le nombre de fécondations et

donc le nombre de zygotes par une reconnaissance facilitée des gamètes entre eux au sein du bolus sanguin.

3 Conclusion

Plasmodium falciparum est un parasite à cycle complexe, impliquant deux hôtes, l'homme, hôte intermédiaire où a lieu la reproduction asexuée, et le moustique anophèle vecteur, où a lieu la reproduction sexuée entre gamètes issus des gamétocytes sanguins. A une échelle continentale, et, pour l'Afrique, à une échelle régionale voire même entre villages distants de quelques kilomètres seulement (Fontenille et al. 1997), les foyers palustres sont caractérisés par une très grande variabilité du contexte de la transmission : dans une grande majorité des foyers, plusieurs espèces de vecteurs transmettent les différentes espèces et les différents génotypes de parasites *Plasmodium* en sympatrie. Chaque espèce possède ses propres caractéristiques de capacité et compétence vectorielles, incluant des traits essentiels au développement et à la survie du parasite, comme la longévité, la dispersion, le comportement trophique, etc. En fonction des conditions éco-climatiques, les populations vectrices sont de plus soumises à des fluctuations saisonnières de leurs densités. Les populations humaines sont également très diverses : elles diffèrent entre elles géographiquement par leur appartenance ethnique et leurs comportements culturels, et au sein des foyers, elles sont structurées en fonction de leur âge, la mise en place de l'immunité avec l'âge dans certaines conditions de la transmission constituant des environnements différents pour les parasites. Les conditions de la transmission sont donc très variables à la fois dans l'espace et dans le temps en Afrique, avec un très grand nombre de facteurs jouant à différentes échelles susceptibles d'influencer la structure des populations du parasite.

Les résultats déjà obtenus, et la littérature (Heitman 2006), soulignent que le parasite est capable d'adapter son mode de reproduction, via l'allocation des sexes, l'autofécondation ou l'allofécondation étant favorisée à tour de rôle en fonction d'une large gamme de facteurs environnementaux, pour optimiser le succès de la transmission. Notre étude au Cameroun et au Kenya montre que quelles que soient les conditions du milieu, un déficit en hétérozygote stable et constant dans le temps est observé dans les oocystes de *P. falciparum* chez ses deux espèces vectrices majeures en zones de forte transmission. Ceci va dans le sens d'un régime de reproduction du parasite adaptatif, fonction de nombreux facteurs, et qui ne peut pas être prédit uniquement en considérant la corrélation entre l'intensité de la transmission et la multiplicité des infections, comme une opportunité mécanique à la rencontre de génotypes distincts. L'allocation des sexes chez *P. falciparum* est facultative, adaptative, fonction de

nombreux facteurs, et le régime de reproduction l'est également (Heitman 2006). La compétition entre souches pour la ressource hôte (Grenfell et al. 2004), ainsi que les dynamiques de maturation des gamétocytes, sans compter un éventuel mécanisme d'agrégation des gamétocytes en files d'attente dans le sang (Gaillard et al. 2003) sont autant de mécanismes qui pourraient favoriser l'autofécondation, générant les déficits en hétérozygote significatifs observés chez les espèces anophèles vectrices. D'autre part, l'impact de l'espèce vectrice dans les sites de transmission où de nombreuses espèces sont présentes en sympatrie mérite d'être étudié plus en détail.

Perspectives

▪ **L'impact des hôtes vecteurs multiples sur la mise en place des moyens modernes de contrôle vectoriel :**

La stratégie de contrôle anti-vectoriel par l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés sur le terrain a reçu un regain d'intérêt et un encouragement suite à la publication pour la première fois d'une fitness accrue du vecteur *An. gambiae* modifié génétiquement par rapport aux souches sauvages (Marelli et al. 2007). Nos résultats cependant mettent clairement en évidence le rôle-clé des espèces vectrices autres que *An. gambiae* dans la transmission du parasite *P. falciparum* dans les foyers de transmission naturels, et notamment le rôle du vecteur très endophile et anthropophile *An. funestus*, souvent trouvé plus infecté que *An. gambiae* dans ces foyers où plusieurs espèces vectrices transmettent le parasite simultanément et en sympatrie.

Nos résultats mettent également clairement en lumière le rôle des vecteurs *An. nili* et *An. moucheti*, à la distribution plus restreinte à l'échelle africaine, mais dont le rôle est majeur dans la transmission à l'échelle locale. Le recrutement parasitaire plus diversifié de ces vecteurs, notamment *An. moucheti*, pourrait s'expliquer par leur comportement plus exophile, et moins anthropophile, et une dispersion plus grande à l'échelle du village, le vecteur de forêt *An. moucheti* contribuant ainsi à diversifier la population de parasite entre les hommes des différentes cases, favorisant les échanges génétiques entre souches parasitaires par recombinaison.

Une réduction drastique du taux d'inoculation entomologique est nécessaire pour réduire significativement la prévalence (Boete & Koella 2002). Dans ce contexte, étant donnée la grande variabilité du parasite maintenue dans chacune des espèces vectrices présentes au sein d'un foyer de transmission (la diversité génétique de *P. falciparum* chez les vecteurs majeurs varie de 0,76 à 0,79 dans notre étude), l'hypothèse de mécanismes de résistance que le parasite *P. falciparum* pourrait mettre en place pour échapper aux résistances des vecteurs transgéniques à l'infection est plausible. Même sans cela, la simple présence de plusieurs espèces vectrices en sympatrie dans un même site en plus de *An. gambiae* s.s. et leur rôle vecteur démontré par ces résultats dans la transmission de populations parasitaires au moins également diversifiées que celles de *An. gambiae* s.s. rend caduque l'idée d'une éradication du parasite par la modification génétique d'un seul de ses vecteurs.

Quelles sont d'autre part les limites de cette coadaptation dans les systèmes naturels anophèles/*Plasmodium* ? La possibilité d'une coadaptation génotypique vecteur-parasite est encore largement spéculative, mais des effets locaux du génotype parasitaire sur la compétence vectorielle de génotypes de moustiques particuliers ont été mesurés (Lambrechts

2005). Pour évaluer la possibilité d'une coadaptation moustique/parasite, la mise en place d'infections expérimentales et l'étude des régulations transcriptionnelles des différentes populations de *An. gambiae* par différentes espèces plasmodiales et différents génotypes de *P. falciparum* est nécessaire.

▪ **Diversité et évolution du génome de *P. falciparum* :**

L'analyse de la variabilité génétique à l'échelle du génome montre que la diversité est structurée de façon non-aléatoire sur l'ensemble du génome de *P. falciparum*, suivant les différentes régions du génome et suivant la fonction des gènes (Kidgell et al. 2006 ; Volkman et al. 2007). Les gènes de « ménage » évoluent à un taux inférieur au taux d'évolution neutre, et l'évolution des séquences introniques est dépendante de leur localisation : situées dans une famille multigénique, elles sont sélectionnées, et en dehors, évoluent de façon neutre.

La majorité des gènes des régions chromosomiques centrales sont très conservés entre souches, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les différentes souches de *P. falciparum* ont émergé à travers un goulot d'étranglement de la population suffisamment récent pour que les mutations multiples ne se soient pas encore accumulées. Ces observations renforcent la théorie de l'expansion des populations de *P. falciparum* à partir d'une ou de quelques souches en Afrique contemporaine au développement de l'agriculture et à la grégation des populations humaines (Hume et al. 2003) (Rich et al. 1998 ; Volkman 2001).

De plus, l'évolution des gènes dépendrait également de la présence ou non d'un gène paralogue dans le génome, un tel gène pouvant permettre des mécanismes de conversion génique et augmentant donc considérablement la variabilité du gène. De nombreux gènes évoluent plus rapidement que la neutralité, avec un polymorphisme accru pour les gènes avec paralogues, et d'autres sont variables sans paralogues, ce qui suggère qu'ils sont soumis à de fortes pressions sélectives. C'est parmi ces gènes que l'on retrouve les principaux immunogènes et quelques cibles de l'action des médicaments. Ces observations sont capitales pour la sélection de nouveaux marqueurs neutres criblant le génome au sein des séquences d'introns pour des études ultérieures de génomique des populations naturelles du parasite.

▪ **Implications épidémiologiques de la diversité de *P. falciparum* :**

Le développement d'un vaccin est rendu difficile par la grande variabilité des souches de *P. falciparum* sur le terrain. L'étude récente de Takala et al. (2007) a caractérisé les dynamiques temporelles intra-hôte humain et à l'échelle du site de 14 haplotypes de *P. falciparum* (6 SNPs séquencés dans la séquence 19 du bloc 1 de MSP-1). Deux haplotypes

majoritaires circulent au sein de la population humaine du parasite. Or, celui qui est actuellement testé comme candidat vaccin dans la région n'en fait pas partie. Le développement d'un vaccin dans de telles conditions remet sérieusement en question son efficacité, dans la mesure où, pour le cas d'une immunité souche-spécifique, une immunité acquise contre une souche minoritaire et peut-être bénigne n'aurait qu'un impact réduit sur les souches majoritaires, à moins d'une immunité croisée.

D'où l'importance des études préliminaires engagées au cours de cette thèse : l'étude de la diversité et de la dynamique de l'infection chez l'homme doit s'accompagner de l'étude dans le compartiment vecteur, pour voir comment sont transmises ces souches. Une perspective évidente pour la continuation de ce travail de thèse serait l'utilisation de gènes sélectionnés d'intérêt dans le cadre de la mise au point d'un vaccin. Une bonne connaissance fondamentale de l'écologie et de l'évolution du parasite permet ainsi le développement adapté des moyens prophylactiques et des programmes de santé publique à mettre en place. La connaissance des structures de populations d'hôtes et de parasites permet en effet de mieux comprendre l'épidémiologie d'une maladie et les mécanismes de propagation des résistances aux médicaments et aux vaccins, et ainsi d'améliorer son contrôle par une gestion préventive.

Références bibliographiques

2005. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing
- Abdel-Wahab A, Abdel-Muhsin AM, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA. 2002. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J Infect Dis* 185:1838-42
- al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. 1997. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:602-5
- Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, Billker O, Franke-Fayard B, Janse CJ, Waters A, Sinden RE. 2003. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol* 33:933-43
- Alphey L, Beard CB, Billingsley P, Coetzee M, Crisanti A, Curtis C, Eggleston P, Godfray C, Hemingway J, Jacobs-Lorena M, James AA, Kafatos FC, Mukwaya LG, Paton M, Powell JR, Schneider W, Scott TW, Sina B, Sinden R, Sinkins S, Spielman A, Toure Y, Collins FH. 2002. Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science* 298:119-21
- Anderson RA, Knols BG, Koella JC. 2000a. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitology* 120:329-33
- Anderson TJ. 2004. Mapping drug resistance genes in *Plasmodium falciparum* by genome-wide association. *Curr Drug Targets Infect Disord* 4:65-78
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. 2000b. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 17:1467-82
- Anderson TJ, Paul RE, Donnelly CA, Day KP. 2000c. Do malaria parasites mate non-randomly in the mosquito midgut? *Genet Res* 75:285-96
- Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 119:113-25
- Annan Z, Durand P, Ayala FJ, Arnathau C, Awono-Ambene P, Simard F, Razakandrainibe FG, Koella JC, Fontenille D, Renaud F. 2007. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the two main African vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7987-92
- Annan Z, Kengne P, Berthomieu A, Antonio-Nkondjio C, Rousset F, Fontenille D, Weill M. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the mosquito *Anopheles moucheti*, malaria vector in Africa. *Molecular Ecology Notes* 3:56-58
- Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, Meunier JY, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, Wondji CS, Tchuinkam T, Fontenille D. 2002. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol* 39:350-5
- Antonio-Nkondjio C, Keraf CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D. 2006. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol* 43:1215-21

- Antonio-Nkondjio C, Ndo C, Awono-Ambene P, Ngassam P, Fontenille D, Simard F. 2007. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in south Cameroon forest region. *Acta Trop* 101:61-8
- Arez AP, Pinto J, Palsson K, Snounou G, Jaenson TG, do Rosario VE. 2003. Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 68:161-8
- Arez AP, Snounou G, Pinto J, Sousa CA, Modiano D, Ribeiro H, Franco AS, Alves J, do Rosario VE. 1999. A clonal *Plasmodium falciparum* population in an isolated outbreak of malaria in the Republic of Cabo Verde. *Parasitology* 118:347-55
- Ariey F, Chalvet W, Hommel D, Peneau C, Hulin A, Mercereau-Puijalon O, Duchemin JB, Sarthou JL, Reynes JM, Fandeur T. 1999. *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg* 61:978-85
- Arnot D. 1998. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:580-5
- Arnot DE. 2002. The influence of the genetic complexity of *Plasmodium falciparum* infections on the epidemiology of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1:S131-6
- Awadalla P. 2003. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nat Rev Genet* 4:50-60
- Awono-Ambene HP, Simard F, Antonio-Nkondjio C, Cohuet A, Kengne P, Fontenille D. 2006. Multilocus enzyme electrophoresis supports speciation within the *Anopheles nili* group of malaria vectors in Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 75:656-8
- Ayala FJ, Escalante AA, Rich SM. 1999. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* 41:55-68
- Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood JD, Billingsley P, Teuscher T, Walliker D. 1994. Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 109:413-21
- Balloux F. 2004. Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution Int J Org Evolution* 58:1891-900
- Balloux F, Lehmann L. 2003. Random mating with a finite number of matings. *Genetics* 165:2313-5
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T. 2003. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164:1635-44
- Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11:155-65
- Barry AE, Leliwa-Sytek A, Tavul L, Imrie H, Migot-Nabias F, Brown SM, McVean GA, Day KP. 2007. Population Genomics of the Immune Evasion (var) Genes of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* 3:e34
- Basco LK, Ringwald P. 2001. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VIII. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg* 65:798-803
- Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, Alonso P, Tanner M. 1997. Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis* 175:921-6

- Beier JC. 1996. Frequent blood-feeding and restrictive sugar-feeding behavior enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae* s.l. and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J Med Entomol* 33:613-8
- Beier JC. 1998. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 43:519-43
- Beier JC, Killeen GF, Githure JJ. 1999. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 61:109-13
- Beier JC, Perkins PV, Onyango FK, Gargan TP, Oster CN, Whitmire RE, Koech DK, Roberts CR. 1991. Characterization of malaria transmission by *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in western Kenya in preparation for malaria vaccine trials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:481-8
- Bell AS, de Roode JC, Sim D, Read AF. 2006. Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution Int J Org Evolution* 60:1358-71
- Berezcky S, Liljander A, Rooth I, Faraja L, Granath F, Montgomery SM, Farnert A. 2007. Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microbes Infect* 9:103-10
- Billingsley P, Sinden R. 1997. Determinants of Malaria-Mosquito specificity. *Parasitology Today* 13:
- Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. 2004. Complement-like protein TEPI is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116:661-70
- Bockarie MJ, Dagoro H. 2006. Are insecticide-treated bednets more protective against *Plasmodium falciparum* than *Plasmodium vivax*-infected mosquitoes? *Malar J* 5:15
- Bockarie MJ, Service MW, Barnish G, Maude GH, Greenwood BM. 1994. Malaria in a rural area of Sierra Leone. III. Vector ecology and disease transmission. *Ann Trop Med Parasitol* 88:251-62
- Boete C. 2005. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol* 21:445-7
- Boete C, Koella JC. 2002. A theoretical approach to predicting the success of genetic manipulation of malaria mosquitoes in malaria control. *Malar J* 1:3
- Boete C, Paul RE. 2006. Can mosquitoes help to unravel the community structure of *Plasmodium* species? *Trends Parasitol* 22:21-5
- Boete C, Paul RE, Koella JC. 2002. Reduced efficacy of the immune melanization response in mosquitoes infected by malaria parasites. *Parasitology* 125:93-8
- Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C. 2006. Genetic Diversity and Structure of African *Plasmodium Falciparum* Populations in Urban and Rural Areas. *Am J Trop Med Hyg* 74:953-59
- Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. 1995. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 182:409-18
- Bruce-Chwatt LJ. 1980. *Essential Malariology*. London: Hainemann W
- Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R. 1990. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 100:191-200

- Bruce MC, Day KP. 2002. Cross-species regulation of malaria parasitaemia in the human host. *Curr Opin Microbiol* 5:431-7
- Bruce MC, Donnelly CA, Alpers MP, Galinski MR, Barnwell JW, Walliker D, Day KP. 2000a. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. *Science* 287:845-8
- Bruce MC, Donnelly CA, Packer M, Lagog M, Gibson N, Narara A, Walliker D, Alpers MP, Day KP. 2000b. Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology* 121:247-56
- 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. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15:552-58
- Bull PC, Berriman M, Kyes S, Quail MA, Hall N, Kortok MM, Marsh K, Newbold CI. 2005. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathog* 1:e26
- Burkot TR, Graves PM, Paru R, Lagog M. 1988. Mixed blood feeding by the malaria vectors in the *Anopheles punctulatus* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 25:205-13
- Carnevale P, Le Goff G, Toto JC, Robert V. 1992. *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Med Vet Entomol* 6:135-8
- Carnevale P, Mouchet J. 1980. Le paludisme en zone de transmission continue en région intertropicale, O.R.S.T.O.M.
- Carnevale P, Robert V, Molez JF, Baudon D. 1984. Faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes Médicales* 3:123-33
- Carter R, Voller A. 1975. The distribution of enzyme variation in populations of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69:371-6
- Certain LK, Sibley CH. 2007. *Plasmodium falciparum*: a novel method for analyzing haplotypes in mixed infections. *Exp Parasitol* 115:233-41
- Chege GM, Beier JC. 1990. Effect of *Plasmodium falciparum* on the survival of naturally infected afro-tropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 27:454-8
- Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC. 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298:159-65
- Cockerham CC, Weir BS. 1987. Correlations, descent measures: drift with migration and mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8512-4
- Coetzee M, Fontenille D. 2004. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol* 34:599-605
- Cohuet A, Dia I, Simard F, Raymond M, Rousset F, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene PH, Wondji CS, Fontenille D. 2005. Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon, Central Africa, and its relevance in malaria fighting. *Genetics* 169:301-11

- Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F, Christophides GK, Fontenille D, Kafatos FC. 2006. Anopheles and Plasmodium: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep* 7:1285-9
- Cohuet A, Simard F, Toto JC, 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* 69:200-5
- Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, Paskewitz S, Seeley DC, Miller LH, Collins WE, Campbell CC, Gwadz RW. 1986. Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector Anopheles gambiae. *Science* 234:607-10
- Coluzzi M. 1999. The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of Plasmodium falciparum. *Parassitologia* 41:277-83
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco M. 1985 Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in Anopheles gambiae. *Boll Zool* 45-63
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V. 2002. A polytene chromosome analysis of the Anopheles gambiae species complex. *Science* 298:1415-8
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73:483-97
- Combes C. 1995. *Interactions durables. Écologie et évolution du parasitisme* Paris: Dunod. 544 pp.
- Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O. 1995. PCR typing of field isolates of Plasmodium falciparum. *J Clin Microbiol* 33:944-51
- Conway DJ, Greenwood BM, McBride JS. 1991. The epidemiology of multiple-clone Plasmodium falciparum infections in Gambian patients. *Parasitology* 103:1-6
- Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Greenwood BM. 1999. High recombination rate in natural populations of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4506-11
- Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. 1999. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in Anopheles funestus from Burkina Faso. *Parassitologia* 41:595-611
- Criscione CD, Blouin MS. 2005. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends Parasitol* 21:212-7
- Criscione CD, Blouin MS. 2006. Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *Evolution* 60:553-62
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 14:2247-57
- Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. 2003. The genetic diversity of Plasmodium vivax populations. *Trends Parasitol* 19:220-6
- Czeher C, Labbo R, Djibrilla A, Here L, Arzika I, Duchemin JB. 2006. ELISA study of oocyst-sporozoite transition in malaria vectors. *Parasite* 13:257-61
- Das A, Bajaj R, Mohanty S, Swain V. 2007. Genetic diversity and evolutionary history of Plasmodium falciparum and P. vivax. *Current Science* 92:1516-24

- Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Mercereau-Puijalon O, Druilhe P. 1996. Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg* 54:18-26
- Day KP. 1999. The epidemiology of malaria in Africa. In *Malaria*
- Day KP, Koella JC, Nee S, Gupta S, Read AF. 1992. Population genetics and dynamics of *Plasmodium falciparum*: an ecological view. *Parasitology* 104 Suppl: S35-52
- de Meeus T, Balloux F. 2004. Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study. *Infect Genet Evol* 4:345-51
- de Meeus T, Balloux F. 2005. F-statistics of clonal diploids structured in numerous demes *Molecular Ecology* 14:2695-702
- de Meeus T, Prugnolle F, Agnew P. 2007. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci* 64:1355-72
- de Meeus T, Renaud F. 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol* 18:247-51
- de Roode JC, Helinski MEH, Ali Anwar M, Read AF. 2005. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections *The American Naturalist* 166:531-42
- della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M. 2002. Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. *Science* 298:115-7
- 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* 10:9-18
- Dia I, Diop T, Rakotoarivony I, Kengne P, Fontenille D. 2003. Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol* 40:279-83
- Dibaya M. 2005. Spécificités Anophèles - Plasmodium dans la transmission du paludisme en zone de forêt, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie
- Dimopoulos G, Kafatos FC, Waters AP, Sinden RE. 2002. Malaria parasites and the anopheles mosquito. *Chem Immunol* 80:27-49
- Dinglasan RR, Alaganan A, Ghosh AK, Saito A, van Kuppevelt TH, Jacobs-Lorena M. 2007. *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15882-7
- Dolo A, Modiano D, Maiga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, Ba M, Maiga H, Coulibaly D, Perlman H, Blomberg MT, Toure YT, Coluzzi M, Dumbo O. 2005. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 72:243-8
- Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* 2:e52
- Drakeley CJ, Akim NI, Sauerwein RW, Greenwood BM, Targett GA. 2000. Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94:472-6

- Druilhe P, Daubersies P, Patarapotikul J, Gentil C, Chene L, Chongsuphajaisiddhi T, Mellouk S, Langsley G. 1998. A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites. *J Clin Invest* 101:2008-16
- Durand P, Michalakakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F. 2003. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68:345-9
- Dye C. 1991. Population genetics of nonclonal, nonrandomly mating malaria parasites. *Parasitol Today* 7:236-40
- Dye C, Godfray HC. 1993. On sex ratio and inbreeding in malaria parasite populations. *J Theor Biol* 161:131-4
- Dye C, Hasibeder G. 1986. Population dynamics of mosquito-borne disease: effects of flies which bite some people more frequently than others. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:69-77
- Elliott SL, Sabelis MW, Adler FR. 2003. Evolution of parasite virulence to vectors. In *Proceedings of the Frontis Workshop on Chemical Ecology: from Gene to Ecosystem*, ed. W University, p. 9. Wageningen, NL: Wageningen UR Frontis Series
- Escalante AA, Ayala FJ. 1995. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5793-7
- Fandeur T, Le Scanf C, Bonnemains B, Slomianny C, Mercereau-Puijalon O. 1995. Immune pressure selects for *Plasmodium falciparum* parasites presenting distinct red blood cell surface antigens and inducing strain-specific protection in *Saimiri sciureus* monkeys. *J Exp Med* 181:283-95
- Farnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Bjorkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L, Mercereau-Puijalon O, Ranford-Cartwright LC, Rubio JM, Snounou G, Walliker D, Zwetyenga J, do Rosario VE. 2001. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:225-32
- Farnert A, Snounou G, Rooth I, Bjorkman A. 1997. Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg* 56:538-47
- 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 Mol Biol* 10:19-23
- Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. 1999. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:3-9
- Ferguson HM, Read AF. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269:1217-24
- Ferguson HM, Read AF. 2004. Mosquito appetite for blood is stimulated by *Plasmodium chabaudi* infections in themselves and their vertebrate hosts. *Malar J* 3:12
- Filion GJ, Paul RE, Robert V. 2006. Transmission and immunity: the importance of heterogeneity in the fight against malaria. *Trends Parasitol* 22:345-8
- Fontenille D, Lepers JP, Campbell GH, Coluzzi M, Rakotoarivony I, Coulanges P. 1990. Malaria transmission and vector biology in Manarintsoa, high plateaux of Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 43:107-15

- Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, Konate L, Faye F, Rogier C, Trape JF. 1997. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 56:247-53
- Fontenille D, Simard F. 2004. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:357-75
- Gaillard FO, Boudin C, Chau NP, Robert V, Pichon G. 2003. Togetherness among Plasmodium falciparum gametocytes: interpretation through simulation and consequences for malaria transmission. *Parasitology* 127:427-35
- Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. 2001. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* 414:751-6
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 419:498-511
- Garnham P. 1966. *Malaria Parasites and other haemosporidia*. Oxford: Blackwell Scientific publications. 1114 pp.
- Gillies MT, Coetzee M. 1987. *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara*. Johannesburg, South-Africa
- Gillies MT, De Meillon B. 1968. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. Johannesburg, South Africa
- Gouagna LC, Mulder B, Noubissi E, Tchuinkam T, Verhave JP, Boudin C. 1998. The early sporogonic cycle of Plasmodium falciparum in laboratory-infected Anopheles gambiae: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health* 3:21-8
- Goudet J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5:184-86
- Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, Dorsey G. 2006. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal Plasmodium falciparum infections. *Am J Trop Med Hyg* 75:836-42
- Greenwood B, Mutabwanga T. 2002. Malaria in 2002. *Nature* 415:670-72
- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC. 2004. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303:327-32
- Gupta S, Day KP. 1994. A strain theory of malaria transmission. *Parasitol Today* 10:476-81
- Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Stahl S, Berzins K. 1999. Limited genetic diversity of Plasmodium falciparum in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 60:30-4
- Hamilton WD. 1967. Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. *Science* 156:477-88
- Hamon J, Chauvet G, Mouchet J. 1963. Quelques aspects de l'écologie des vecteurs du paludisme humain en Afrique, O.R.S.T.O.M.
- Harbach R. 1994. Review of the internal classification of the genus Anopheles (Diptera : Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bull. Entomol. Res* 84 331-42

- Harbach RE. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res* 94:537-53
- Hartl DL. 2004. The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 2:15-22
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 542 pp.
- Hartl DL, Volkman SK, Nielsen KM, Barry AE, Day KP, Wirth DF, Winzeler EA. 2002. The paradoxical population genetics of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 18:266-72
- Hastings IM. 2006. Complex dynamics and stability of resistance to antimalarial drugs. *Parasitology* 132:615-24
- Hastings IM, Watkins WM. 2006. Tolerance is the key to understanding antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol* 22:71-7
- Haywood M, Conway DJ, Weiss H, Metzger W, D'Alessandro U, Snounou G, Targett G, Greenwood B. 1999. Reduction in the mean number of *Plasmodium falciparum* genotypes in Gambian children immunized with the malaria vaccine SPf66. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:65-8
- Heitman J. 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol* 16:R711-25
- Hill WG, Babiker HA. 1995. Estimation of numbers of malaria clones in blood samples. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262:249-57
- Hill WG, Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. 1995. Estimation of inbreeding coefficients from genotypic data on multiple alleles, and application to estimation of clonality in malaria parasites. *Genet Res* 65:53-61
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, et al. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129-49
- Hume JC, Lyons EJ, Day KP. 2003. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 19:144-9
- Ijumba JN, Mosha FW, Lindsay SW. 2002. Malaria transmission risk variations derived from different agricultural practices in an irrigated area of northern Tanzania. *Med Vet Entomol* 16:28-38
- Issifou S, Rogier C, Adjagba-Olakpo M, Chabi-Worou N, Ntoumi F. 2003. Complexity and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infections in young children living in urban areas of Central and West Africa. *Parasitol Res* 90:423-8
- Jafari-Guemouri S, Boudin C, Fievet N, Ndiaye P, Deloron P. 2006. *Plasmodium falciparum* genotype population dynamics in asymptomatic children from Senegal. *Microbes Infect* 8:1663-70
- Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O, Durand R. 2004. *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment. *J Infect Dis* 189:195-203
- Kasehagen LJ, Mueller I, McNamara DT, Bockarie MJ, Kiniboro B, Rare L, Lorry K, Kastens W, Reeder JC, Kazura JW, Zimmerman PA. 2006. Changing patterns of *Plasmodium* blood-stage infections in the Wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 75:588-96
- 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* 17:67-74

- Kidgell C, Volkman SK, Daily J, Borevitz JO, Plouffe D, Zhou Y, Johnson JR, Le Roch K, Sarr O, Ndir O, Mboup S, Batalov S, Wirth DF, Winzeler EA. 2006. A systematic map of genetic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* 2:e57
- Killeen GF, Ross A, Smith T. 2006. Infectiousness of malaria-endemic human populations to vectors. *Am J Trop Med Hyg* 75:38-45
- Klowden MJ, Briegel H. 1994. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 31:618-22
- Kobbe R, Neuhoff R, Marks F, Adjei S, Langefeld I, von Reden C, Adjei O, Meyer CG, May J. 2006. Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Trop Med Int Health* 11:613-9
- Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 66:804-11
- Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. 1999. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:21-8
- Krzywinski J, Besansky NJ. 2002. Frequent intron loss in the white gene: a cautionary tale for phylogeneticists. *Mol Biol Evol* 19:362-6
- Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC. 2005. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biology* 3:e298
- Lambrechts L, Chavatte JM, Snounou G, Koella JC. 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc Biol Sci* 273:1501-6
- Lambrechts L, Morlais I, Awono-Ambene PH, Cohuet A, Simard F, Jacques JC, Bourgooin C, Koella JC. 2007. Effect of Infection by *Plasmodium Falciparum* on the Melanization Immune Response of *Anopheles Gambiae*. *Am J Trop Med Hyg* 76:475-80
- Laserson KF, Petralanda I, Almera R, Barker RH, Jr., Spielman A, Maguire JH, Wirth DF. 1999. Genetic characterization of an epidemic of *Plasmodium falciparum* malaria among Yanomami Amerindians. *J Infect Dis* 180:2081-5
- Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F. 2002. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect* 4:685-92
- Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, Severini C, Ayala FJ, Renaud F. 2004. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14455-60
- Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouarn L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M, Molez JF. 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera:Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* 34:396-403
- Lochouarn L, Dia I, Boccolini D, Coluzzi M, Fontenille D. 1998. Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:607-12

- Luckhart S, Li K, Dunton R, Lewis EE, Crampton AL, Ryan JR, Rosenberg R. 2003. Anopheles gambiae immune gene variants associated with natural Plasmodium infection. *Mol Biochem Parasitol* 128:83-6
- Luckhart S, Riehle MA. 2007. The insulin signaling cascade from nematodes to mammals: insights into innate immunity of Anopheles mosquitoes to malaria parasite infection. *Dev Comp Immunol* 31:647-56
- Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nosten F. 1996. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90:105-11
- Lyimo EO, Koella JC. 1992. Relationship between body size of adult Anopheles gambiae s.l. and infection with the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitology* 104:233-7
- Macdonald G. 1957. *The epidemiology and control of malaria*. Oxford, UK: Oxford University Press
- Mackinnon MJ, Read AF. 2003. The effects of host immunity on virulence-transmissibility relationships in the rodent malaria parasite Plasmodium chabaudi. *Parasitology* 126:103-12
- Mandavilli A. 2006. DDT returns. *Nat Med* 12:870-1
- Marques PX, Saute F, Pinto VV, Cardoso S, Pinto J, Alonso PL, Rosario VE, Arez AP. 2005. Plasmodium species mixed infections in two areas of Manhica District, Mozambique. *Int J Biol Sci* 1:96-102
- Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. 2007. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5580-3
- Marshall JC, Powell JR, Caccone A. 2005. Short report: Phylogenetic relationships of the anthropophilic Plasmodium falciparum malaria vectors in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 73:749-52
- Martinelli A, Cheesman S, Hunt P, Culleton R, Raza A, Mackinnon M, Carter R. 2005. A genetic approach to the de novo identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:814-9
- Maynard Smith J. 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Mayor A, Aponte JJ, Fogg C, Saute F, Greenwood B, Dgedge M, Menendez C, Alonso PL. 2007. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. *Malar J* 6:3
- Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. 2004. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 20:233-40
- McCall PJ, Mosha FW, Njunwa KJ, Sherlock K. 2001. Evidence for memorized site-fidelity in Anopheles arabiensis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:587-90
- McCoy KD. 2003. Sympatric speciation in parasites--what is sympatry? *Trends Parasitol* 19:400-4
- McKenzie FE, Bossert WH. 1997a. Mixed-species Plasmodium infections of Anopheles (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 34:417-25
- McKenzie FE, Bossert WH. 1997b. Mixed-species Plasmodium infections of humans. *J Parasitol* 83:593-600
- McNamara DT, Thomson JM, Kasehagen LJ, Zimmerman PA. 2004. Development of a multiplex PCR-ligase detection reaction assay for diagnosis of infection by the four parasite species causing malaria in humans. *J Clin Microbiol* 42:2403-10

- Menegon M, Severini C, Sannella A, Paglia MG, Sangare D, Abdel-Wahab A, Abdel-Muhsin AA, Babiker H, Walliker D, Alano P. 2000. Genotyping of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 111:153-61
- Menge DM, 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* 173:235-41
- Mercereau-Puijalon O. 1999. [Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* infections in man]. *Transfus Clin Biol* 6:44-56
- Michel AP, Ingrassi MJ, Schemerhorn BJ, Kern M, Le Goff G, Coetzee M, Elissa N, Fontenille D, Vulule J, Lehmann T, Sagnon N, Costantini C, Besansky NJ. 2005. Rangewide population genetic structure of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology* 14:4235-48
- Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR, Kafatos FC. 2006. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16858-63
- Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Githeko A, Yan G. 2002. The effects of climatic factors on the distribution and abundance of malaria vectors in Kenya. *J Med Entomol* 39:833-41
- Molineaux L, Gramiccia G. 1980. *Le projet Garki. Recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanienne de l'Afrique occidentale*. Genève: Organisation mondiale de la santé. 354 pp.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*. Montrouge, France
- Mouchet J, Gariou J. 1957. [Gonotrophic cycle of *Anopheles moucheti* Evans 1925, in a region of the South Cameroon.]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 50:676-81
- Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Joy DA, McVean GA, Su XZ. 2005. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 3:e335
- Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Keebler J, Seydel K, McVean GA, Su XZ. 2007. Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet* 39:126-30
- Mu J, Duan J, Makova KD, Joy DA, Huynh CQ, Branch OH, Li WH, Su XZ. 2002. Chromosome-wide SNPs reveal an ancient origin for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418:323-6
- Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. 2007. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* 23:278-83
- Mulvey M, Aho JM, Lydeard C, Leberg PL, Smith MH. 1991. Comparative population structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* 45:1628-40
- Mzilahowa T, McCall PJ, Hastings IM. 2007. "Sexual" population structure and genetics of the malaria agent *P. falciparum*. *PLoS ONE* 2:e613
- Nadler SA. 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J Parasitol* 81:395-403
- Nassir E, Abdel-Muhsin AM, Suliaman S, Kenyon F, Kheir A, Geha H, Ferguson HM, Walliker D, Babiker HA. 2005. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of

- Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol* 35:49-55
- Nee S, West SA, Read AF. 2002. Inbreeding and parasite sex ratios. *Proc Biol Sci* 269:755-60
- Niare O, Markianos K, Volz J, Oduol F, Toure A, Bagayoko M, Sangare D, Traore SF, Wang R, Blass C, Dolo G, Bouare M, Kafatos FC, Kruglyak L, Toure YT, Vernick KD. 2002. Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science* 298:213-6
- Noor MA, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12084-8
- Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. 1995. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 52:81-8
- O'Meara WP, Collins WE, McKenzie FE. 2007. Parasite prevalence: a static measure of dynamic infections. *Am J Trop Med Hyg* 77:246-9
- Obbard DJ, Linton YM, Jiggins FM, Yan G, Little TJ. 2007. Population genetics of *Plasmodium* resistance genes in *Anopheles gambiae*: no evidence for strong selection. *Mol Ecol* 16:3497-510
- Oduol F, Xu J, Niare O, Natarajan R, Vernick KD. 2000. Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11397-402
- Olivry JC. 1986. Fleuves et Rivières du Cameroun. In *Collection Monographies Hydrologiques ORSTOM n°9*, ed. ORSTOM. Paris, France
- Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. 2004. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 303:2030-2
- Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V. 2007. [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med Mal Infect* 37:153-61
- Paul RE, Bonnet S, Boudin C, Tchuinkam T, Robert V. 2007. Aggregation in malaria parasites places limits on mosquito infection rates. *Infect Genet Evol* 7:577-86
- Paul RE, Brey PT, Robert V. 2002a. *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends Parasitol* 18:32-8
- Paul RE, Day KP. 1998. Mating Patterns of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 14:197-202
- Paul RE, Diallo M, Brey PT. 2004. Mosquitoes and transmission of malaria parasites - not just vectors. *Malar J* 3:39
- Paul RE, Hackford I, Brockman A, Muller-Graf C, Price R, Luxemburger C, White NJ, Nosten F, Day KP. 1998. Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 58:195-203
- Paul RE, Nu VA, Krettli AU, Brey PT. 2002b. Interspecific competition during transmission of two sympatric malaria parasite species to the mosquito vector. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269:2551-7
- Paul RE, Packer MJ, Walmsley M, Lagog M, Ranford-Cartwright LC, Paru R, Day KP. 1995. Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science* 269:1709-11

- Paul RE, Arley F, Robert V. 2003. The evolutionary ecology of Plasmodium. *Ecology Letters* 6:866-80
- Perkins SL. 2000. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of Plasmodium. *Proc Biol Sci* 267:2345-50
- Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, von Sonnenburg F. 2001. Genetic diversity of Plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health* 6:607-13
- Pichon G, Awono-Ambene HP, Robert V. 2000. High heterogeneity in the number of Plasmodium falciparum gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology* 121:115-20
- Price PW. 1977. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution* 31:405-20
- Prugnolle F, Liu H, de Meeus T, Balloux F. 2005a. Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes. *Int J Parasitol* 35:255-63
- Prugnolle F, Roze D, Theron A, T DEM. 2005b. F-statistics under alternation of sexual and asexual reproduction: a model and data from schistosomes (platyhelminth parasites). *Mol Ecol* 14:1355-65
- Ranford-Cartwright LC, Balfe P, Carter R, Walliker D. 1991. Genetic hybrids of Plasmodium falciparum identified by amplification of genomic DNA from single oocysts. *Mol Biochem Parasitol* 49:239-43
- Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeus T, Rousset F, Ayala FJ, Renaud F. 2005. "Clonal" population structure of the malaria agent Plasmodium falciparum in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17388-93
- Read AF, Day KP. 1992. The genetic structure of malaria parasite populations. *Parasitol Today* 8:239-42
- Read AF, Narara A, Nee S, Keymer AE, Day KP. 1992. Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria. *Parasitology* 104:387-95
- Read AF, Taylor LH. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292:1099-102
- Reece SE, Duncan AB, West SA, Read AF. 2005. Host cell preference and variable transmission strategies in malaria parasites. *Proc Biol Sci* 272:511-7
- Reiczigel J, Lang Z, Rozsa L, Tothmeresz B. 2005. Properties of crowding indices and statistical tools to analyze parasite crowding data. *J Parasitol* 91:245-52
- Rich SM, Hudson RR, Ayala FJ. 1997. Plasmodium falciparum antigenic diversity: evidence of clonal population structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13040-5
- Rich SM, Licht MC, Hudson RR, Ayala FJ. 1998. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4425-30
- Rickman LS, Jones TR, Long GW, Paparello S, Schneider I, Paul CF, Beaudoin RL, Hoffman SL. 1990. Plasmodium falciparum-infected Anopheles stephensi inconsistently transmit malaria to humans. *Am J Trop Med Hyg* 43:441-5
- Riehle MM, Markianos K, Lambrechts L, Xia A, Sharakhov I, Koella JC, Vernick KD. 2007. A major genetic locus controlling natural Plasmodium falciparum infection is shared by East and West African Anopheles gambiae. *Malar J* 6:87

- Riehle MM, Markianos K, Niare O, Xu J, Li J, Toure AM, Podiougou B, Oduol F, Diawara S, Diallo M, Coulibaly B, Ouatarara A, Kruglyak L, Traore SF, Vernick KD. 2006. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science* 312:577-9
- Robert V, le Goff G, Gouagna LC, Sinden M, Kieboom J, Kroneman R, Verhave JP. 1998. Kinetics and efficiency of *Plasmodium falciparum* development in the midguts of *Anopheles gambiae*, *An. funestus* and *An. nili*. *Ann Trop Med Parasitol* 92:115-8
- Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC. 2003a. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68:169-76
- Robert V, Molez JF, Trape JF. 1996a. Short report: gametocytes, chloroquine pressure, and the relative parasite survival advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in west Africa. *Am J Trop Med Hyg* 55:350-1
- Robert V, Read AF, Essong J, Tchuinkam T, Mulder B, Verhave JP, Carnevale P. 1996b. Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90:621-4
- Robert V, Sokhna CS, Rogier C, Ariey F, Trape JF. 2003b. Sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. *Parasitology* 127:1-8
- Rodhain F, Perez C. 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Paris: Maloine. 458 pp.
- Rogier C, Pradines B, Bogreau H, Koeck JL, Kamil MA, Mercereau-Puijalon O. 2005. Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 11:317-21
- Rohr. 2006. Abstract n°1960 In *11th International Congress of Parasitology*. Glasgow, Scotland
- Roper C, Richardson W, Elhassan IM, Giha H, Hviid L, Satti GM, Theander TG, Arnot DE. 1998. Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitology* 116:501-10
- Rosenberg R, Rungsiwongse J. 1991. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg* 45:574-7
- Sakihama N, Ohmae H, Bakote'e B, Kawabata M, Hirayama K, Tanabe K. 2006. Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 gene from populations in the Solomon Islands. *Am J Trop Med Hyg* 74:31-40
- Schwartz A, Koella JC. 2002. Melanization of *plasmodium falciparum* and C-25 sephadex beads by field-caught *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from southern Tanzania. *J Med Entomol* 39:84-8
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49:520-9
- Scott TW, Githeko AK, Fleisher A, Harrington LC, Yan G. 2006. DNA profiling of human blood in anophelines from lowland and highland sites in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75:231-7
- Shutler D, Reece SE, Mullie A, Billingsley PF, Read AF. 2005. Rodent malaria parasites *Plasmodium chabaudi* and *P. vinckei* do not increase their rates of gametocytogenesis in response to mosquito probing. *Proc Biol Sci* 272:2397-402
- Sinden RE. 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol* 4:713-24

- Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI. 2005a. The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children. *Nature* 438:492-95
- Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI. 2005b. The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children. *Nature* 438:492-5
- Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, Irion A, Alonso P, Teuscher T, Tanner M. 1999a. Age dependence of the multiplicity of Plasmodium falciparum infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:15-20
- Smith T, Felger I, Beck HP, Tanner M. 1999b. Consequences of multiple infection with Plasmodium falciparum in an area of high endemicity. *Parassitologia* 41:247-50
- Smith T, Felger I, Kitua A, Tanner M, Beck HP. 1999c. Dynamics of multiple Plasmodium falciparum infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:35-9
- Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. 1999d. Premunition in Plasmodium falciparum infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1:59-64
- Smith TG, Lourenco P, Carter R, Walliker D, Ranford-Cartwright LC. 2000. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Parasitology* 121:127-33
- Snounou G. 2004. Cross-species regulation of Plasmodium parasitaemia cross-examined. *Trends Parasitol* 20:262-5; discussion 66-7
- Snounou G, Jarra W, Viriyakosol S, Wood JC, Brown KN. 1989. Use of a DNA probe to analyse the dynamics of infection with rodent malaria parasites confirms that parasite clearance during crisis is predominantly strain- and species-specific. *Mol Biochem Parasitol* 37:37-46
- Snounou G, Renia L. 2007. The vaccine is dead--long live the vaccine. *Trends Parasitol* 23:129-32
- Snounou G, White NJ. 2004. The co-existence of Plasmodium: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 20:333-9
- Somboon P, Prapanthadara L, Suwonkerd W. 1999. Selection of Anopheles dirus for refractoriness and susceptibility to Plasmodium yoelii nigeriensis. *Med Vet Entomol* 13:355-61
- Straif SC, Beier JC. 1996. Effects of sugar availability on the blood-feeding behavior of Anopheles gambiae (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol* 33:608-12
- Su X, Wellems TE. 1996. Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics* 33:430-44
- Sutherland CJ, Allouche A, Curtis J, Drakeley CJ, Ord R, Duraisingh M, Greenwood BM, Pinder M, Warhurst D, Targett GA. 2002a. Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit Plasmodium falciparum gametocytes carrying resistance genes. *Am J Trop Med Hyg* 67:578-85
- Sutherland CJ, Allouche A, McRobert L, Ord R, Leggat J, Snounou G, Pinder M, Targett GA. 2002b. Genetic complexity of Plasmodium falciparum gametocytes isolated from the peripheral blood of treated Gambian children. *Am J Trop Med Hyg* 66:700-5
- Tahar R, Boudin C, Thiery I, Bourgoignie C. 2002. Immune response of Anopheles gambiae to the early sporogonic stages of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Embo J* 21:6673-80

- Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Dicko A, Smith DL, Guindo AB, Kone AK, Traore K, Ouattara A, Djimde AA, Sehdev PS, Lyke KE, Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV. 2007. Dynamics of Polymorphism in a Malaria Vaccine Antigen at a Vaccine-Testing Site in Mali. *PLoS Med* 4:e93
- Takken W, Knols BG. 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 44:131-57
- Tanabe K, Sakihama N, Rooth I, Bjorkman A, Farnert A. 2007. High frequency of recombination-driven allelic diversity and temporal variation of *Plasmodium falciparum* msp1 in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 76:1037-45
- Taylor LH, Read AF. 1998. Determinants of transmission success of individual clones from mixed-clone infections of the rodent malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*. *Int J Parasitol* 28:719-25
- Ter Braak C. 1987. *CANOCO – Fortran program for canonical community ordination*. NY: Microcomputer Power
- Thaithong S, Beale GH, Fenton B, McBride J, Rosario V, Walker A, Walliker D. 1984. Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78:242-5
- Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P. 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129:571-85
- Thompson J. 1994. *The Coevolutionary Process*. Chicago and London: The University of Chicago Press
- Tibayrenc M. 1999. Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annu Rev Genet* 33:449-77
- Tibayrenc M, Ayala FJ. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 18:405-10
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2414-8
- Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C, Rogier C. 2002. Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol* 18:224-30
- Trape JF, Rogier C. 1996. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today* 12:236-40
- Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, et al. 1994. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 51:123-37
- Trung HD, Bortel WV, Sochantha T, Keokenchanh K, Briet OJ, Coosemans M. 2005. Behavioural heterogeneity of *Anopheles* species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control. *Trop Med Int Health* 10:251-62

- Urdaneta L, Lal A, Barnabe C, Oury B, Goldman I, Ayala FJ, Tibayrenc M. 2001. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6725-9
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30
- Vaughan JA. 2007. Population dynamics of *Plasmodium* sporogony. *Trends Parasitol* 23:63-70
- Vaughan JA, Noden BH, Beier JC. 1994. Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 51:233-43
- Vercruyse J. 1985. [Entomological study on the transmission of human malaria in the Senegal River Basin (Senegal)]. *Ann Soc Belg Med Trop* 65 Suppl 2:171-9
- Vernick KD. 2005. Molecular Genetics of Mosquito Resistance to Malaria Parasites. *CTMI* 295:383-415
- Vernick KD, Fujioka H, Seeley DC, Tandler B, Aikawa M, Miller LH. 1995. *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* 80:583-95
- Vitalis R, Couvet D. 2001. Two-locus identity probabilities and identity disequilibrium in a partially selfing subdivided population. *Genet Res* 77:67-81
- Vlachou D, Schlegelmilch T, Christophides GK, Kafatos FC. 2005. Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Curr Biol* 15:1185-95
- Vogt AM, Pettersson F, Moll K, Jonsson C, Normark J, Ribacke U, Egwang TG, Ekre HP, Spillmann D, Chen Q, Wahlgren M. 2006. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathog* 2:e100
- Volkman SK, Barry AE, Lyons EJ, Nielsen KM, Thomas SM, Choi M, Thakore SS, Day KP, Wirth DF, Hartl DL. 2001. Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* 293:482-4
- Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA, Jr., Daily JP, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT, Lukens A, Derr A, Stange-Thomann N, Waggoner S, Onofrio R, Ziaugra L, Mauceli E, Gnerre S, Jaffe DB, Zainoun J, Wiegand RC, Birren BW, Hartl DL, Galagan JE, Lander ES, Wirth DF. 2007. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 39:113-9
- Volz J, Muller HM, Zdanowicz A, Kafatos FC, Osta MA. 2006. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cell Microbiol* 8:1392-405
- Walliker D. 1991. Malaria parasites: Randomly interbreeding or 'clonal' populations? *Parasitol Today* 7:232-5
- Walliker D, Quakyi IA, Wellem TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R. 1987. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 236:1661-6
- Wang Q, Fujioka H, Nussenzweig V. 2005. Exit of *Plasmodium* sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein. *PLoS Pathog* 1:e9
- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel

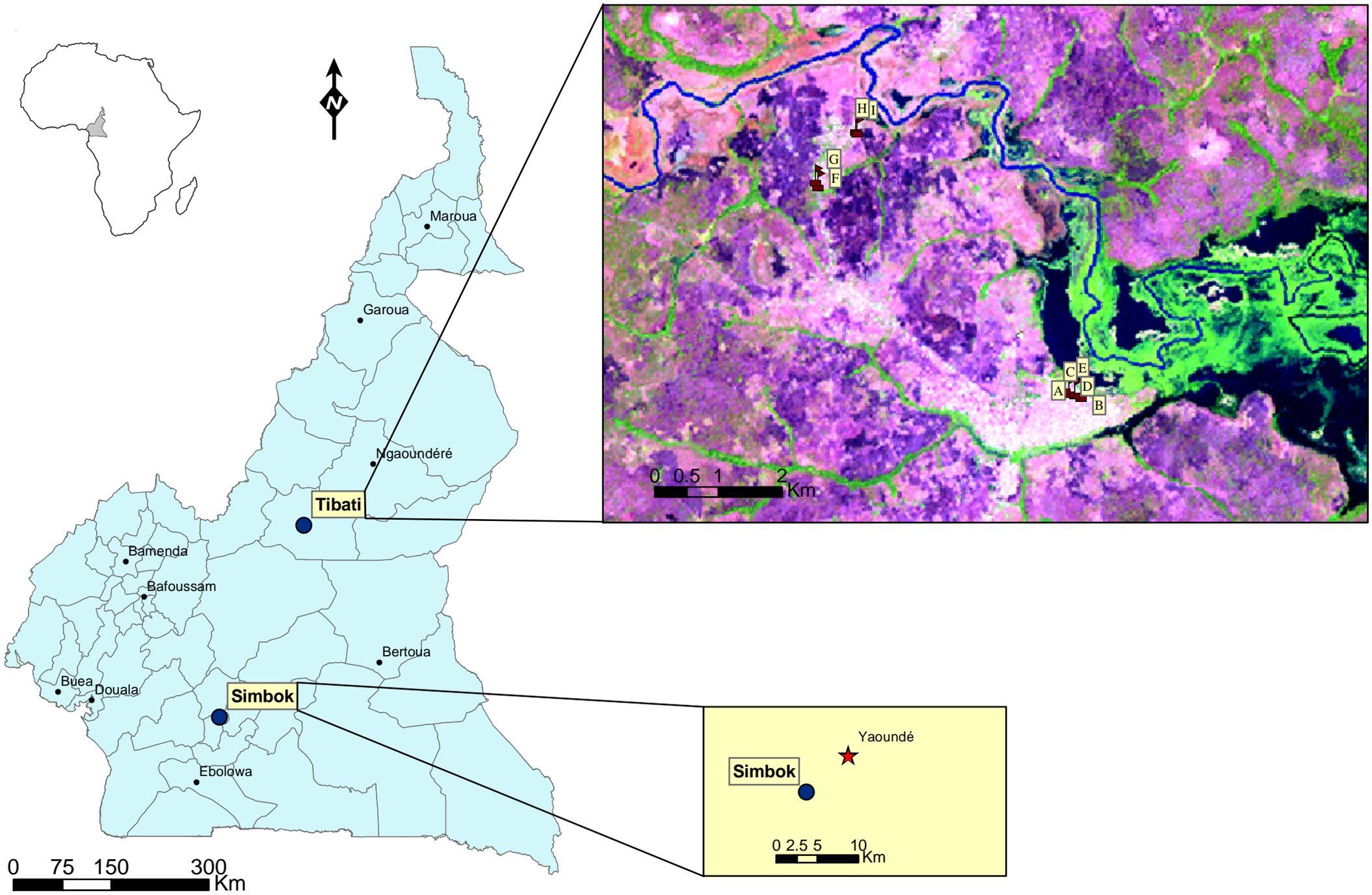
- AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK. 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 316:1738-43
- Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. 1991. Plasmodium falciparum appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3140-4
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-70
- Wekesa JW, Yuval B, Washino RK. 1997. Multiple blood feeding by Anopheles freeborni and Culex tarsalis (Diptera:Culicidae): spatial and temporal variation. *J Med Entomol* 34:219-25
- Welch DM, Meselson M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288:1211-5
- West SA, Reece SE, Read AF. 2001. Evolution of gametocyte sex ratios in malaria and related apicomplexan (protozoan) parasites. *Trends Parasitol* 17:525-31
- WHO-UNICEF. 2005. *World Malaria Report 2005*: World Health Organization, UNICEF
- Wondji C, Simard F, Fontenille D. 2002. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of Anopheles gambiae in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 11:11-9
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum. *Nature* 418:320-3
- Yang RC. 1998. Estimating hierarchical F-statistics. *Evolution* 52:950-56
- Zheng L, Cornel AJ, Wang R, Erfle H, Voss H, Ansorge W, Kafatos FC, Collins FH. 1997. Quantitative trait loci for refractoriness of Anopheles gambiae to Plasmodium cynomolgi B. *Science* 276:425-8
- Zheng L, Wang S, Romans P, Zhao H, Luna C, Benedict MQ. 2003. Quantitative trait loci in Anopheles gambiae controlling the encapsulation response against Plasmodium cynomolgi Ceylon. *BMC Genet* 4:16
- Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJ, Kazura JW. 2004. Why do we need to know more about mixed Plasmodium species infections in humans? *Trends Parasitol* 20:440-7
- Zollner GE, Ponsa N, Garman GW, Poudel S, Bell JA, Sattabongkot J, Coleman RE, Vaughan JA. 2006. Population dynamics of sporogony for Plasmodium vivax parasites from western Thailand developing within three species of colonized Anopheles mosquitoes. *Malar J* 5:68
- Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. 1999. A cohort study of Plasmodium falciparum diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93:375-80
- Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. 1998. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in Plasmodium falciparum infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 59:726-35

Annexes

Annexe 1

POSITION GPS DES SITES ECHANTILLONNES SUR LA CARTE DU CAMEROUN

Les deux sites échantillonnés (Simbock et Tibati) sont positionnés sur la carte du Cameroun et les 9 maisons échantillonnées à Tibati (marquées A, B, C, D, E, F, G, H, I) sont positionnées sur une carte mosaïque d'images satellites de la région de Tibati. (Source : K. Ose, US140, IRD et D. Ayala, UR016, IRD).



Annexe 2

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE 1

Annan et al. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America : Supplementary Material

The supplementary material can be found at:

www.pnas.org/cgi/content/full/0702715104/DC1

Table 2. Allele frequencies observed at seven microsatellite loci in *P. falciparum* oocysts from Cameroon (Simbock, Tibati) and Kenya (Rota)

Locus & allele	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
	<i>N</i> =81	<i>N</i> =126	<i>N</i> =73	<i>N</i> =90	<i>N</i> =130	<i>N</i> =246
POLYa (chr.4)	<i>n</i> =79	<i>n</i> =126	<i>n</i> =73	<i>n</i> =90	<i>n</i> =130	<i>n</i> =242
103	0.019					
127	0.032	0.008				
130		0.012			0.004	0.002
133	0.057	0.020	0.014			
136	0.051	0.004	0.048		0.085	0.085
140	0.057	0.020	0.027	0.117	0.008	0.006
143	0.032	0.016	0.130	0.011	0.062	0.079
146	0.089	0.171	0.021	0.139	0.058	0.101
150	0.063	0.194	0.048	0.050	0.358	0.087
153	0.177	0.115	0.199	0.228	0.038	0.167
156	0.032	0.071	0.041	0.078	0.038	0.074
160	0.177	0.099	0.068	0.172	0.100	0.087
163	0.070	0.079	0.158	0.033	0.038	0.027
166	0.076	0.103	0.021	0.011	0.146	0.072
169	0.019	0.032	0.041	0.133	0.042	0.155
172	0.013	0.028	0.144	0.028	0.012	0.031
175	0.013	0.016	0.041			0.014
178						0.002
181		0.004			0.012	0.006
183		0.008				
186	0.013					
189	0.013					0.004
<i>H</i> _{obs}	0.39	0.56	0.49	0.28	0.34	0.51

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
H_{exp}	0.91	0.89	0.89	0.86	0.82	0.90
TA60 (chr.13)	$n=81$	$n=125$	$n=72$	$n=89$	$n=121$	$n=240$
56						0.004
64	0.006	0.012		0.017		0.013
67					0.033	0.017
70	0.296	0.236	0.160	0.062	0.153	0.156
73	0.111	0.100	0.208	0.107	0.041	0.056
76	0.049	0.132	0.090	0.084	0.012	0.017
79	0.340	0.336	0.278	0.163	0.702	0.396
82	0.093	0.088	0.049	0.444	0.050	0.179
85	0.086	0.032		0.124	0.008	0.148
88	0.019	0.064	0.160			0.004
91			0.056			0.008
94						0.002
H_{obs}	0.38	0.45	0.32	0.29	0.17	0.34
H_{exp}	0.77	0.79	0.82	0.74	0.48	0.76
ARA2 (chr.11)	$n=79$	$n=121$	$n=72$	$n=87$	$n=129$	$n=243$
51					0.016	0.008
54	0.006					
57	0.019	0.012	0.007	0.052	0.023	0.027
60	0.013	0.066	0.125	0.040	0.019	0.023
63	0.304	0.277	0.306	0.287	0.353	0.366
66	0.241	0.132	0.396	0.132	0.171	0.210
69	0.120	0.140	0.069	0.253	0.047	0.134
72	0.171	0.149	0.028	0.178	0.229	0.134
75	0.057	0.099	0.021	0.017	0.081	0.029
78	0.070	0.103	0.021		0.062	0.045
81		0.017	0.021	0.017		0.025
84		0.004	0.007			

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
87				0.023		
H_{obs}	0.38	0.56	0.32	0.38	0.36	0.50
H_{exp}	0.80	0.84	0.73	0.80	0.78	0.78
Pfg377 (chr.12)	<i>n</i> =81	<i>n</i> =126	<i>n</i> =73	<i>n</i> =88	<i>n</i> =128	<i>n</i> =238
92		0.012	0.014			0.002
95	0.123	0.127	0.178	0.028	0.047	0.044
98	0.099	0.210	0.178	0.426	0.051	0.147
101	0.673	0.635	0.582	0.500	0.484	0.754
104	0.093	0.012	0.048	0.017	0.410	0.046
107	0.012			0.028	0.008	0.006
116		0.004				
H_{obs}	0.25	0.27	0.25	0.30	0.14	0.24
H_{exp}	0.52	0.54	0.60	0.57	0.59	0.41
PfPK2 (chr.12)	<i>n</i> =79	<i>n</i> =126	<i>n</i> =73	<i>n</i> =88	<i>n</i> =128	<i>n</i> =242
145		0.004				0.006
151						0.002
154					0.008	
157						0.004
160		0.020				
163	0.076	0.040	0.192	0.051	0.035	0.171
166	0.209	0.278	0.144	0.108	0.223	0.155
169	0.215	0.230	0.233	0.199	0.207	0.213
172	0.190	0.179	0.151	0.159	0.066	0.134
175	0.051	0.071	0.171	0.028	0.078	0.149
178	0.019	0.024	0.007	0.290	0.008	0.017
181	0.070			0.017	0.289	0.012
184	0.114	0.103	0.007	0.006	0.023	0.048
187	0.032	0.016		0.017	0.047	0.056
190	0.006	0.012	0.096	0.102		0.006

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
193	0.019	0.016		0.023	0.016	0.014
196						0.008
199		0.008				0.002
207						0.002
H_{obs}	0.38	0.45	0.27	0.31	0.28	0.51
H_{exp}	0.85	0.82	0.83	0.83	0.81	0.86
TA87 (chr.6)	$n=80$	$n=123$	$n=73$	$n=90$	$n=129$	$n=245$
86				0.011	0.004	0.004
89	0.019	0.012	0.130		0.004	0.018
92	0.031	0.033	0.014	0.156	0.019	0.018
95	0.081	0.130	0.075	0.044	0.209	0.190
98	0.056	0.061	0.199	0.044	0.074	0.106
101	0.456	0.329	0.301	0.244	0.120	0.188
104	0.138	0.215	0.082	0.233	0.221	0.235
107	0.075	0.106	0.103	0.233	0.066	0.137
110	0.069	0.061	0.062	0.017	0.012	0.055
113	0.050	0.020	0.007	0.011	0.260	0.024
116	0.013	0.024			0.004	0.008
119	0.013	0.004				0.006
122		0.004			0.008	0.010
124			0.027			
136				0.006		
H_{obs}	0.45	0.48	0.41	0.40	0.38	0.54
H_{exp}	0.75	0.81	0.83	0.81	0.82	0.84
TA109 (chr.6)	$n=78$	$n=126$	$n=72$	$n=87$	$n=124$	$n=238$
134				0.006		
140						0.002
143	0.006					0.002
146	0.013					

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
149	0.006					
151					0.069	0.038
154	0.006			0.023		0.002
157	0.013			0.057		0.004
160	0.064	0.210	0.160	0.109	0.093	0.162
163	0.314	0.194	0.361	0.184	0.028	0.176
166	0.026			0.006	0.004	0.008
170	0.019			0.011		0.015
173	0.301	0.214	0.042	0.201	0.073	0.141
176	0.192	0.234	0.299	0.213	0.298	0.221
179	0.019	0.052	0.014	0.011	0.004	
182			0.042		0.004	0.002
185		0.032	0.069	0.126	0.065	0.082
188	0.006	0.060		0.052	0.343	0.025
191		0.004				
194	0.013					0.002
200					0.012	0.118
206					0.008	
210			0.014			
H_{obs}	0.36	0.47	0.25	0.37	0.28	0.39
H_{exp}	0.77	0.81	0.75	0.85	0.77	0.85
Mean and SE						
Alleles	10.9	10.7	8.9	9.3	10.0	13.0
SE	1.6	1.5	1.1	0.9	1.2	1.5
H_{obs}	0.37	0.46	0.33	0.33	0.28	0.43
SE	0.02	0.04	0.03	0.02	0.04	0.04
H_{exp}	0.77	0.79	0.78	0.78	0.73	0.77
SE	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06

N is the total number of oocysts analyzed, and n is the number of oocysts analyzed for each locus. Chromosome (chr.) location is in parentheses, after the locus designation. Allele size is in base pairs. H_{obs} and H_{exp} are, respectively, the observed and expected frequency of heterozygotes. SE, standard error.

Table 3. Allele frequencies observed at seven microsatellite loci in *P. falciparum* oocysts from Cameroon (Simbock, Tibati) and Kenya (Rota)

Locus & allele	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
	$N = 81$	$N = 126$	$N = 73$	$N = 90$	$N = 130$	$N = 246$
POLYa (chr. 4)	$N = 79$	$N = 126$	$N = 73$	$N = 90$	$N = 130$	$N = 242$
103	0.019					
127	0.032	0.008				
130		0.012			0.004	0.002
133	0.057	0.020	0.014			
136	0.051	0.004	0.048		0.085	0.085
140	0.057	0.020	0.027	0.117	0.008	0.006
143	0.032	0.016	0.130	0.011	0.062	0.079
146	0.089	0.171	0.021	0.139	0.058	0.101
150	0.063	0.194	0.048	0.050	0.358	0.087
153	0.177	0.115	0.199	0.228	0.038	0.167
156	0.032	0.071	0.041	0.078	0.038	0.074
160	0.177	0.099	0.068	0.172	0.100	0.087
163	0.070	0.079	0.158	0.033	0.038	0.027
166	0.076	0.103	0.021	0.011	0.146	0.072
169	0.019	0.032	0.041	0.133	0.042	0.155
172	0.013	0.028	0.144	0.028	0.012	0.031
175	0.013	0.016	0.041			0.014
178						0.002
181		0.004			0.012	0.006
183		0.008				

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
186	0.013					
189	0.013					0.004
H_{obs}	0.39	0.56	0.49	0.28	0.34	0.51
H_{exp}	0.91	0.89	0.89	0.86	0.82	0.90
TA60 (chr. 13)	$N = 81$	$N = 125$	$N = 72$	$N = 89$	$N = 121$	$N = 240$
56						0.004
64	0.006	0.012		0.017		0.013
67					0.033	0.017
70	0.296	0.236	0.160	0.062	0.153	0.156
73	0.111	0.100	0.208	0.107	0.041	0.056
76	0.049	0.132	0.090	0.084	0.012	0.017
79	0.340	0.336	0.278	0.163	0.702	0.396
82	0.093	0.088	0.049	0.444	0.050	0.179
85	0.086	0.032		0.124	0.008	0.148
88	0.019	0.064	0.160			0.004
91			0.056			0.008
94						0.002
H_{obs}	0.38	0.45	0.32	0.29	0.17	0.34
H_{exp}	0.77	0.79	0.82	0.74	0.48	0.76
ARA2 (chr. 11)	$N = 79$	$N = 121$	$N = 72$	$N = 87$	$N = 129$	$N = 243$
51					0.016	0.008
54	0.006					
57	0.019	0.012	0.007	0.052	0.023	0.027
60	0.013	0.066	0.125	0.040	0.019	0.023
63	0.304	0.277	0.306	0.287	0.353	0.366
66	0.241	0.132	0.396	0.132	0.171	0.210
69	0.120	0.140	0.069	0.253	0.047	0.134

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
72	0.171	0.149	0.028	0.178	0.229	0.134
75	0.057	0.099	0.021	0.017	0.081	0.029
78	0.070	0.103	0.021		0.062	0.045
81		0.017	0.021	0.017		0.025
84		0.004	0.007			
87				0.023		
H_{obs}	0.38	0.56	0.32	0.38	0.36	0.50
H_{exp}	0.80	0.84	0.73	0.80	0.78	0.78
Pfg377 (chr.12)	$N = 81$	$N = 126$	$N = 73$	$N = 88$	$N = 128$	$N = 238$
92		0.012	0.014			0.002
95	0.123	0.127	0.178	0.028	0.047	0.044
98	0.099	0.210	0.178	0.426	0.051	0.147
101	0.673	0.635	0.582	0.500	0.484	0.754
104	0.093	0.012	0.048	0.017	0.410	0.046
107	0.012			0.028	0.008	0.006
116		0.004				
H_{obs}	0.25	0.27	0.25	0.30	0.14	0.24
H_{exp}	0.52	0.54	0.60	0.57	0.59	0.41
PfPK2 (chr. 12)	$N = 79$	$N = 126$	$N = 73$	$N = 88$	$N = 128$	$N = 242$
145		0.004				0.006
151						0.002
154					0.008	
157						0.004
160		0.020				
163	0.076	0.040	0.192	0.051	0.035	0.171
166	0.209	0.278	0.144	0.108	0.223	0.155
169	0.215	0.230	0.233	0.199	0.207	0.213

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
172	0.190	0.179	0.151	0.159	0.066	0.134
175	0.051	0.071	0.171	0.028	0.078	0.149
178	0.019	0.024	0.007	0.290	0.008	0.017
181	0.070			0.017	0.289	0.012
184	0.114	0.103	0.007	0.006	0.023	0.048
187	0.032	0.016		0.017	0.047	0.056
190	0.006	0.012	0.096	0.102		0.006
193	0.019	0.016		0.023	0.016	0.014
196						0.008
199		0.008				0.002
207						0.002
H_{obs}	0.38	0.45	0.27	0.31	0.28	0.51
H_{exp}	0.85	0.82	0.83	0.83	0.81	0.86
TA87 (chr. 6)	$N = 80$	$N = 123$	$N = 73$	$N = 90$	$N = 129$	$N = 245$
86				0.011	0.004	0.004
89	0.019	0.012	0.130		0.004	0.018
92	0.031	0.033	0.014	0.156	0.019	0.018
95	0.081	0.130	0.075	0.044	0.209	0.190
98	0.056	0.061	0.199	0.044	0.074	0.106
101	0.456	0.329	0.301	0.244	0.120	0.188
104	0.138	0.215	0.082	0.233	0.221	0.235
107	0.075	0.106	0.103	0.233	0.066	0.137
110	0.069	0.061	0.062	0.017	0.012	0.055
113	0.050	0.020	0.007	0.011	0.260	0.024
116	0.013	0.024			0.004	0.008
119	0.013	0.004				0.006
122		0.004			0.008	0.010
124			0.027			

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
136				0.006		
H_{obs}	0.45	0.48	0.41	0.40	0.38	0.54
H_{exp}	0.75	0.81	0.83	0.81	0.82	0.84
TA109 (chr. 6)	$N = 78$	$N = 126$	$N = 72$	$N = 87$	$N = 124$	$N = 238$
134				0.006		
140						0.002
143	0.006					0.002
146	0.013					
149	0.006					
151					0.069	0.038
154	0.006			0.023		0.002
157	0.013			0.057		0.004
160	0.064	0.210	0.160	0.109	0.093	0.162
163	0.314	0.194	0.361	0.184	0.028	0.176
166	0.026			0.006	0.004	0.008
170	0.019			0.011		0.015
173	0.301	0.214	0.042	0.201	0.073	0.141
176	0.192	0.234	0.299	0.213	0.298	0.221
179	0.019	0.052	0.014	0.011	0.004	
182			0.042		0.004	0.002
185		0.032	0.069	0.126	0.065	0.082
188	0.006	0.060		0.052	0.343	0.025
191		0.004				
194	0.013					0.002
200					0.012	0.118
206					0.008	
210			0.014			
H_{obs}	0.36	0.47	0.25	0.37	0.28	0.39

	Simbock		Tibati		Rota	
	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. funestus</i>	<i>A. gambiae</i>
H_{exp}	0.77	0.81	0.75	0.85	0.77	0.85
Mean and SE						
Alleles	10.9	10.7	8.9	9.3	10.0	13.0
SE	1.6	1.5	1.1	0.9	1.2	1.5
H_{obs}	0.37	0.46	0.33	0.33	0.28	0.43
SE	0.02	0.04	0.03	0.02	0.04	0.04
H_{exp}	0.77	0.79	0.78	0.78	0.73	0.77
SE	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06

N is the total number of oocysts analyzed, and n is the number of oocysts analyzed for each locus. Chromosome (chr.) location is in parentheses after the locus designation. Allele size is in base pairs. H_{obs} and H_{exp} are, respectively, the observed and expected frequency of heterozygotes. SE is the standard error.

Annexe 3

Article 4 :

Molecular Ecology Notes, 2003, vol. 3, p. 56-8

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMORPHIC MICROSATELLITE MARKERS FROM THE MOSQUITO *ANOPHELES MOUCHETI*, MALARIA VECTOR IN AFRICA

ZEINAB ANNAN, PIERRE KENGNE, ARNAUD BERTHOMIEU, CHRISTOPHE
ANTONIO-NKONDJIO, FRANÇOIS ROUSSET, DIDIER FONTENILLE & MYLENE
WEILL

PRIMER NOTE

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the mosquito *Anopheles moucheti*, malaria vector in Africa

Z. ANNAN,* P. KENGNE,* A. BERTHOMIEU,† C. ANTONIO-NKONDJIO,‡ F. ROUSSET,† D. FONTENILLE* and M. WEILL†

*Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911, avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France, †Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier (ISEM), Laboratoire de Génétique et Environnement, UMR CNRS 5554, Université de Montpellier II, place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France, ‡Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organization de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroon

Abstract

Anopheles moucheti is a major human malaria vector in Equatorial Africa. The screening of an *Anopheles moucheti* genomic microsatellite library allowed us to select 36 sequences with AC/GT dinucleotide tandem repeats. Primer pairs were designed to amplify the loci and 25 out of 36 gave a repeatable and scorable amplification. In total, 17 loci were selected for their high degree of polymorphism (the number of alleles per locus ranged from four to 16, and observed heterozygosity from 0.43 to 0.87) and suspicion of absence of null alleles, using 30 wild females from South-Cameroon. No linkage disequilibrium was found between the loci.

Keywords: *Anopheles moucheti*, malaria vector, microsatellites, population structure

Received 8 August 2002; revision received 28 September 2002; accepted 28 September 2002

Anopheles moucheti is a major human malaria vector in villages and towns situated in forest areas along large rivers or slow moving streams of Equatorial Africa. This species was shown to be responsible for *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates reaching 300 infective bites per person per year, with sporozoite rates ranging up to 4% (Fontenille & Lochouart 1999). Despite this important role on malaria transmission, few studies were carried out on this species since its identification by Evans in 1925 (Evans 1931). As part of a large scale ongoing investigation of the African malaria vectorial system, a study based in South-Cameroon was undertaken on this vector. Biological observations and allozyme analysis on specimens from several villages of this region revealed this species to be morphologically polymorphic and genetically homogenous (Antonio-Nkondjio *et al.* 2002). Nevertheless, because allozyme loci might not be sufficiently variable to reveal *Anopheles moucheti*'s population level structuring,

we undertook the development of microsatellite loci, known to be highly polymorphic markers.

We report here the isolation and characterization of the first microsatellite loci from the genome of *Anopheles moucheti*, following the protocol described by Estoup *et al.* (1993) (detailed protocols of A. Estoup and O. Martin available at: <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>).

Genomic DNA was extracted from a pool of 20 *Anopheles moucheti* specimens and totally digested by *Sau3A*. Size-selected fragments (400–900 pb) were ligated into a pUC18 vector (Pharmacia) digested by *Bam*HI, and plasmids were used to transform XL1-blue competent cells (Stratagene). Approximately 3000 recombinant clones were transferred onto Hybond-N + nylon membranes (Amersham) and screened using an equal mixture of (TC)₁₀ and (TG)₁₀ digoxigenin-end labelled oligonucleotide probes (Boehringer Mannheim).

Of the 78 positive clones detected, inserts from 50 of those harbouring a strong hybridization signal were polymerase chain reaction (PCR) amplified with the M13/pUC18 universal primers (Stratagene), and sequenced

Correspondence: Zeinab Annan. Fax: +33 467542044; E-mail: zei_annan@hotmail.com

Table 1 Primer sequences and characteristics of 24 *Anopheles moucheti* microsatellite loci. Sequence interruptions of less than 5 bp between repeats are indicated as '+'. For locus AM8, the interruption between the two motifs is superior to 20 bp (juxtaposed motif). The annealing temperature is 55 °C for all primer pairs. Number of alleles are based on 3 samples of 10 specimens collected in 3 different villages of South-Cameroon. F and R: forward and reverse primers. H_O : observed heterozygosity, H_E : expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium tested on the 30 specimens above. Bold locus are those for which a significant ($P < 0.05$) heterozygote deficiency was observed (estimation of exact P -values by the Markov chain method)

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Number of alleles	Allele size range (bp)	Heterozygosity		GenBank accession number
					H_O	H_E	
AM1	(AC) ₈₊₂	F: ATA CCC TGC ATC CTC TGC R: GTA CGC AAA TGG TTG TTG C	7	94-122	0.47	0.64	AJ496752
AM2	(GT) ₉	F: GCT CGC ATG GAT AAC CAC R: GTT CTA GGG CTT GGT TGG	7	104-118	0.53	0.63	AJ496753
AM3	(GT) ₉	F: GAA TGG GAA AGA GAG ACG G R: AAG AAG CAG CAG ACA GAC G	6	188-199	0.67	0.73	AJ496754
AM4	(AC) ₉	F: ATC CTT CAC CTT TTC GTG C R: ATC ATG TGC CTA TGA TGA GC	9	224-240	0.87	0.87	AJ496755
AM5	(AC) ₁₈	F: GTT CCC TAG GCA AGA AAT TG R: AAG GTA ATC CCA CAG TAC GC	11	121-145	0.87	0.87	AJ496756
AM6	(GT) ₄₊₆	F: ACG GTA GGT TAT CGA CAT GC R: ACG GAG CAC CGA ACA TG	9	150-168	0.80	0.76	AJ496757
AM7	(GT) ₈₊₂	F: GTG CAA CAC GAA TTG CT R: AAA CGG ACG ACT GCT CG	8	218-246	0.73	0.78	AJ496741
AM8	(GT) ₆₊₄ (AT) ₈	F: ATC ACG TGT GAC GCA CC R: ATC AGC GAA AGT GAG AGC TG	8	202-228	0.67	0.82	AJ496742
AM9	(AC) ₄₊₄	F: AAT TTA CGC CAC ACG TAC C R: GAC GCA GTG TAA GAC GCT G	12	146-174	0.70	0.76	AJ496743
AM10	(AC) ₉	F: GAT TTC ACT TCC TCA TTC GC R: GAT ACG TTT AAG CTG GCA GC	5	132-142	0.67	0.73	AJ496744
AM11	(AC) ₈₊₄	F: AGA TTT AGC AAA GTT TGC CC R: AAT TGT TTG TTT GAC CGA GC	5	162-174	0.53	0.57	AJ496745
AM12	(GT) ₁₆₊₆	F: ACA GAA CAG GTC ATT GTG GG R: AGC ACG TTT AAT AAT TTG GC	9	183-204	0.76	0.82	AJ496746
AM13	(GT) ₇	F: GGG TGT TTC GTT TTG TTG TC R: ATT TCA CTT TCT CCT TTG GC	8	126-140	0.83	0.84	AJ496747
AM14	(GT) ₈	F: GGG TGT TTC GTT TTG TTG TC R: ATT TCA CTT TCT CCT TTG GC	7	150-162	0.83	0.83	AJ496748
AM15	(AC) ₁₃	F: TCA ATT TAT GAA AAC GGT CC R: GCA AAT GTT AAA TCC TAC GC	14	102-133	0.73	0.85	AJ496749
AM16	(GT) ₃₊₆	F: GAG CCA AAG GTA AAT GAA GC R: AAG GAT GTC GAG CAC ACG	8	130-143	0.73	0.79	AJ496750
AM17	(GT) ₇	F: GAT CGA CAC CGG TCG GTG A R: GCT TTT ATG ATG CGC AAC CC	4	218-224	0.86	0.63	AJ496751
AM18	(GT) ₁₀	F: GCG CCA ATG TCG TAC ATC R: ATA ACA GAC ACC CTC ACA CG	16	204-240	0.70	0.91	AJ504655
AM19	(GT) ₂₊₈	F: GGT AAC GAA ATA GTT TCC CG R: GCT ACA CCG GCT CCT GT	7	94-106	0.43	0.59	AJ504656
AM20	(GT) ₈₊₂	F: GTC GTT GAA TTT GTC AAT GC R: GGT GGG AAT TGG ATG AGC	9	147-177	0.60	0.81	AJ504657
AM21	(GT) ₉	F: GCT AGG AAT CGA AGC CAT C R: GAA TGC ATT TGC AAG TTG G	11	150-180	0.43	0.69	AJ504658
AM22	(GT) ₁₁	F: AAT CAA TTG CAC TTG TAG GG R: GGT TTG TCG ACA ACG CTG	10	181-203	0.53	0.76	AJ504659
AM23	(AC) ₈	F: ATA GTT GCA GCA TAG TCG CA R: ACT CCA TTG TGT GGA GCG	10	122-166	0.43	0.69	AJ504660
AM24	(GT) ₁₆	F: GTG AAA CAT CCC AAC GAA GT R: ACA CCA TCA AAG GAC ACT GG	9	90-110	0.50	0.72	AJ504661

using an ABI 310 sequencer (Perkin-Elmer). Primer sets were designed using OLIGO software version 4.04 (National Biosciences) to amplify short (90–230 bp) PCR products for 36 microsatellite sequences (the remainder were unsuitable because of incomplete sequences obtained). Microsatellite polymorphism was assessed using 30 females from three forest villages of South-Cameroon (10 specimens per village), distant from each other by about 200 km. DNA for genotyping was extracted from single specimens following Collins *et al.* (1987). PCR amplifications were carried out in 25 μ L reaction volume, from approximately 5–10 ng of template DNA. Reaction mixture contained 1X Qiagen PCR buffer [Tris Cl, KCl (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, pH 8.7 (20 °C)], 2 mM MgCl₂ (Qiagen), 5 μ L of Qiagen Q-Solution 5X, 200 μ M each dNTP, 10 pmol of each primer, and 1 U Qiagen *Taq* Polymerase. Amplifications were performed using a Mastercycler Gradient thermocycler (Eppendorf) under the following conditions, common for all the loci amplified: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min is followed by 34 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C and a final elongation step of 10 min at 72 °C. Of the 36 primer pairs designed, 25 reliably produced a successful and consistent amplification under these conditions, yielding repeatable and scorable results evaluated on a 2% agarose gel as a single strong band. The forward primer of each of these 25 pairs was labelled with either TET, HEX or 6-FAM fluorescent dyes (Eurogentec). Resulting PCR products were resolved using an ABI Prism 377 Genetic Analyser (Perkin-Elmer). Alleles were sized relatively to an internal standard using GENESCAN software version 3.1 (Applied Biosystems).

In total, 24 loci revealed extensive allelic polymorphism with a number of alleles per locus ranging from four to 16 and an observed heterozygosity from 0.43 to 0.87 (Table 1), one locus being monomorphic (sequence available in EMBL database: AJ504662). The tests for heterozygote deficiency were performed for each locus on the 30 specimens using GENEPOP version 3.2 (Raymond & Rousset 1995).

They were significant for 7 loci out of the 24 tested, which may suggest the presence of one or more null alleles operating at these loci (Table 1). Linkage disequilibrium between all pairs of loci was not detected ($P > 0.05$ Fisher's exact test) when using GENEPOP. In total, 17 polymorphic loci without any detected heterozygote deficiency are thus available for population genetics studies of *Anopheles moucheti* in Africa.

Acknowledgements

We thank Dr N. Pasteur and the Institut des Sciences de l'Evolution (UMR 5554), Montpellier, for their help at different points of this study. We also thank P. Awono-Ambene for field work assistance and A. Estoup for providing us with technical support. This work was supported by the French Ministry of Research (PAL + program), IRD and Université Montpellier 2, and by the WHO-RTG/TDR grant N° A00942 to C. Antonio-Nkondjio.

References

- Antonio Nkondjio C, Simard F, Cohuet A, Fontenille D (2002) Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles Moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric south Cameroon populations. *Infection, Genetics and Evolution*, **45**, 1–4.
- Collins FH, Mendez AM, Rasmussen MO *et al.* (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**, 37–41.
- Estoup A, Solignac M, Harry M, Cornuet JM (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, **21**, 1427–1431.
- Evans AM (1931) Notes on African Anophelines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **25**, 129–143.
- Fontenille D, Lochouart L (1999) The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia*, **41** (1–3), 267–271.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP, Version 1.2: a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.

Liste des Figures du texte :

- Figure 1** Distribution des épisodes palustres cliniques - causés indifféremment par les 4 espèces de *Plasmodium* humains et résultant d'une transmission locale - dans le monde par personne et par an.
- Figure 2** Classification partielle des *Plasmodium*.
- Figure 3** Classification partielle des anophèles.
- Figure 4** Illustration des grandes étapes du cycle de vie des *Plasmodium* spp. dans les deux hôtes homme et moustique anophèle.
- Figure 5** La réduction parasitaire au cours du développement sporogonique de *Plasmodium* dans le vecteur anophèle.
- Figure 6** Illustration des trois types de cycle de vie des organismes avec une phase de reproduction asexuée.
- Figure 7** La transmission du parasite *P. falciparum* à Simbock par les quatre espèces vectrices sympatriques *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*.
- Figure 8** Comparaison des composantes F_{IS} et F_{ST} de la consanguinité globale des oocystes de *P. falciparum* entre les vecteurs *An. gambiae* et *An. funestus*.
- Figure 9** Fréquence des piqûres reçues par homme et par nuit ($p/h/n$) par espèce vectrice et par case à Simbock (a) et à Tibati (b).
- Figure 10** Importance des génotypes oocystes répétés dans les estomacs échantillonnés.
- Figure 11** Relations entre le taux d'autofécondation (s), la variation dans la variance du succès reproducteur des clones (c) et (a) le F_{IS} dans les hôtes définitifs et (b) le F_{ST} .
- Figure 12** Influence des génotypes multilocus répétés présents dans les infrapopulations de *P. falciparum* sur l'estimation des F -statistiques et de H_E .
- Figure 13** Effets des génotypes répétés sur la diversité et la structure de *P. falciparum* dans les vecteurs.

Liste des Illustrations du texte :

- Illustration 1** Position géographique des sites de Simbock et Tibati sur la carte du relief du Cameroun.
- Illustration 2** Gîtes favorables aux vecteurs *An. funestus* et *An. gambiae* à Tibati.

Liste des Tableaux du texte :

- Tableau 1** Description de la structure des sept locus microsatellites utilisés et séquences nucléotidiques des amorces.

Résumé

Plasmodium falciparum, le parasite responsable de la forme grave du paludisme, est majoritairement transmis en Afrique par les espèces anophèles *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*. Ces quatre vecteurs majeurs africains sont présents en sympatrie dans de nombreux contextes de transmission palustre. L'impact de l'hôte vecteur sur la structuration génétique de *P. falciparum* dans ses populations naturelles en Afrique aux échelles locale et régionale n'a encore jamais été exploré. Nous avons analysé individuellement pour sept marqueurs microsatellites les stades oocystes des populations naturelles du parasite *P. falciparum* échantillonnés au sein des espèces vectrices majeures dans trois sites de transmission intense en Afrique (deux sites au Cameroun et un site au Kenya). Les stades sanguins naturels de *P. falciparum* chez l'homme ont également été prélevés simultanément dans les deux sites camerounais. La diversité génétique, très élevée, est fortement structurée à l'échelle locale, au sein et entre infrapopulations parasitaires dans les moustiques, et peu au niveau régional entre sites. Le déficit en hétérozygote et le déséquilibre de liaison (DL) sont significatifs au sein des moustiques, hôtes définitifs du parasite, ce qui indique un régime de reproduction de *P. falciparum* combinant brassage génétique et autofécondation y compris dans les contextes de transmission palustre intense. L'impact de l'espèce vectrice sur la structure génétique du parasite n'est pas significatif, mais on observe des spécificités vectorielles dans les patrons de l'infection en oocyste. Les caractéristiques de l'infection à *P. falciparum* chez l'homme confirment l'intensité de la transmission au sein des sites (prévalence et multiplicité des infections négativement corrélées à l'âge des sujets), le faible nombre de mono-infections échantillonné n'autorisant pas une analyse statistiquement informative du DL. Ce type d'étude est primordial pour la compréhension de l'épidémiologie palustre et la mise en place sur le terrain de stratégies efficaces de lutte contre le paludisme.

Mots clés : paludisme, *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, insectes vecteurs, Cameroun, oocyste, microsatellite, consanguinité, structuration génétique

Population genetic structure of *Plasmodium falciparum*, causative agent of the lethal form of malaria, in its human and *Anopheles* vector hosts in Africa

Abstract

Plasmodium falciparum, the parasite responsible for the lethal form of malaria, is mainly transmitted in Africa by the four species *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. nili* and *An. moucheti*. These major African vectors are sympatric in a wide variety of malaria transmission settings. The impact of the *Anopheles* vector host on *P. falciparum* natural population genetic structure at the local and regional scale has never been investigated up to date. We have sampled, individually dissected and genetically analysed at seven microsatellite markers *P. falciparum* oocyst stages from the four vector species in three African sites of intense and perennial transmission (two in Cameroon and one in Kenya). We simultaneously sampled *P. falciparum* blood stages within human hosts in the two sites of Cameroon. The high genetic diversity was strongly structured at the local scale within and between mosquito infrapopulations, but not at the regional scale among sites. Inbreeding and linkage disequilibrium (LD) were significant within mosquito definitive hosts, selfing being combined to outcrossing in *P. falciparum* natural populations even in highly endemic malaria transmission settings. The vector species impact on the genetic structure of the parasite was not significant, but we observed a significant vectorial specificity in patterns of oocyst infection among vector host species. Patterns of *P. falciparum* infection in the human host confirmed the perennial malaria transmission intensity within both Cameroonian sites surveyed (prevalence and multiplicity of infections negatively correlated with age in both sites). Small mono-infected data sets precluded any statistically significant analyses of LD in *P. falciparum* blood stages. Such studies are of primary importance for a better understanding of malaria epidemiology and for an informed implementation of malaria control measures in the field.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, insect vector, Cameroon, microsatellite, oocyst, selfing, genetic structuration

Discipline : Parasitologie

Adresse des laboratoires

LIN (laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles), UR016, IRD
GEMI (Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses), UMR CNRS/IRD 2724
Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier
Cedex 5