



**HAL**  
open science

# Contribution des anophèles à la transmission de Plasmodium falciparum et de Plasmodium vivax à Madagascar. Mise en place d'une plateforme expérimentale pour l'étude de leur compétence vectorielle

Jessy Marlène Goupeyou Youmsi

## ► To cite this version:

Jessy Marlène Goupeyou Youmsi. Contribution des anophèles à la transmission de Plasmodium falciparum et de Plasmodium vivax à Madagascar. Mise en place d'une plateforme expérimentale pour l'étude de leur compétence vectorielle. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS178 . tel-02454304

**HAL Id: tel-02454304**

**<https://theses.hal.science/tel-02454304>**

Submitted on 24 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Sorbonne Université

École Doctorale Complexité du Vivant (ED515)

*Unité d'Immunologie des maladies infectieuses / Institut Pasteur de Madagascar*

*UMR2000 Génomique évolutive, modélisation et santé / Institut Pasteur*

## **Contribution des anophèles à la transmission de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* à Madagascar. Mise en place d'une plateforme expérimentale pour l'étude de leur compétence vectorielle.**

Par **Jessy Marlène GOUPEYOU YOUNSI**

Thèse de doctorat d'Entomologie/Parasitologie

Dirigée par Mme Catherine BOURGOUIN

Codirigée par Mme Inès VIGAN-WOMAS

Présentée et soutenue publiquement le 5 octobre 2018

Devant un jury composé de :

M. Teun BOUSEMA, Maître de conférences	Rapporteur
M. Christophe ROGIER, Professeur Agrégé Val de Grace	Rapporteur
M. Dominique HIGUET, Professeur Sorbonne Université	Examineur
M. Ivo MUELLER, Professeur Melbourne et Institut Pasteur	Examineur
Mme Isabelle MORLAIS, Directeur de Recherche	Examineur
Mme Inès VIGAN-WOMAS, Chargée de Recherche	Codirecteur de thèse
Mme Catherine BOURGOUIN, Directeur de Recherche	Directeur de thèse

## DÉDICACE

---

*À mes parents,*

*À mes sœurs et mon frère,*

*À mes filles,*

## REMERCIEMENTS

---

Ce travail a été réalisé d'une part au laboratoire d'Immunologie des maladies infectieuses de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et d'autre part au sein du Groupe Catherine Bourguin du laboratoire de Génétique fonctionnelle des maladies infectieuses (GFMI), à l'Institut Pasteur à Paris. Il a bénéficié d'un soutien financier de l'IPM, du Labex IBEID et du Réseau international des instituts Pasteur à travers une bourse doctorale Calmette et Yersin.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury d'avoir aimablement accepté de juger mes travaux, pour la lecture attentive de mon manuscrit et de se déplacer – de loin pour certains.

Au cours de mes quatre années de doctorat, il m'a été offert un cadre de travail agréable et une ambiance chaleureuse. Au moment où ce travail s'achève, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Le Professeur Christophe Rogier (Directeur de l'IPM entre 2011-2015), d'avoir permis la réalisation de mes travaux de thèse au sein de l'IPM, ainsi que pour ses conseils.

Le Professeur André Spiegel (Directeur de l'IPM depuis 2016), d'avoir assuré la continuité de la réalisation de mon projet de thèse à l'IPM.

Catherine, aucun mot n'est assez fort pour t'exprimer ma gratitude. Je te remercie primordialement d'avoir accepté de diriger ma thèse durant ces quatre années et pour la confiance que tu m'as accordée. Tu m'as appris beaucoup de choses sur le plan scientifique, tu as su m'encourager et me mettre la pression quand il fallait et tu m'as été d'un très grand soutien. J'ai vraiment eu la chance de t'avoir comme directrice de thèse. J'espère qu'aujourd'hui je fais ta fierté.

Inès, tout d'abord je te remercie d'avoir accepté de codiriger ma thèse. Tu as été la personne principale pour la réalisation de mon projet de thèse à Madagascar. Tu as utilisé de tous les moyens à ta disposition pour gérer les financements de telle sorte que je sois couverte du début jusqu'à la fin de mon doctorat, y compris mes déplacements.

Ousmane, j'ai beaucoup appris de toi scientifiquement et tu m'as permis de développer mon côté managérial. Tu as toujours été là pour me guider, me conseiller, m'encourager et me soutenir. Merci pour tout.

Le Docteur Georges Snounou, le Docteur Isabelle Morlais et le Docteur Florence Migot-Nabias d'avoir accepté d'être membres du jury de mes deux comités de thèse.

Le Docteur Sébastien Boyer (chef de l'Unité d'entomologie médicale (UEM) à l'IPM entre 2013 et 2016) et le Docteur Romain Girod (actuel chef de l'UEM) d'avoir accepté de mettre à

disposition les membres de leur équipe que je remercie aussi : Manda, Fidélis, Tsarasoa, Olga, Etienne, Rico et les autres, pour leur aide dans le maintien de l'insectarium de terrain.

Le Professeur Milijaona Randrianariveolosia, chef de l'Unité de recherche sur le paludisme (URP) de l'IPM, d'avoir accepté de mettre à disposition les spécialistes en microscopie de son équipe que je remercie aussi : Tianasoa et Rogelin.

Le Docteur Anavaj Sakuntabhai, Chef du laboratoire de GFMI, d'avoir accepté de m'accueillir dans son Unité. Ainsi que tous les autres membres de l'équipe pour leur disponibilité à m'aider et leur très bon accueil, particulièrement R. Paul, E. Simon-Lorière, C. Roux, M-T. Lecoq, M. Prot, I. Casademont, J-F Bureau, N. Gatsi et L. Ethève.

L'équipe de l'IMI. Emma, Rado, Tsiky, Donah, Fanirisoa et Zo pour leur participation dans la collecte, le traitement et l'analyse des échantillons de terrain ; Gérald, Anja et Nirry pour leur accompagnement dans les procédures administratives relatives à mes travaux de thèse.

L'équipe du « G4 malaria », Tsiry et Mihaja, pour leur participation aux captures de moustiques à Andriba et au maintien de l'insectarium de la plateforme.

Le staff du Centre de santé de base II (CSB II) d'Andriba à Madagascar. La sage-femme Odia pour sa disponibilité et sa participation à la sensibilisation des villageois ; Jean-Pierre le gardien et homme à tout faire ; le dentiste Richard et les médecins Emmanuel et David.

Nicolas Puchot, pour sa contribution dans mon projet de thèse aussi bien sur le terrain à Madagascar qu'au laboratoire à Paris et pour avoir toujours été disponible et à l'écoute.

Majoline Tchioffo, pour son expertise et sa participation lors des infections expérimentales. Ainsi que pour son caractère « speed » et sa sympathie.

Olaya Rendueles, pour m'avoir accordé une place dans son bureau, pour son écoute et les conseils ; les mêmes remerciements s'adressent à A. Buffet et M. Haudiquet

Keitly Mensah, Ismaël Alamou, Stéphanie Ramboarina, Claudia Filippone, Amélie Duréault, Jean-Marc Collard et Nicole Weynants, qui m'ont été d'un grand soutien tant sur le plan scientifique qu'amical.

## TABLE DES MATIÈRES

---

## Table des matières

TABLE DES MATIÈRES .....	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	11
ABRÉVIATIONS .....	14
GLOSSAIRE .....	17
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS .....	20
II. GÉNÉRALITÉS SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME .....	23
II.1. Épidémiologie .....	24
II.1.1. Fardeau mondial du paludisme .....	24
II.1.2. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar.....	25
II.2. Les parasites .....	29
II.2.1. Espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme.....	29
II.2.2. Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> .....	33
II.2.3. Antigènes parasitaires exprimés au cours du cycle .....	38
II.3. Les vecteurs.....	40
II.3.1. Cycle de développement des anophèles .....	41
II.3.2. Vecteurs de paludisme à Madagascar .....	44
II.4. Mesure de la transmission.....	48
II.4.1. Marqueurs sérologiques .....	49
II.4.2. Capacité vectorielle et autres indices entomologiques.....	50
II.5. Contrôle du paludisme .....	53
II.5.1. Lutte anti-parasitaire.....	53
II.5.2. Lutte anti-vectorielle .....	59
II.5.3. Lutte contre la transmission du <i>Plasmodium</i> : nouvelles approches.....	62
II.5.4. Cas de Madagascar.....	63
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	65
III.1. Collecte des larves d'anophèles .....	66
III.2. Capture des femelles gorgées dans les étables et les parcs à zébus.....	66
III.3. Pontes forcées.....	68
III.4. Nutrition et entretien des moustiques .....	69
III.5. Sélection des porteurs de <i>Plasmodium</i> .....	70
III.6. Infections expérimentales des anophèles par le <i>Plasmodium</i> .....	72
III.6.1. Préparation des moustiques.....	72
III.6.2. Prélèvement veineux .....	73
III.6.3. « Membrane Feeding Assay ».....	73

## Table des matières

III.7. Détection des oocystes sur estomacs de moustiques infectés.....	75
III.8. Analyses statistiques.....	75
IV. RÉSULTATS.....	76
Chapitre 1 .....	77
Résumé en français.....	78
<i>Anopheles mascarensis</i> , an endemic malaria vector of Madagascar: a species in evolution or a complex of sibling species?.....	79
INTRODUCTION.....	80
SYSTEMATIC POSITION.....	81
GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION .....	82
BIOLOGY.....	85
VECTOR ROLE OF <i>ANOPHELES MASCARENSIS</i> .....	87
<i>ANOPHELES MASCARENSIS</i> : A SPECIES IN FULL EVOLUTION OR A COMPLEX OF SIBLING SPECIES? .....	90
REFERENCES.....	91
Chapitre 2 .....	100
Résumé en français.....	101
Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar.....	102
ABSTRACT .....	103
INTRODUCTION.....	104
METHODS.....	105
RESULTS.....	112
DISCUSSION .....	124
CONCLUSION .....	128
REFERENCES.....	129
Chapitre 3 .....	136
IV.3.1. Résumé en anglais (Abstract).....	137
IV.3.2. Préambule.....	138
IV.3.3. Stratégie pour la mise en place de la plateforme.....	140
IV.3.4. Choix du site d'étude.....	141
IV.3.5. Entretien de l'insectarium .....	144
IV.3.6. Prévalence des infections palustres chez des enfants asymptomatiques.....	145
IV.3.7. Infections expérimentales des anophèles sauvages et de colonie par <i>Plasmodium</i> .....	148

## Table des matières

IV.3.8. Discussion .....	155
IV.3.9. Conclusion.....	160
V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	161
Première plateforme pour les infections expérimentales des anophèles par <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> à Madagascar.....	162
Compétence vectorielle des anophèles à la transmission de <i>P. falciparum</i> et de <i>P. vivax</i> à Madagascar : cas d' <i>An. arabiensis</i> et d' <i>An. mascarensis</i> .....	164
Différente contribution des vecteurs à la transmission du paludisme dans deux villages voisins dans la commune rurale d'Andriba .....	166
Pour terminer... ..	168
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	170
ANNEXES.....	I
Annexe 1.....	II
Annexe 2.....	III
Annexe 3.....	V
Annexe 4.....	VI
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	VII

## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

---

**Liste des figures**

Figure 1. Distribution mondiale du paludisme : pays et territoires avec des cas de paludisme autochtone en 2000 et leur statut en 2016. .... 24

Figure 2. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar. .... 28

Figure 3. Cycle de développement de *P. falciparum*. .... 34

Figure 4. Cinétique de développement de *P. falciparum* chez l'anophèle. .... 37

Figure 5. Quelques antigènes parasitaires exprimés au cours du cycle de vie de *Plasmodium* 39

Figure 6. Carte mondiale des espèces dominantes vectrices de paludisme. .... 41

Figure 7. Cycle de développement des anophèles. .... 42

Figure 8. Système vectoriel : agent pathogène, vecteur, hôte et environnement. .... 48

Figure 9. Schéma de la capacité vectorielle. .... 51

Figure 10. Candidats vaccins antipaludiques actuellement en développement clinique. .... 56

Figure 11. Collecte des moustiques. .... 67

Figure 12. Ponte forcée. .... 68

Figure 13. Sélection des porteurs de *Plasmodium* ..... 71

Figure 14. Dispositif pour les infections expérimentales des anophèles par le *Plasmodium*... 74

Figure 15. Site d'étude pour la mise en place de la plateforme ..... 142

Figure 16. Plateforme à Andriba. .... 144

Figure 17. Taux d'infection d'*An. arabiensis* par *P. falciparum* et *P. vivax* des expériences réalisées durant les saisons 2017 et 2018. .... 150

Figure 18. Densité oocystique de *P. falciparum* et de *P. vivax* chez *An. arabiensis*. .... 151

Figure 19. Estomac d'*An. arabiensis* présentant des oocystes de *P. vivax* sept jours post-infection. .... 152

Figure 20. Taux d'infection d'*An. arabiensis* et d'*An. mascarensis* par deux porteurs différents de *P. falciparum* de la saison 2018. .... 154

## Liste des tableaux et figures

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des cinq espèces de <i>Plasmodium</i> responsables du paludisme chez l'homme.....	31
Tableau 2 : Principales caractéristiques des six espèces d'anophèles vectrices de paludisme à Madagascar.....	46
Tableau 3 : Prévalences des infections à <i>Plasmodium</i> chez des enfants asymptomatiques durant les saisons de transmission du paludisme des années 2016, 2017 et 2018, à Andriba et Antanimbary.....	147
Tableau 4 : Bilan des infections expérimentales d' <i>An. arabiensis</i> et d' <i>An. mascarensis</i> par <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> .....	149
Tableau 5 : Parasitémie du porteur et densité oocystique moyenne des infections d' <i>An. arabiensis</i> par <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> , durant les saisons 2017 et 2018. ....	153

## ABRÉVIATIONS

---

## Abréviations

**ACT** : Artemisinin-based combination therapy  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AMA1** : Apical membrane antigen 1  
**ASAQ** : Artésunate-amodiaquine  
**CAID** : Campagne d'aspersion intra-domiciliaire  
**CDC** : Center for disease control and prevention  
**CRISPR** : Clustered regularly interspaced short palindrome repeats  
**CSB** : Centre de santé de base  
**CSP** : Circumsporozoite protein  
**DDT** : Dichloro-diphényl-trichloroéthane  
**EIR** : Entomological inoculation rate  
**ELISA** : Enzyme linked immunosorbent assay  
**EPP** : Ecole primaire publique  
**F0** : moustiques de génération 0  
**F1** : moustique de première génération  
**G6PD** : glucose-6-phosphate-déshydrogénase  
**GFMI** : Génétique fonctionnelle des maladies infectieuses (unité de recherche)  
**GLURP** : Glutamate-rich protein  
**HBI** : Human blood index  
**IC** : Indice de confiance  
**INSTAT** : Institut national de la statistique  
**IPM** : Institut Pasteur de Madagascar  
**IS** : Indice sporozoïtique  
**j7PI** : jour 7 post-infection  
**LAV** : Lutte anti-vectorielle  
**LSA** : Liver stage antigen  
**MALDI-TOF** : Matrix assisted laser desorption ionisation - Time of flight  
**MEDALI** : Mission d'étude des déterminants de l'accès aux méthodes de lutte antipaludique et de leur impact.  
**MID** : Moustiquaires imprégnées d'insecticide à efficacité durable  
**MSP** : Merozoite surface protein

## Abréviations

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PBS**: Phosphate-buffered saline

**PBST**: Phosphate-buffered saline - Tween®20

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PfEMP1** : *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1

**PNLP** : Programme national de lutte contre le paludisme

**PvDBP** : *Plasmodium vivax* duffy binding protein

**PvEPB** : *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein

**RH5** : Reticulocyte binding homolog 5

**RTS,S** : « **R** » représente la région répétée centrale de la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium falciparum*, « **T** » les épitopes des cellules T de la protéine circumsporozoïte et « **S** » l'antigène de surface de l'hépatite B. Ceux-ci sont combinés en une seule protéine de fusion « **RTS** » et s'assemblent spontanément avec la protéine libre « **S** » pour donner les particules RTS,S.

**s.l.** : sensu lato

**s.s.** : sensu stricto

**S-P** : sulfadoxine-pyriméthamine.

**TBV** : Transmission-blocking vaccines

**TDR** : Test de diagnostic rapide

**TPI** : Traitement préventif intermittent

**TRAP** : Thrombospondin-related antigen

**WHO** : World health organization

## **GLOSSAIRE**

---

Les termes ci-dessous sont définis dans le contexte de ma thèse, en rapport avec le paludisme.

**Anthropophile/Zoophile** : en rapport avec le choix de l'hôte vertébré, qualifie un moustique qui prend son repas de sang sur l'homme (anthropophile) ou sur un animal (zoophile). Les termes anthropophage et zoophage ont la même définition.

**Capacité vectorielle** : nombre moyen quotidien de piqûres infectantes à partir d'un cas humain infecté en contact avec une population anophélienne. Elle inclut la compétence vectorielle et permet de mesurer la transmission du paludisme.

**Compétence vectorielle** : aptitude d'un vecteur à permettre le développement d'un pathogène, de son ingestion dans un repas sanguin à sa maturation dans ses glandes salivaires, lui permettant alors de transmettre le pathogène à l'hôte vertébré. Elle dépend des facteurs génétiques et physiologiques du vecteur.

**Cycle gonotrophique** : succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez un anophèle femelle entre deux repas de sang successifs et qui dure deux à trois jours chez les femelles ayant déjà effectué au moins une ponte.

**Endophage/Exophage** : en rapport avec le lieu d'alimentation, qualifie un moustique qui prend son repas de sang à l'intérieur (endophage) ou à l'extérieur (exophage) des habitations.

**Endophile/Exophile** : en rapport avec le comportement après la prise du repas de sang, qualifie un moustique qui se repose à l'intérieur (endophile) ou à l'extérieur (exophile) des habitations pendant le cycle gonotrophique.

**Facès épidémiologique** : ensemble de lieux où le paludisme présente des caractéristiques épidémiologiques identiques dont la stabilité, l'immunité des populations ainsi que la quantité et saisonnalité de la transmission.

**Fièvre tierce/quarte** : variété de fièvre intermittente au cours de laquelle les épisodes d'hyperthermie réapparaissent le troisième (tierce) ou le quatrième (quarte) jour.

**Fokontany** : terme malgache qui désigne un village, un hameau ou un quartier.

**Gamétocyte** : premier stade sexuel du cycle de vie du *Plasmodium* et seul stade à pouvoir continuer son développement chez le moustique, il se forme au cours de la phase érythrocytaire chez l'homme.

**Ookinète** : mobile et de forme allongée, c'est un des stades du cycle de vie du *Plasmodium* qui se forme après la conjugaison des gamètes mâles et femelles dans l'estomac du moustique. Quand il s'enkyste dans la paroi stomacale du moustique, il prend le nom d'**oocyste**.

**Prémunition** : immunité acquise progressivement en zone d'endémie palustre suite à une exposition continue à l'agent pathogène. Non stérilisante, elle ne permet pas de se débarrasser totalement du parasite mais réduit la charge parasitaire et atténue les symptômes associés au paludisme.

**Prépatence** : temps qui s'écoule entre l'introduction du parasite dans l'organisme hôte et l'apparition de formes ou de manifestations détectables par les méthodes biologiques.

**Schizogonie** : multiplication asexuée du *Plasmodium* qui se déroule chez l'homme et caractérisée par des divisions multiples de la cellule mère aboutissant à la formation des mérozoïtes.

**Sporogonie** : multiplication asexuée du *Plasmodium* qui se déroule chez le moustique et caractérisée par des divisions multiples dans l'oocyste aboutissant à la formation de nombreux sporozoïtes. Selon certains auteurs, elle correspond à l'ensemble du cycle du *Plasmodium* chez l'anophèle, de la formation des gamètes à la maturation des sporozoïtes.

## **I. INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS**

---

Par sa fréquence et sa gravité, le paludisme demeure l'une des principales parasitoses humaines. On estime à 3,3 milliards – la moitié de la population mondiale – le nombre de personnes vivant dans des zones à risque de transmission du paludisme (Center for disease control and prevention (CDC), 2018b). L'Afrique subsaharienne, partie du monde regorgeant 13,3 % de la population mondiale en 2016 (United nations, Department of economic and social affairs, population division, 2017), enregistre à elle seule 90 % des cas et des décès associés au paludisme (WHO, 2017). En effet, le paludisme ou malaria est une maladie infectieuse potentiellement mortelle due à un parasite appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe trois modes de transmission de cette maladie : par piqûre d'un moustique femelle infectée appartenant au genre *Anopheles*, de loin le mode d'infection le plus important ; par transfusion sanguine de sang infecté (*in* Verra *et al.*, 2018 ; Faruk, 2016 ; Owusu-Ofori *et al.*, 2010) ; et par transmission trans-placentaire de la mère vers l'enfant (*in* Uneke, 2011). Toutes les deux minutes, un enfant meurt du paludisme et les experts craignent que ce taux de mortalité puisse augmenter sans de meilleurs progrès et davantage de fonds pour lutter contre cette maladie (Al Nowais, 2017). De plus, le paludisme entraîne des pertes économiques importantes dans les pays à forte transmission. Le contrôle de cette maladie passe par deux grandes stratégies : la lutte directe contre le parasite chez l'homme<sup>1</sup> via les antipaludiques et la lutte contre le moustique vecteur via les insecticides. Cependant, le parasite et le vecteur ont tous deux développé des mécanismes de résistances aux antipaludiques et aux insecticides respectivement. Une alternative pour pallier ce phénomène de résistance est le développement d'un vaccin ciblant le parasite chez l'homme. Mais les candidats vaccins en cours n'ont pas encore montré une efficacité totale à grande échelle ; le vaccin antipaludique le plus avancé à ce jour et qui est entré en phase 4 cette année (WHO, 2018a), n'a pas montré une efficacité totale et cette efficacité n'a été prouvée que chez les enfants. C'est pourquoi, les stratégies actuelles de contrôle du paludisme visent à limiter ou interrompre le développement du parasite chez le moustique vecteur. Pour cela, il est nécessaire d'améliorer notre compréhension des interactions entre le vecteur *Anopheles*, son environnement et le parasite *Plasmodium*, particulièrement sur la compétence vectorielle.

---

<sup>1</sup> D'après le dictionnaire de l'Académie française 9ème édition, le sens premier du mot « homme » désigne l'espèce humaine en général. Il prend la majuscule quand il est employé absolument (mammifère de l'ordre des Primates possédant au plus haut degré les caractères définissant le genre *Homo*) (Centre national des ressources textuelles et lexicales, 2012). Dans le cadre de ma thèse, je vais utiliser « homme » (avec h minuscule) pour renvoyer à l'espèce humaine.

La compétence vectorielle dépend des facteurs intrinsèques au vecteur qui peuvent ou non permettre le développement du parasite. Donc, l'aptitude d'un anophèle à transmettre une espèce de *Plasmodium* à l'homme, peut varier d'une espèce anophélienne à une autre. Véritable melting-pot des civilisations africaine, asiatique, indienne et européenne, Madagascar n'a pas échappé à la grande diversité du paludisme, accentuée par son caractère insulaire. En effet, on retrouve sur l'ensemble du pays, quatre des cinq espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*) ainsi que les principaux vecteurs rencontrés en Afrique continentale (*Anopheles gambiae* sensu lato et *Anopheles funestus*), en plus d'*Anopheles mascarensis* qui est une espèce vectrice endémique de Madagascar. De plus, aucune étude sur la compétence vectorielle des anophèles malgaches à la transmission du *Plasmodium* n'avait encore été faite dans le pays. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'étudier la contribution des anophèles à la transmission de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax*, parasites les plus prévalents à Madagascar, avec mise en place d'une plateforme expérimentale pour l'étude de leur compétence vectorielle. Ainsi, mon projet de thèse se décompose en trois objectifs dont chacun fait l'objet d'un chapitre :

- approfondir les connaissances sur *An. mascarensis*, à travers une revue de la littérature et l'analyse de la base de données disponible à l'Institut Pasteur de Madagascar (chapitre 1) ;
- estimer la contribution des vecteurs à la transmission de *Plasmodium* dans deux villages voisins dans la commune rurale d'Andriba (chapitre 2) ; et
- étudier la compétence vectorielle des anophèles malgaches à transmettre *P. falciparum* et *P. vivax*, objectif qui a été atteint après l'installation d'une plateforme expérimentale pour les infections (chapitre 3).

Le plan de ma thèse est classique. Il comporte cinq grandes parties dont celle-ci (partie I), intitulée « Introduction générale et objectifs ». La partie II « Généralités sur la transmission du paludisme » est une revue de littérature. Dans la partie III « Matériel et méthodes », je n'ai mentionné que les méthodes qui ne figurent pas dans les articles. La partie IV « Résultats » présente les résultats des trois chapitres ; les chapitres 1 et 2 font chacun l'objet d'un article et le chapitre 3 est présenté sous forme de manuscrit. Enfin, la partie V « Discussion générale et perspectives » présente les conclusions de mes quatre années de thèse.

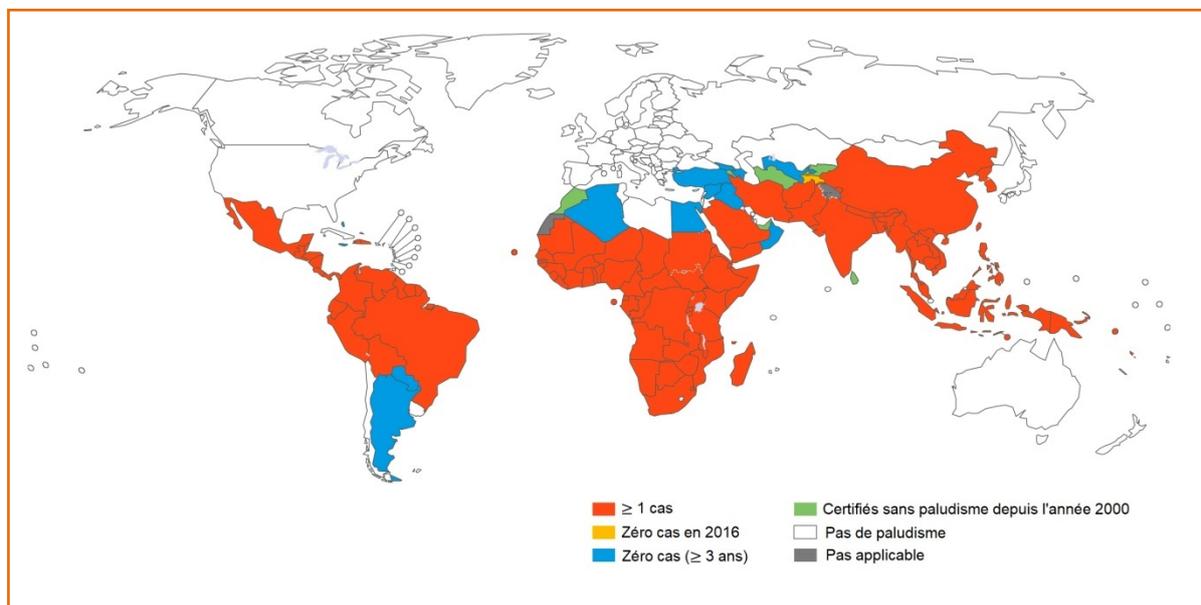
## **II. GÉNÉRALITÉS SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME**

---

## II.1. Épidémiologie

### II.1.1. Fardeau mondial du paludisme

Environ la moitié de la population mondiale est exposée au risque de paludisme. Ainsi, l'Organisation mondiale de la santé (OMS<sup>2</sup>), estime à 216 millions le nombre de cas et à 445 000 le nombre de décès dus au paludisme dans le monde en 2016 (WHO, 2017). Malgré une réduction de 18 % de son incidence mondiale entre 2010 et 2016, le paludisme demeure l'une des principales parasitoses humaines dont la plupart des cas sont enregistrés en Afrique subsaharienne (figure 1). En zone de forte transmission du paludisme, la population est exposée en permanence aux piqûres infectantes du moustique. La répétition des infections palustres permet l'acquisition plus ou moins rapide d'une immunité contre la maladie : c'est la prémunition. C'est pourquoi, en plus des femmes enceintes, les enfants de moins de cinq ans et les voyageurs non immunisés en provenance de régions exemptes de paludisme sont les plus vulnérables à cette affection.



**Figure 1. Distribution mondiale du paludisme : pays et territoires avec des cas de paludisme autochtone<sup>3</sup> en 2000 et leur statut en 2016.**

D'après l'OMS, 2017, modifié. (WHO, 2017).

<sup>2</sup> OMS = WHO « World health organization », sigle que j'utiliserai pour citation.

<sup>3</sup> Cas de paludisme autochtone : c'est-à-dire survenant suite à une contamination dans le territoire-même ; en opposition aux cas importés.

A Madagascar où mes travaux de thèse ont été menés, la mortalité liée au paludisme et pour tout âge confondu, est passée de 15 % en 2003 à 19,4% en 2013 (Programme national de lutte contre le paludisme, 2016). En 2016, environ un million et demi de cas de paludisme et 4000 décès ont été enregistrés pour une population d'environ 23 millions d'habitants (WHO, 2017). Preuve que le paludisme demeure un problème de santé majeur dans ce pays.

### II.1.2. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar

La stratification du paludisme permet d'identifier, de caractériser et de délimiter les différents types de situations épidémiologiques pour lesquelles différentes stratégies de lutte pourront être appliquées (*in* Yaro, 2008). Cet ensemble de zones où le paludisme présente des caractéristiques épidémiologiques similaires (durée et saisonnalité de la transmission, stabilité, prévalence, immunité des populations), s'appelle faciès épidémiologique (Mouchet et Blanchy, 1995). A Madagascar, on distingue quatre faciès épidémiologiques du paludisme (Mouchet *et al.*, 2004, 1993).

- **Le faciès équatorial** occupant la côte Est et l'extrême Nord. La pluviosité élevée sans saison sèche marquée ainsi qu'une température moyenne minimale supérieure à 20 °C, sont à l'origine d'un paludisme stable et d'une transmission pérenne. Les enfants de moins de cinq ans sont plus touchés et la faible morbidité chez les adultes témoigne d'une prémunition.
- **Le faciès tropical** occupant la côte Ouest. Ici, la pluviosité moyenne et une température moyenne minimale toujours supérieure à 20°C, sont responsables d'un paludisme stable et d'une transmission saisonnière supérieure à six mois, en lien avec la saison des pluies. Y est associée une prémunition vers l'âge de dix ans.
- **Le faciès du Sud** occupant toute la partie Sud du pays semi-aride, à l'exception de l'extrême Sud-Est (faciès équatorial). La pluviosité faible et une température moyenne minimale comprise entre 15 et 20 °C, entraînent un paludisme très instable et une transmission saisonnière courte – deux à quatre mois – liée à la saison des pluies. Toutes les classes d'âge de la population sont affectées avec peu ou pas de prémunition.

- **Le faciès des Plateaux** occupant le Centre de la Grande Île et constitué par des séries de cuvettes mal drainées. La pluviosité moyenne, une saison sèche bien tranchée de cinq à six mois et une température moyenne minimale comprise entre 10 et 15 °C, sont à l'origine d'un paludisme instable et d'une transmission saisonnière très faible. Dans des cuvettes au climat plus clément et favorables à la culture du riz, le paludisme peut acquérir une certaine stabilité ; les rizières constituant les principaux gîtes larvaires des vecteurs du paludisme sur les plateaux malgaches (Laventure *et al.*, 1996). Dans certaines localités où il y a absence de prémunition, la morbidité est similaire chez les enfants et les adultes et le paludisme se manifeste souvent sous forme d'épidémies meurtrières.

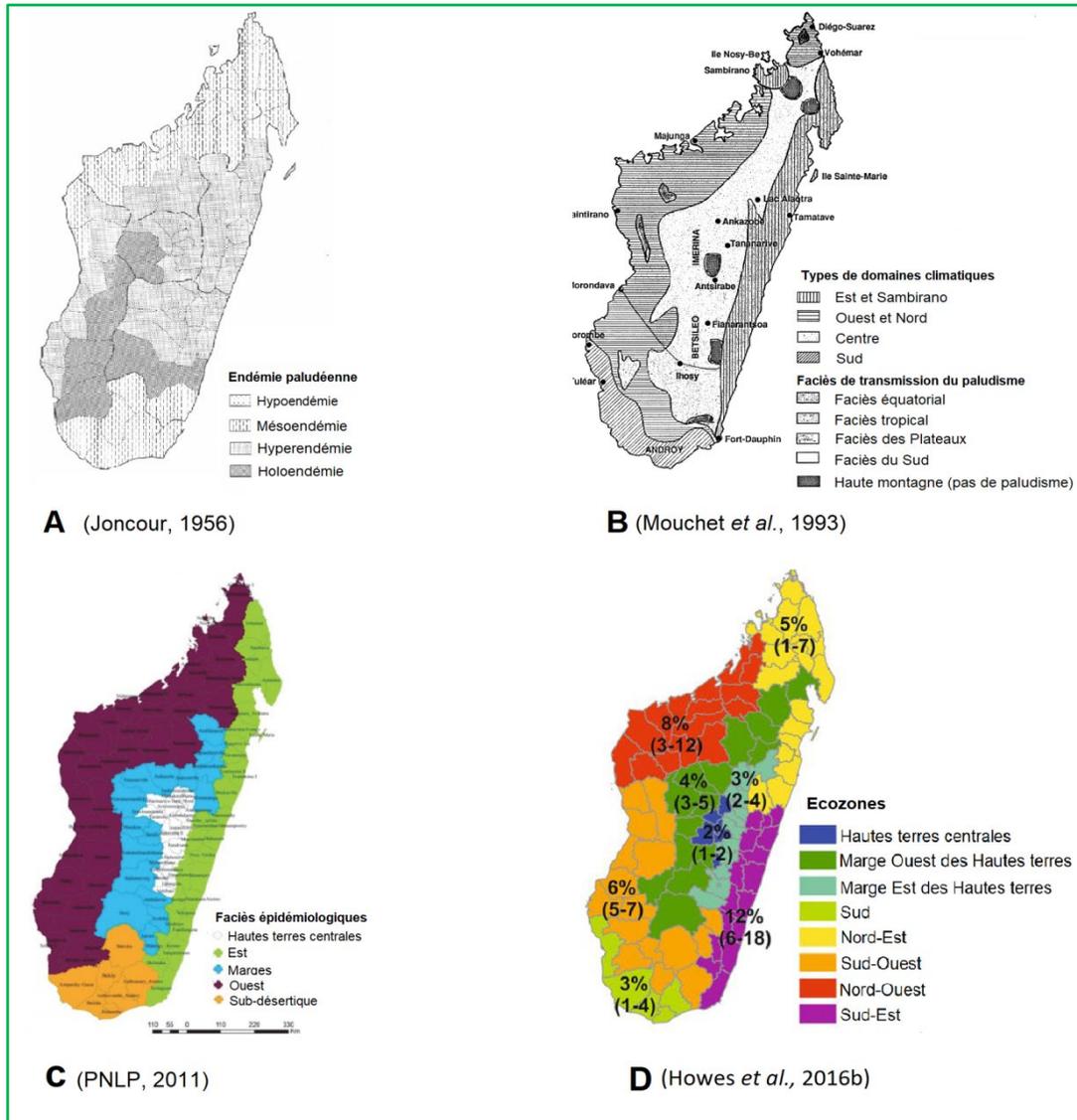
Dans les hautes terres centrales (hautes montagnes), avec une altitude supérieure à 1700 m et une température moyenne minimale comprise entre 5 et 10 °C, le paludisme est généralement absent (Mouchet *et al.*, 1993). L'épidémiologie y différerait car constituée principalement de cas importés et avec une très faible incidence par rapport aux autres écozones (Howes *et al.*, 2016b).

La stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar a connu plusieurs modifications depuis les années 1950. Non seulement les critères d'établissement des cartes de stratification diffèrent selon les auteurs, mais le faciès épidémiologique n'est figé ni dans le temps ni dans l'espace. De ce fait il est nécessaire d'évaluer régulièrement les modalités de transmission du paludisme. La première carte de stratification du paludisme à Madagascar, obtenue d'après les indices spléniques, a été élaborée par Joncour en 1956 (Joncour, 1956). Avant 1949, quatre niveaux d'endémies palustres<sup>4</sup> ont été identifiés chez des enfants de zéro à quinze ans : l'hypoendémie, la mésoendémie, l'hyperendémie et l'holoendémie (figure 2A). Compte tenu des divers domaines biogéographiques de Madagascar et en se basant sur l'ensemble des données épidémiologiques disponibles à ce moment-là, Mouchet et collaborateurs ont proposé en 1993 une stratification épidémiologique du paludisme en quatre faciès représentés sur la figure 2B (Mouchet *et al.*, 1993). J'ai énoncé et développé ces

---

<sup>4</sup> La conférence du paludisme à Kampala (Afrique équatoriale) en novembre 1950, propose une classification pratique des divers degrés d'endémie palustre en fonction de l'indice splénique chez les enfants de deux à dix ans (valeurs en % ci-après). Hypoendémie : de 0 à 10 % ; mésoendémie : de 11 à 50 % ; l'hyperendémie : de 51 à 75 % ; l'holoendémie : plus de 75 %. L'indice splénique est très faible chez les adultes en situation d'holoendémie (Carnevale *et al.*, 1984a).

derniers au début de cette partie (faciès équatorial, faciès tropical, faciès du Sud et faciès des Plateaux). En 2011, le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP, devenu aujourd'hui Direction de lutte contre le paludisme ou DLP) et ses collaborateurs, ont mis à jour la stratification de 1993 (*in* Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016). Les modifications apportées sur cette dernière carte concernent principalement la délimitation géographique des faciès épidémiologiques (figure 2C). Plus récemment, en se basant sur l'intensité de la transmission, Howes et collaborateurs (Howes *et al.*, 2016b) ont proposé une stratification du paludisme en huit écozones (figure 2D). L'intensité de la transmission ici correspond à la prévalence des infections à *P. falciparum* au niveau communautaire, obtenue chez des enfants âgés de deux à dix ans, entre 2010 et 2015. Les huit écozones sont : Les Hautes terres centrales avec une prévalence moyenne des infections à *P. falciparum* égale à 2 %, la marge Ouest des Hautes terres avec 4 %, la marge Est des Hautes terres avec 3 %, le Sud avec 3 %, le Nord-Est avec 5 %, le Sud-Ouest avec 6 %, le Nord-Ouest avec 8 % et le Sud-Est avec 12 %.



**Figure 2. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar.**

**A. Répartition de l'endémie paludéenne avant 1949, d'après Joncour, 1956.** Sur les 80 districts du territoire, 11 étaient holo-endémiques, 42 hyper-endémiques, 27 méso-endémiques. **B. Stratification du paludisme en quatre faciès épidémiologiques, d'après Mouchet *et al.*, 1993.** On distingue : le faciès équatorial (domaines de l'Est et du Sambirano), le faciès tropical (domaine de l'Ouest au Nord de Morondava), le faciès des Plateaux (domaine du Centre constitué par des séries de cuvettes mal drainées) et le faciès du Sud (sur ligne Morondava-Ihosy, à l'exception de l'extrême Sud-Est.). En Haute montagne, il n'y a pas de paludisme. **C. Stratification du paludisme en quatre faciès épidémiologiques, d'après le PNL, 2011.** « Est » correspond au faciès équatorial ; « Ouest » correspond au faciès tropical ; « Marges » correspond au faciès des Plateaux ; « Sud » correspond au faciès du Sud ; « Hautes terres centrales » correspond aux montagnes où il n'y a pas de paludisme. **D. Stratification du paludisme en huit écozones, selon Howes *et al.*, 2016b.** Les proportions (en %) représentent les prévalences moyennes des infections à *P. falciparum* avec les minimum et maximum entre parenthèses.

## II.2. Les parasites

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire unicellulaire qui ne peut survivre en dehors de son hôte. Il appartient à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoea*, à la sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Euccocida*, au sous-ordre des *Haemosporina*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Plus de 200 espèces du genre *Plasmodium* sont reconnues et de nouvelles espèces continuent d'être décrites chez les mammifères, oiseaux et reptiles (Perkins et Austin, 2009).

### II.2.1. Espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme

Parmi toutes les espèces de *Plasmodium* identifiées dans le monde, cinq sont responsables du paludisme chez l'homme. Les caractéristiques de chacune de ces cinq espèces sont résumées dans le tableau 1 et présentées ci-dessous.

***Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)** : espèce la plus pathogène, elle est présente mondialement dans les régions tropicales, particulièrement en Afrique subsaharienne. Le délai de prépatence est de douze jours en moyenne et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce maligne. La première infection est sévère et peut engendrer des complications susceptibles d'entraîner la mort du sujet infecté en l'absence de traitement.

***Plasmodium vivax* (Grassi et Feletti, 1890)** : espèce présente dans de nombreuses parties du monde avec *P. falciparum*. Moins exigeante en température que *P. falciparum* durant sa phase de développement chez le moustique, elle se retrouve aussi dans les régions tempérées. *P. vivax* est surtout prévalent en Asie, en Amérique latine et quelques pays d'Afrique. Le délai de prépatence est de huit à vingt-sept jours (Coatney *et al.*, 1971) et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce bénigne. Capable de persistance à l'état latent dans le foie de l'homme sous forme d'hypnozoïte, *P. vivax* peut entraîner des cas de rechute jusqu'à huit ans après la première infection.

***Plasmodium ovale* (Stephens, 1922)** : moins prévalente, c'est une espèce trouvée principalement en Afrique (surtout à l'Ouest) et dans les îles du Pacifique occidental (Center for disease control and prevention (CDC), 2018a). Le délai de prépatence est d'environ seize jours et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre tierce bénigne. Tout comme

*P. vivax* dont il est similaire morphologiquement et biologiquement, *P. ovale* peut persister sous forme endormie dans le foie et entraîner des cas de rechute des années après la première infection.

***Plasmodium malariae* (Grassi et Feletti, 1890)<sup>5</sup>** : espèce à distribution mondiale mais très inégale, elle est présente en Asie, en Afrique (subsaharienne et du Nord), en Amériques Centrale et du Sud. Le délai de prépatence est de seize à cinquante-neuf jours (Collins et Jeffery, 2007) et les accès thermiques se présentent sous forme de fièvre quarte. La durée de l'infection à *P. malariae* est très longue et peut aller à jusqu'à cinquante-trois ans (Carnevale *et al.*, 1984b). Cette espèce a été trouvée chez les chimpanzés et gorilles au Cameroun (Collins et Jeffery, 2007).

***Plasmodium knowlesi* (Sinton et Mulligan, 1932)<sup>6</sup>** : espèce parasitant principalement les macaques, elle est reconnue comme agent pathogène émergeant dans la population humaine en Asie du Sud-Est (Cox-Singh, 2018). Bien que sa morphologie ressemble à celle de *P. malariae*, *P. knowlesi* a une symptomatologie similaire à celle de *P. falciparum*, pouvant conduire à la mort de l'homme infecté (Cox-Singh *et al.*, 2010). Le délai de prépatence dure neuf à douze jours (Coatney *et al.*, 1971).

En 2016, *P. falciparum* a été à l'origine de 99 % des cas de paludisme enregistrés en Afrique subsaharienne où il est le plus prévalent. Hors Afrique, c'est *P. vivax* qui prédomine. Il a été à l'origine de 64 % des cas de paludisme en Amériques Centrale et Sud, de plus de 30 % des cas dans la Méditerranée orientale et de plus de 40 % en Asie du Sud-Est (WHO, 2017). A Madagascar, quatre des cinq espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme sont retrouvées. Ainsi, *P. falciparum* prédomine dans la plupart des régions et est responsable de plus de 90 % des cas, *P. vivax* présente des cas rapportés dans des poches régionales tandis que *P. malariae* et *P. ovale* sont détectés sous forme de cas sporadiques (Howes *et al.*, 2016b ; Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016 ; Kesteman *et al.*, 2014).

---

<sup>5</sup> *P. malariae* a été découvert par Laveran en 1880, mais ce sont Grassi et Feletti qui le nommeront plutarde en 1890 après l'avoir distingué de *P. vivax* (Collins et Jeffery, 2007).

<sup>6</sup> La description détaillée de *P. knowlesi* a été faite par Sinton et Mulligan (en 1932) qui le nommeront ainsi en hommage à Knowles et Das Gupta qui ont décrit et maintenu les formes sanguines (Coatney *et al.*, 1971).

## Généralités sur la transmission du paludisme

**Tableau 1** : Résumé des caractéristiques des cinq espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'homme.

Espèce	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>Description détaillée</b>	Welch, 1897	Grassi et Feletti, 1890	Stephens, 1922	Grassi et Feletti, 1890	Sinton et Mulligan, 1932
<b>Distribution géographique</b>	Mondiale, surtout en Afrique subsaharienne	Mondiale, surtout en Asie et en Amérique latine	Afrique subsaharienne et îles du Pacifique Ouest	Mondiale mais inégale : Asie, Afrique et Amérique	Asie du Sud-Est
<b>Type de fièvre</b>	Tierce maligne	Tierce bénigne	Tierce bénigne	Quarte	Quotidienne
<b>Délai de prépatence</b>	9 à 14 jours	8 à 27 jours ; peut aller à 6-12 mois	10 à 20 jours	16 à 59 jours, en fonction des isolats	9 à 12 jours
<b>Durée du cycle exo-érythrocytaire</b>	5 à 7 jours	6 à 8 jours	9 jours	14 à 16 jours	5 jours
<b>Durée du cycle érythrocytaire</b>	48 heures	48 heures	49 à 50 heures	72 heures	24 heures
<b>Durée du cycle sporogonique</b>	9 à 10 jours (à 27 °C)	6 à 13 jours (à 27 °C)	12 à 14 jours (à 27 °C)	14 à 16 jours (à 27 °C)	9 à 10 jours (à 25 °C)
<b>Forme hypnozoïtes</b>	Non	Oui	Oui, 17 à 255 jours	Non, mais les stades sanguins peuvent persister longtemps.	Non
<b>Apparition des gamétocytes</b>	15 jours après l'accès palustre	Dès le premier cycle érythrocytaire	En même temps que les asexués, cycle de 49 h.	Mal défini/ inoculation de sporozoïtes.	Non documenté
<b>Caractéristiques spécifiques</b>	Séquestration des gamétocytes dans la moelle osseuse.	Envahit les réticulocytes ; parasitémie sanguine faible ; nécessité de l'antigène Duffy, mais pas aussi strict qu'initialement affirmé ; deux variants majoritaires/gènes CSP (VK210 et VK247).	Envahit les réticulocytes ; parasitémie sanguine faible ; difficile à distinguer de <i>P. vivax</i> et aurait pu être confondu avec celui-ci en Afrique subsaharienne ; deux types sur la base de la divergence de la séquence du gène 18S rRNA.	Envahit les érythrocytes de préférence "vieux" ; parasitémie sanguine faible ; La forte charge gamétocytaire n'infecterait pas les moustiques ;	Envahit les réticulocytes ; nécessite l'antigène Duffy ; parasitémie sanguine élevée ; séquestration dans le cerveau, le cœur et les reins. Parfois, confondu avec <i>P. vivax</i> en Asie du Sud-Est ;
<b>Complications</b>	Détresse respiratoire ; Anémie ; obstruction des vaisseaux sanguins ; mort	Rares	Rares	Syndrome néphrotique ; Infections chroniques qui peuvent durer toute la vie.	Disfonction hépatorénale ; mort.

Références du tableau 1

- Amir, A., Russell, B., Liew, J. W. K., Moon, R. W., Fong, M. Y., Vythilingam, I., ... Lau, Y. L. (2016). **Invasion characteristics of a *Plasmodium knowlesi* line newly isolated from a human.** *Scientific Reports*, 6(1).
- Andolina, C., Landier, J., Carrara, V., Chu, C. S., Franetich, J.-F., Roth, A., ... Nosten, F. (2015). **The suitability of laboratory-bred *Anopheles cracens* for the production of *Plasmodium vivax* sporozoites.** *Malaria Journal*, 14(1).
- Anstey, N. M., Douglas, N. M., Poespoprodjo, J. R. et Price, R. N. (2012). ***Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis.** Dans *Advances in Parasitology.*, 80 (p. 151-201). Elsevier. 80 vol.
- Balabaskaran Nina, P., Mohanty, A. K., Ballav, S., Vernekar, S., Bhinge, S., D'souza, M., ... Rathod, P. K. (2017). **Dynamics of *Plasmodium vivax* sporogony in wild *Anopheles stephensi* in a malaria-endemic region of Western India.** *Malaria Journal*, 16.
- Bronner, U., Divis, P. C., Farnert, A. et Singh, B. (2009). **Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo: a case report.** *Malaria Journal*, 8(1), 15.
- Carnevale, P., Baudon, D., Molez, J.-F. et Guiguemde, T. R. (1984b). **Aspects classiques et modernes des cycles de développement des plasmodiums humains.** *Etudes Médicales*, 2, 61-78.
- Center for disease control and prevention (CDC). (2018, 17 avril). **Malaria parasites.** Dans [www.cdc.gov](https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html). Récupéré de <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>.
- Coatney, G., Collins, W., Warren, M. et Contacos, P. (1971). ***The primate malarias.*** Washington, D.C. 20402: U.S. Government Printing Office.
- Collins, W. E. et Jeffery, G. M. (2007). ***Plasmodium malariae*: parasite and disease.** *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 579-592.
- Collins, William E. (2012). ***Plasmodium knowlesi*: A malaria parasite of monkeys and humans.** *Annual Review of Entomology*, 57(1), 107-121.
- Collins, William E. et Jeffery, G. M. (2005). ***Plasmodium ovale*: parasite and disease.** *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 570-581.
- Collins, William E., Warren, M., Huong, A. Y., Skinner, J. C., Sutton, B. B. et Stanfill, P. S. (1986). **Studies of comparative infectivity of fifteen strains of *Plasmodium vivax* to laboratory-reared anopheline mosquitoes, with special reference to *Anopheles culicifacies*.** *The Journal of Parasitology*, 72(4), 521-524.
- Cox-Singh, J. (2018). ***Plasmodium knowlesi*: experimental model, zoonotic pathogen and golden opportunity?** *Parasitology*, 145(1), 1-5.
- Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., ... Krishna, S. (2010). **Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report.** *Malaria Journal*, 9(10), 1-7.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., ... Singh, B. (2008). ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening.** *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 165-171.
- McKenzie, F. E., Jeffery, G. M. et Collins, W. E. (2002). ***Plasmodium vivax* blood-stage dynamics.** *The Journal of parasitology*, 88(3), 521-535.
- Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F. et McGinniss, M. H. (1976). **The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy.** *The New England journal of medicine*, 295(6), 302-304.
- Miller, L. H., Mason, S. J., Dvorak, J. A., McGinniss, M. H. et Rothman, I. K. (1975). **Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants.** *Science*, 189(4202), 561-563.

## II.2.2. Cycle de développement du *Plasmodium*

Le cycle de développement du *Plasmodium* est hétéroxène. Il comprend un hôte intermédiaire, ici l'homme, et un hôte définitif, le moustique femelle du genre *Anopheles*. Le *Plasmodium* se reproduit suivant deux types de multiplication : une multiplication asexuée appelée schizogonie qui se déroule chez l'homme et une multiplication sexuée appelée sporogonie qui se déroule chez le moustique, raison pour laquelle ce dernier est l'hôte définitif. Chez l'homme, le cycle comprend deux phases, une phase exo-érythrocytaire (schizogonie exo-érythrocytaire ou pré-érythrocytaire ou hépatique) et une phase érythrocytaire comprenant la schizogonie érythrocytaire et la gamétocyto-genèse. La gamétocyto-genèse est le processus de formation des gamétocytes qui marque l'initiation de l'étape sexuelle du *Plasmodium*. Le cycle complet de *P. falciparum* est représenté dans la figure 3 et diffère principalement de celui des autres *Plasmodium* humains par l'étape de séquestration des gamétocytes non matures dans la moelle épinière.

### ✚ Chez l'homme

#### ➤ Phase exo-érythrocytaire ou schizogonie exo-érythrocytaire

Au moment de la piqûre, l'anophèle femelle infectée inocule à l'homme une vingtaine de sporozoïtes (Beier *et al.*, 1988), stade infectant pour l'homme. En seulement trente à soixante minutes, les sporozoïtes, mobiles et de forme effilée, se frayent un chemin dans la circulation sanguine jusqu'à leur première cible, le foie. Dans les hépatocytes, ils prennent la forme de petits noyaux entourés de cytoplasme appelés cryptozoïtes. S'en suit alors un processus de développement et de multiplication asexuée aboutissant à la formation de schizontes ponctués de milliers de noyaux et dont le volume atteint 45 à 60  $\mu$  de diamètre (Carnevale *et al.*, 1984b). A la fin de la maturation, les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine à travers des bourgeonnements du schizonte appelés mérosomes (Sturm *et al.*, 2006). La durée de la schizogonie exo-érythrocytaire est variable selon l'espèce plasmodiale, de cinq à seize jours (voir tableau 1). Chez *P. ovale* et *P. vivax*, certains cryptozoïtes peuvent rester quiescents dans le foie pendant un temps variable, quelques mois à plusieurs années, sous forme d'hypnozoïtes et être à l'origine des cas de reviviscences

périodiques (« relapse » en anglais). La phase exo-érythrocytaire correspond à la phase asymptomatique du cycle chez l'homme.

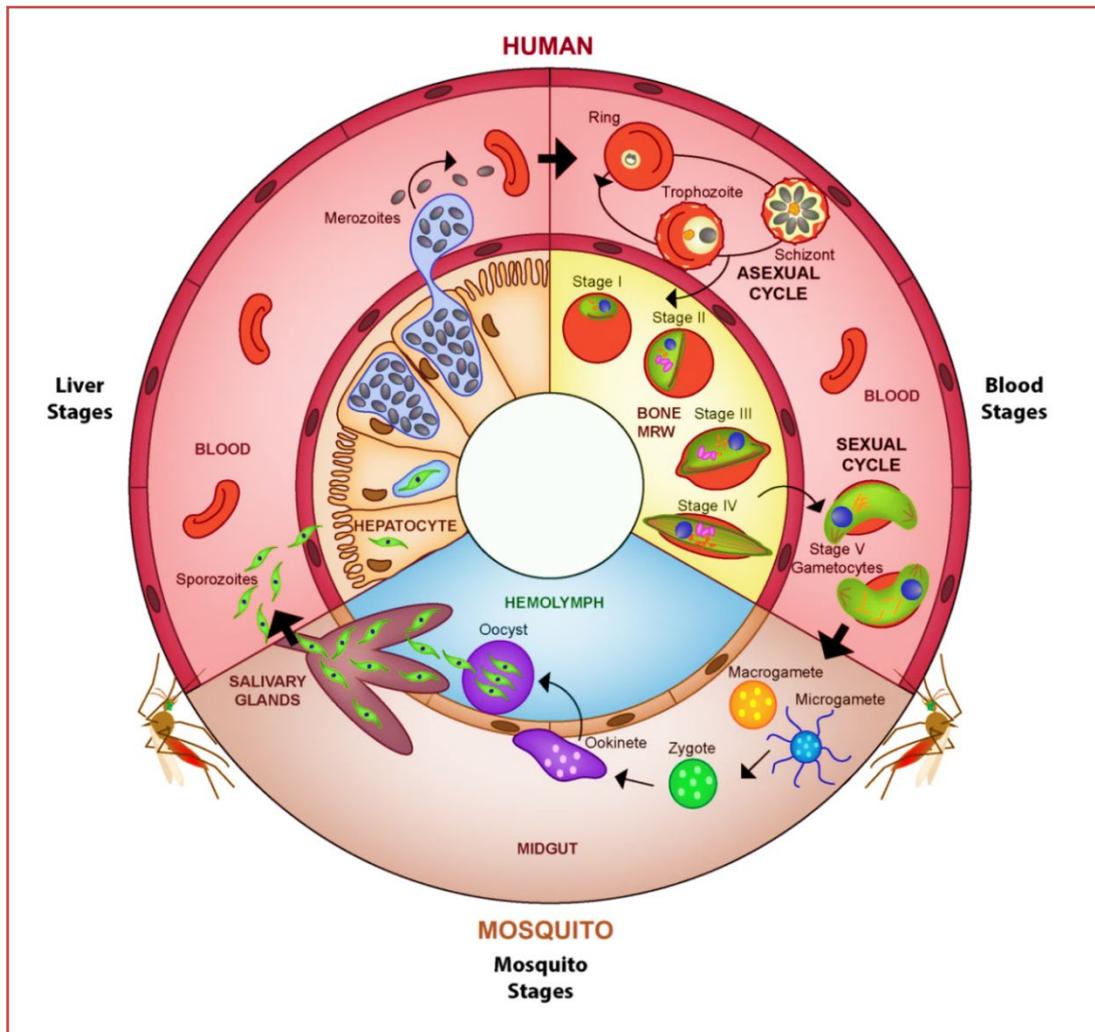


Figure 3. Cycle de développement de *P. falciparum*.  
(Nilsson *et al.*, 2015).

**Chez l'homme** : phase exo-érythrocytaire ou schizogonie exo-érythrocytaire (« liver stages ») qui se déroule dans les cellules hépatiques ; phase érythrocytaire (« blood stages ») qui se déroule dans la circulation sanguine = schizogonie érythrocytaire (« asexual cycle ») + gamatocytogenèse (« sexual cycle) où seuls les gamétocytes de stade 5 se trouvent dans le sang périphérique, les stades 1 à 4 se trouvant dans la moelle osseuse et la rate. **Chez le moustique** : sporogonie (« mosquito stages ») qui se déroule dans les cellules épithéliales de l'estomac. Lors de leur transit, certains stades parasitaires peuvent se trouver libres dans les fluides corporels. Ce sont : les mérozoïtes avant d'envahir les globules rouges ; les sporozoïtes lorsqu'ils vont envahir les glandes salivaires du moustique (via l'hémolymphe) et les hépatocytes de l'homme (via le sang) ; ainsi que les stades gamètes, zygotes et ookinètes libres dans le contenu stomacal du moustique.

➤ **Phase érythrocytaire**

**Schizogonie érythrocytaire**

Les mérozoïtes libres provenant du foie envahissent les globules rouges où ils se transforment en trophozoïtes. Le trophozoïte se nourrit de l'hémoglobine et son produit de digestion, l'hémozoïne ou pigment malarique, est responsable de très fortes fièvres chez l'homme. Après accroissement du trophozoïte, son noyau subit trois à cinq divisions mitotiques aboutissant à la formation d'un schizonte contenant huit à trente-deux noyaux entourés de cytoplasme. A ce stade, le schizonte occupe pratiquement tout le globule rouge qui éclate, libérant dans la circulation sanguine les mérozoïtes. Ces derniers pourront envahir d'autres hématies saines, rythmant ainsi avec des accès thermiques (fièvres quotidiennes, tierce et quarte) et d'autres symptômes de la maladie (frissons, douleurs abdominales, grossissement de la rate, troubles neurologiques, mort). La durée de la schizogonie érythrocytaire est variable selon les espèces plasmodiales (voir tableau 1). A l'inverse de *P. falciparum* et de *P. malariae*, *P. vivax* et *P. knowlesi* envahissent préférentiellement les globules rouges du groupe sanguin Duffy. *P. vivax* utilise la protéine de liaison (adhésine) nommée PvDBP « *Plasmodium vivax* Duffy binding protein » pour envahir les réticulocytes exprimant son ligand l'antigène Duffy/DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) (Gunalan *et al.*, 2018 ; Ntumngia *et al.*, 2016 ; Hester *et al.*, 2013 ; Menard *et al.*, 2013 ; Miller *et al.*, 1976). La nécessité absolue des récepteurs Duffy pour l'invasion de *P. knowlesi* dans les érythrocytes de l'homme a été démontrée pour la première fois par Miller et collaborateurs en 1975 (Miller *et al.*, 1975). Récemment, Amir et collaborateurs ont isolé chez l'homme une nouvelle lignée de *P. knowlesi* et ont montré qu'il envahissait préférentiellement les réticulocytes (Amir *et al.*, 2016).

**Gamétocytogenèse**

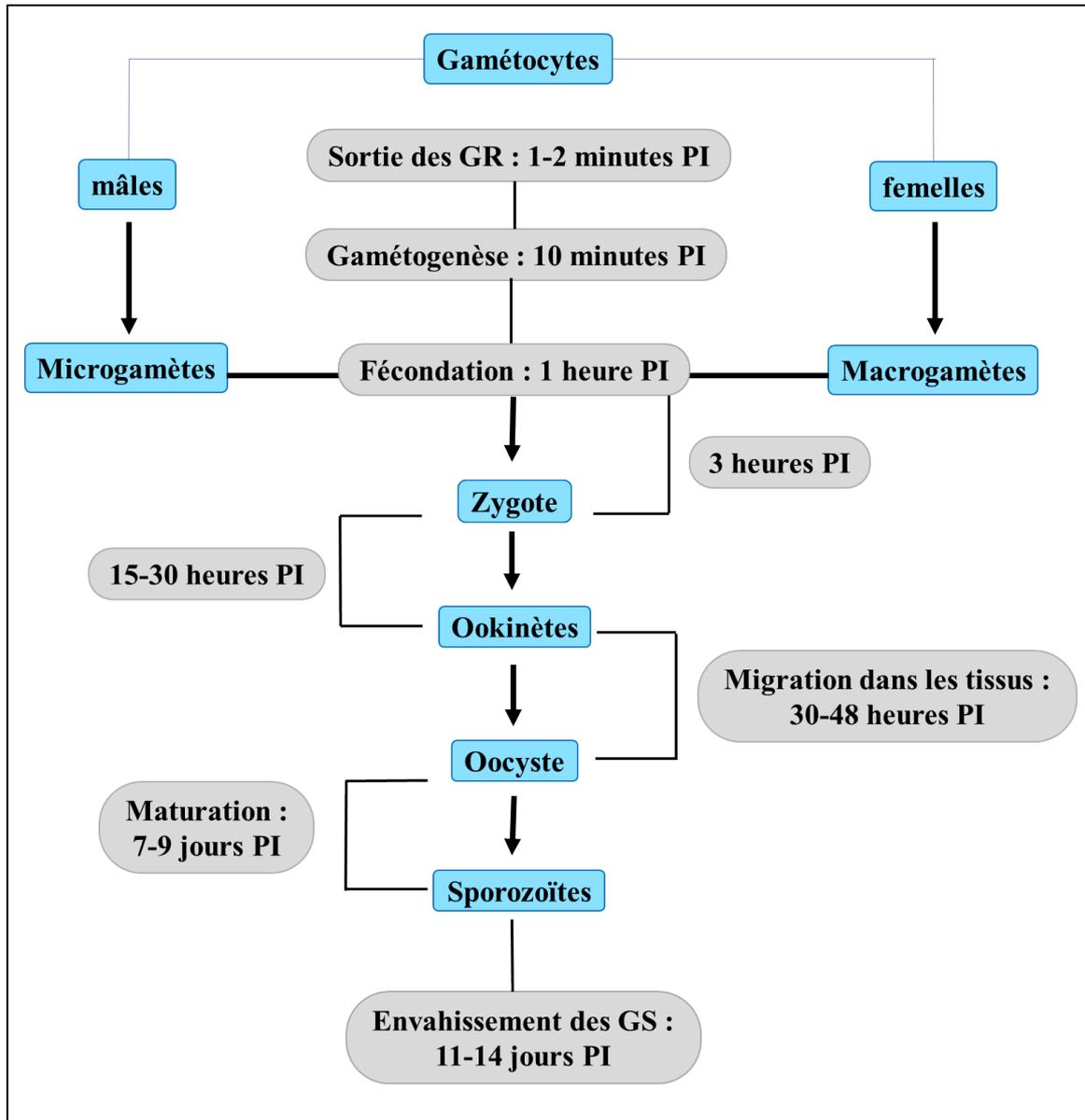
Cette phase a été mieux étudiée chez *P. falciparum*. Après plusieurs schizogonies érythrocytaires, certains mérozoïtes vont être détournés du cycle pour former les gamétocytes mâles et femelles : c'est la gamétocytogenèse. Chez les autres *Plasmodium*, des gamétocytes peuvent être formés dès la première schizogonie érythrocytaire (McKenzie *et al.*, 2002). La maturation des gamétocytes comporte cinq stades (I, II, III, IV et V) et seul le stade V est retrouvé dans la circulation périphérique. Bien que les preuves suggèrent que la moelle

osseuse est le site primaire de la maturation des gamétocytes, certains gamétocytes immatures ont été observés ailleurs dans le corps humain, comme dans la rate (Nilsson *et al.*, 2015). La différenciation des gamétocytes aboutit à un dimorphisme sexuel important entre le gamétocyte femelle et le gamétocyte mâle. A la fin de leur maturation, les gamétocytes mâles et femelles sont dans un stade bloqué et le cycle ne pourra continuer que s'ils sont ingérés par l'anophèle femelle. Cependant, cela ne suffit pas pour assurer leur infectivité pour l'anophèle vecteur. Hormis les facteurs intrinsèques de l'anophèle, la poursuite du cycle de *Plasmodium* chez ce premier dépend de trois facteurs liés aux gamétocytes : la densité, le sex-ratio mâle/femelle et l'âge (Bradley *et al.*, 2018 ; Bousema *et al.*, 2014 ; Churcher *et al.*, 2013 ; Wampfler *et al.*, 2013 ; Okell *et al.*, 2012 ; Bousema et Drakeley, 2011).

### ✚ Chez le moustique : la sporogonie

En prenant son repas sanguin sur un homme impaludé, l'anophèle femelle ingère avec les globules rouges, tous les stades parasites présents dans le sang capillaire. Les parasites asexués sont digérés et seuls les gamétocytes assurent la poursuite du cycle. La cinétique de développement de *P. falciparum* chez l'anophèle est illustrée dans la figure 4 et décrite dans les lignes qui suivent. Au cours de la demi-heure suivant leur ingestion dans l'estomac de l'anophèle, les gamétocytes vont subir la gamétogenèse. Le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète femelle tandis que le gamétocyte mâle subit une série de divisions nucléaires rapides et, par processus d'exflagellation, aboutit à la formation de huit microgamètes mâles. Dans l'heure qui suit l'ingestion, les gamètes mâles et femelles, donnent par fécondation, un œuf diploïde ou zygote au sein duquel se déroule la méiose (Sinden et Hartley, 1985). Au cours des vingt-quatre heures suivant l'ingestion, le zygote se développe en une forme mobile allongée appelée ookinète. Trente à quarante-huit heures après l'ingestion, l'ookinète traverse la matrice périthrophique, pénètre dans les cellules épithéliales stomacales et s'enkyste au niveau de la membrane basale pour former l'oocyste. Pendant sept à neuf jours, dans l'oocyste, le noyau de l'ookinète subit des divisions mitotiques et se différencie en milliers de sporozoïtes haploïdes. A maturité, l'oocyste éclate et libère les sporozoïtes qui envahissent les glandes salivaires ; invasion facilitée par le mouvement péristaltique de l'hémolymphe dans le vaisseau dorsal du moustique (Hillyer *et al.*, 2007). De ce réservoir où ils finissent leur

maturation, les sporozoïtes pourront être injectés à l'homme avec la salive du moustique lors de la prise d'un nouveau repas de sang, débutant un nouveau cycle. La durée de la sporogonie est fonction de l'espèce plasmodiale, de l'espèce anophélienne et des conditions de température ambiante (voir tableau 1).



**Figure 4. Cinétique de développement de *P. falciparum* chez l'anophèle.**

(D'après C. Bourgouin, modifié).

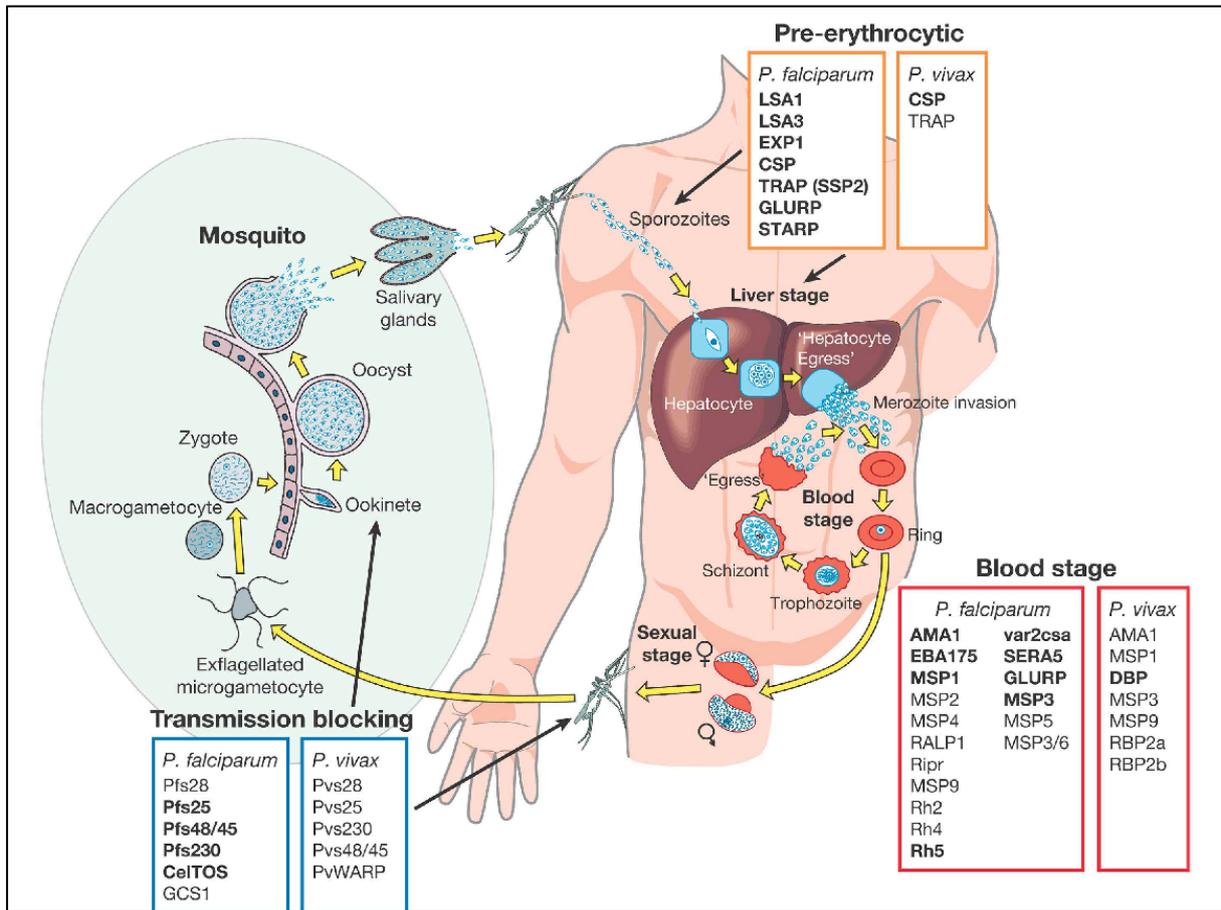
PI = Post-infection ; GR = Globules rouges ; GS=Glandes salivaires.

### II.2.3. Antigènes parasitaires exprimés au cours du cycle

Le *Plasmodium* est un eucaryote complexe constitué de nombreuses cibles antigéniques. A ce jour, le polymorphisme des antigènes plasmodiaux ciblés par des anticorps fonctionnellement importants reste mal caractérisé (Barry et Arnott, 2014). De nombreuses études séro-épidémiologiques réalisées dans différents contextes géographiques ont mis en évidence des corrélations entre les réponses immunitaires à médiation antigène-spécifique et la protection contre le paludisme clinique (Dobaño *et al.*, 2012 ; Richards *et al.*, 2010 ; Vigan-Womas *et al.*, 2010 ; Doodoo *et al.*, 2008 ; Bousema *et al.*, 2007 ; Gray *et al.*, 2007 ; Roussilhon *et al.*, 2007 ; Perraut *et al.*, 2005, 2003 ; Meraldi *et al.*, 2004 ; Soe *et al.*, 2004 ; Oouvray *et al.*, 2000). En effet, l'immunité contre le paludisme implique à la fois une réponse immune à médiation cellulaire et une réponse immune à médiation humorale. L'immunité humorale qui joue incontestablement un rôle essentiel dans le paludisme, s'acquiert progressivement en situation d'exposition continue (la prémunition) et est couplée avec l'acquisition d'anticorps protecteurs dont le spectre de spécificité reste encore inconnu. Ces anticorps protecteurs sont dirigés contre une grande variété de protéines (antigènes) produites à différents stades de vie du parasite et dont certaines sont des candidats vaccins (figure 5). Les protéines candidats vaccins sont catégorisées selon la phase du cycle parasitaire. On distingue ainsi :

- celles exprimées aux stades pré-érythrocytaires comme la « Circumsporozoite protein » (CSP), le « Liver stage antigen 1 » (LSA1), le « Thrombospondin-related antigen (TRAP) ;
- celles exprimées aux stades érythrocytaires asexués comme la « Merozoite surface protein 1 » (MSP1), le « Apical membrane antigen 1 » (AMA1), la « Glutamate-rich protein » (GLURP), le « Reticulocyte binding homolog 5 » (RH5), la « Duffy binding protein » (DBP), la variante var2csa de la « *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 » (PfEMP1) ;
- celles exprimées aux stades sexuels érythrocytaires et moustiques comme les protéines Pfs25, Pfs28 et Pfs48/45 de *P. falciparum*.

Les détails à propos de ces vaccins sont donnés dans les pages 55 à 59 de ce manuscrit de thèse. Les réactivités immunologiques contre les antigènes parasitaires permettent aussi de mesurer la transmission du paludisme (cf. page 49).



**Figure 5. Quelques antigènes parasites exprimés au cours du cycle de vie de *Plasmodium***  
(Barry et Arnott, 2014)

### II.3. Les vecteurs

Seuls les anophèles transmettent le *Plasmodium* chez les mammifères. Leur position systématique se définit comme suit : embranchement des *Arthropoda*, classe des *Insecta*, sous-classe des *Pterygota*, ordre des *Diptera*, sous-ordre des *Nematocera*, famille des *Culicidae* et genre *Anopheles*. La famille des Culicidés communément appelés moustiques compte 3559 espèces regroupées en deux sous-familles (Harbach, 2018) :

- la sous-famille des *Culicinae* qui compte quarante-et-un genres dont trois ont une importance dans la transmission des pathogènes humains : *Aedes*, *Culex* et *Mansonia* ;
- la sous-famille des *Anophelinae* qui compte trois genres : *Bironella*, *Chagasia* et *Anopheles*. Le genre *Anopheles* est le plus important sur le plan médical et comprend les espèces vectrices de paludisme.

Cosmopolite, le genre *Anopheles* regroupe 469 espèces formellement reconnues (Harbach, 2013) parmi lesquelles approximativement soixante-dix ont la capacité de transmettre le *Plasmodium* à l'homme (in Sinka *et al.*, 2012). La figure 6 tirée des travaux de Sinka et collaborateurs (Sinka *et al.*, 2012) montre la variabilité spatiale des espèces dominantes vectrices de paludisme dans le monde ainsi que la complexité de la situation vectorielle. *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus* sont co-dominants sur une grande partie de l'Afrique, alors que dans la région Asie-Pacifique, il existe une situation très complexe avec une coexistence de plusieurs espèces et une dominance d'espèces variables. Une des caractéristiques majeures des espèces du genre *Anopheles* est qu'elles sont spécifiques du continent ou des pays, alors que les espèces vectrices majeures du genre *Aedes*, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, ont une répartition mondiale.

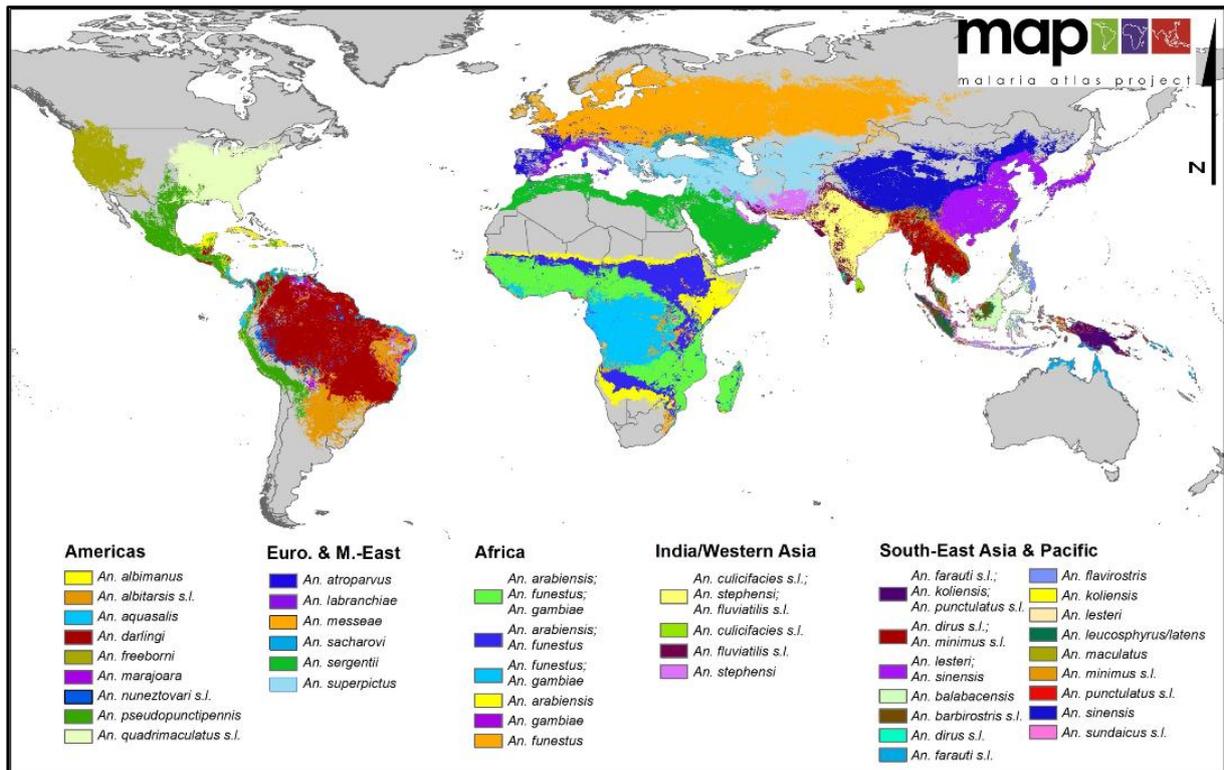


Figure 6. Carte mondiale des espèces dominantes vectrices de paludisme (Sinka *et al.*, 2012).

### II.3.1. Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes dont le cycle de vie comporte une métamorphose complète, ce sont des holométaboles. Ils ont une activité rythmée, nyctémérale<sup>7</sup> et saisonnière. Leur développement est caractérisé par la succession de deux phases : une phase aquatique (œuf, larve et nymphe) et une phase aérienne (adulte). Leur cycle de développement est illustré dans la figure 7.

#### ✚ Phase aquatique ou pré-imaginale

Les œufs d'anophèles pondus séparément sont munis de flotteurs qui leur permettent de rester à la surface de l'eau durant l'embryogénèse. Sous des conditions favorables de température, l'incubation des œufs dure deux à trois jours. Après éclosion, les œufs donnent

<sup>7</sup> Le rythme nyctéméral est un cycle biologique d'une durée de vingt-quatre heures et qui correspond à un jour et une nuit.

naissance aux larves de stade I (L1) mesurant environ 1 mm qui vont évoluer par des mues successives pour donner des larves de stades II (L2), III (L3) et IV (L4) mesurant de 5 mm à 1 cm. Comme tous les autres culicidés, les larves d'anophèles se nourrissent en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Au terme de leur développement, elles subissent une mue particulière, la nymphose, pour donner des nymphes mobiles qui ne se nourrissent pas. De profonds remaniements morphologiques vont se produire au sein de la nymphe et, de cette dernière, va émerger un adulte mâle ou femelle. Bien qu'étant des stades aquatiques, les larves et nymphes ont une respiration aérienne. A la température de 25 °C, la durée de la phase aquatique est d'une dizaine de jours pour *An. gambiae* s.l. et d'une trentaine de jours pour *An. funestus* (Coetzee et Fontenille, 2004) ; elle s'allonge quand la température diminue et raccourcit quand cette dernière augmente (Robert, 2001). Selon nos observations sur le terrain à une température d'environ 30 °C, les larves d'*An. funestus*, d'*An. mascarensis* et d'*An. coustani* prennent entre quinze et vingt-deux jours environ pour atteindre la stade adulte, alors que celles d'*An. gambiae* s.l. se développent en dix jours (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018a, en prép.).

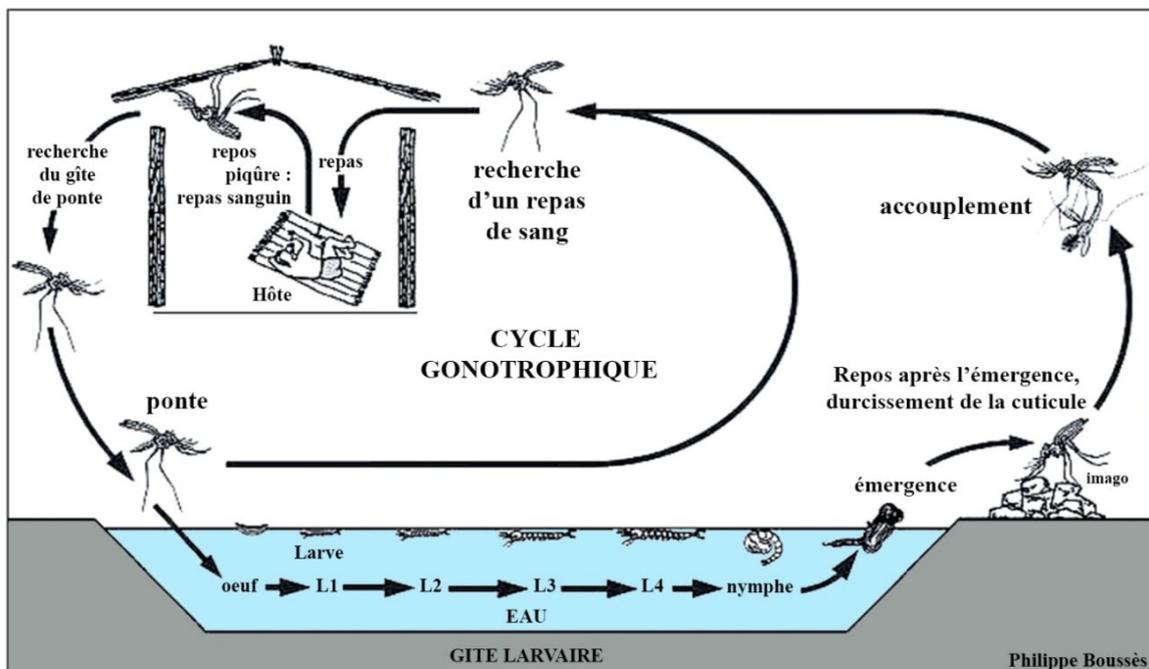


Figure 7. Cycle de développement des anophèles.

D'après Carnevale et Robert, 2009, modifié.

#### ✚ Phase aérienne : émergence, accouplement et cycle gonotrophique

L'émergence a lieu à la surface du plan d'eau et dure quelques minutes. Sous l'effet de la pression interne, la cuticule nymphale éclate sur une ligne médiodorsale du céphalothorax, l'adulte se dégage rapidement de l'exuvie et s'envole dès que ses ailes ont séché. Après l'émergence, les femelles ont besoin de douze à vingt-quatre heures et les mâles de soixante-douze heures pour que leur cuticule durcisse et que les organes de reproduction mâles se mettent en place. Cette maturation se fait par une rotation de 180 degrés de l'appareil génital et de l'extrémité abdominale (Clements, 1992).

Avant l'accouplement, les mâles peuvent former des essaims – de quelques dizaines à plusieurs milliers d'individus – observables à quelques mètres du sol et généralement au crépuscule (Manoukis *et al.*, 2009 ; Diabate *et al.*, 2006). La copulation, de courte durée (quelques secondes), peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre lorsque le couple (la femelle accrochée par les clasps du mâle) est au sol (*in* Carnevale et Robert, 2009 ; Charlwood *et al.*, 2002). En règle générale, les femelles d'anophèles ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Clements, 1999). Les spermatozoïdes sont stockés dans un réceptacle, la spermathèque, d'où ils sortent pour féconder les ovocytes au moment de la ponte. Ils conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique. Mâles et femelles prennent ensuite du jus sucré, plus souvent le nectar des plantes, afin de satisfaire leurs besoins énergétiques pour le vol et maintenir les processus métaboliques.

Pour assurer la survie de l'espèce, les femelles ont besoin de prendre du sang car les protéines du sang sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. De ce fait, seule la femelle<sup>8</sup> est hématophage. La succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez la femelle entre deux repas de sang successifs constitue le cycle gonotrophique (Carnevale et Robert, 2009 ; Robert, 2001 ; Clements, 1992). Il est composé de trois phases : recherche de l'hôte vertébré et prise du repas de sang ; digestion du sang et maturation ovarienne ; et pour finir recherche du lieu de ponte et ponte. La durée du cycle gonotrophique varie entre deux et trois jours pour les femelles pares (c'est-à-dire ayant effectué au moins une ponte) et jusqu'à cinq jours pour les femelles nullipares (n'ayant pas encore effectué une ponte). Deux à trois jours après la prise du repas de sang, l'anophèle

---

<sup>8</sup> Commentaire d'entomologiste : chez la glossine et d'autres mouches piqueuses, les deux sexes piquent.

fécondité varie selon les espèces et d'autres facteurs comme l'âge et la saison. Pour *An. gambiae* s.l., le nombre moyen d'œufs par ponte est de l'ordre de 150 et la fécondité diminue avec l'âge (Clements, 1992). De nombreuses espèces prennent d'abord un repas de sang avant de s'accoupler (Charlwood *et al.*, 2003).

### II.3.2. Vecteurs de paludisme à Madagascar

La faune culicidienne de la Grande île de Madagascar est particulière. Sur les 235 espèces de moustiques que compte le pays, 138 (soit 59 %) sont endémiques (Tantely *et al.*, 2016). Parmi les 26 espèces du genre *Anopheles* décrites dans le pays, 11 sont endémiques de Madagascar auxquelles s'ajoute *An. mascarensis* présent à Madagascar et aux Comores. Six espèces sont vectrices de paludisme. Il s'agit de trois espèces du complexe *Anopheles gambiae* sensu lato (*Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae*<sup>9</sup> et *Anopheles merus*), d'*Anopheles funestus* sensu stricto<sup>10</sup>, d'*Anopheles mascarensis* et d'*Anopheles coustani*. Les principales caractéristiques des six espèces vectrices de paludisme à Madagascar sont regroupées dans le tableau 2 et décrites ci-dessous.

***Anopheles funestus* (Giles, 1900)** : considéré comme étant le premier vecteur de paludisme à Madagascar, il est présent dans toutes les régions biogéographiques. De tous les anophèles présents dans le pays, *An. funestus* est l'espèce la plus endophage (principalement anthropophile) avec une endophilie marquée (Tantely *et al.*, 2016 ; Grjebine, 1966). Ses gîtes larvaires sont les eaux semi-permanentes ou permanentes à végétation dressées telles les rizières en phase d'épiaisons, les ruisseaux, les drains d'irrigation etc.

***Anopheles arabiensis* (Patton, 1905)** : considéré comme le second vecteur dans tout le pays, il est aussi présent partout. *An. arabiensis* est exophage (plus zoophile qu'anthropophile) et exophile (Duchemin *et al.*, 2001; Ralisoa, 1996). Ses gîtes larvaires sont des collections d'eaux temporaires peu ombragées à végétation basse. La présence de cette espèce est liée aux pluies et à la riziculture en début de croissance.

---

<sup>9</sup> Depuis 2013, *Anopheles gambiae* s.s. de forme moléculaire M a été nommé *An. coluzzii*, tandis que la forme moléculaire S conserve le nom typique *An. gambiae* (Coetzee *et al.*, 2013).

<sup>10</sup> Le groupe *An. funestus* comporte dix espèces (Spillings *et al.*, 2009) dont une seule est rencontrée à Madagascar, *An. funestus* s.s. (Tantely *et al.*, 2016). Tout au long de mon manuscrit, je vais utiliser l'expression « *An. funestus* » tout court, faisant référence à *An. funestus* s.s. de Madagascar.

***Anopheles gambiae* (Giles, 1902)** : vecteur secondaire, il est plus prévalent dans les régions humides, sur la côte Est. Dans les plaines occidentales de Madagascar, *An. gambiae* a été décrit comme étant endophage (principalement anthropophile) et exophile (Ralisoa, 1996). Par contre dans la partie orientale, précisément à Fenoarivo-Est, il a été décrit comme étant exophage (zoophile) et exophile (Duchemin *et al.*, 2001). Dans les deux cas, il a une forte tendance à l'exophilie. Ses gîtes sont des collections d'eaux temporaires ensoleillées et sans végétations, telles les rizières durant leurs premières phases et les flaques d'eau.

***Anopheles merus* (Dönitz, 1902)** : vecteur secondaire, il est restreint aux régions très sèches, sur la côte Ouest, principalement à l'extrême Sud où il joue un rôle vecteur (Léong Pock Tsy *et al.*, 2003). Très souvent trouvé en sympatrie avec *An. arabiensis*, il a une tendance exophage et exophile. Les gîtes larvaires d'*An. merus* sont limités aux eaux saumâtres (Tantely *et al.*, 2016 ; Le Goff *et al.*, 2003 ; Grjebine, 1966).

***Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947)** : espèce endémique, son comportement fortement lié à la transmission du paludisme diffère d'une région à une autre (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018b). *An. mascarensis* est exophage (zoophile) et exophile dans les hauts plateaux et endophage (anthropophile) et endophile sur la côte Est (Fontenille et Campbell, 1992). Il joue le rôle de vecteur principal dans le Sud-Est à Fort-Dauphin en présence d'*An. funestus* et d'*An. gambiae* s.l. (Marrama *et al.*, 1999) et le rôle de vecteur secondaire sur la côte Est à Sainte-Marie (Fontenille *et al.*, 1992 ; Fontenille et Campbell, 1992). Son rôle vecteur est très faible voire nul dans les hauts plateaux, le moyen Ouest et la côte Ouest (Le Goff *et al.*, 2003 ; Grjebine, 1966). Les gîtes larvaires d'*An. mascarensis* sont constitués par des plans d'eau renouvelables, principalement les rizières et les canaux d'irrigation.

***Anopheles coustani* (Laveran, 1900)** : présent dans tous les domaines biogéographiques de Madagascar, son implication longtemps suspectée dans la transmission du paludisme (Fontenille *et al.*, 1988) a été récemment signalée à Madagascar (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018c ; Nepomichene *et al.*, 2015) – cf. chapitre 2. Il est largement zoophile bien qu'il pique l'homme lorsque l'occasion s'en présente et a tendance à se reposer dans les abris d'animaux. Les gîtes larvaires d'*An. coustani* sont tantôt ombragés par une végétation dressée, tantôt par une végétation flottante, tels les trous de terre, les rizières, les ruisseaux, les étangs, les marécages, etc. (Nepomichene, 2017 ; Tantely *et al.*, 2016 ; Grjebine, 1966).

Généralités sur la transmission du paludisme

**Tableau 2** : Principales caractéristiques des six espèces d'anophèles vectrices de paludisme à Madagascar.

Espèce	<i>An. funestus</i>	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. merus</i>	<i>An. mascarensis</i>	<i>An. coustani</i>
<b>Distribution à Madagascar</b>	Tous les domaines biogéographiques	Tous les domaines biogéographiques	Surtout dans les régions humides sur la côte Est	Régions très sèches, extrême Sud-Ouest	Partout sauf dans le domaine du Sud	Tous les domaines biogéographiques
<b>Lieu de repas (Exophage/Endophage)</b>	Endophage	Exophage	Endophage (plaines Ouest) ; Exophage (Fénoarivo-Est)	Exophage	Exophage (Plateaux, côte Nord-Est et moyen Ouest) ; Endophage (côte Sud-Est)	Exophage
<b>Lieu de repos (Exophile/Endophile)</b>	Endophile	Exophile	Exophile	Exophile	Endophile (côte Est) ; Exophile (autres régions)	Exophile
<b>Préférence alimentaire (Anthropophile/Zoophile)</b>	Anthropophile	Tendance zoophile	Zoo-anthropophile	Tendance zoophile	Zoo-anthropophile	Tendance zoophile
<b>Type de gîte larvaire</b>	Eaux semi-permanentes ou permanentes à végétation dressée	Eaux temporaires, peu ombragées à végétation basse	Eaux temporaires ensoleillées et sans végétation	Eaux saumâtres	Eaux renouvelables peu ombragées	Eaux permanentes ou semi-permanentes ombragées par une végétation dressée ou flottante
<b>Classement du rôle vecteur</b>	Vecteur majeur (premier vecteur dans tout le pays)	Vecteur majeur (deuxième vecteur dans tout le pays)	Vecteur secondaire	Restreint à l'extrême Sud-Est	Vecteur secondaire ou principal	Vecteur secondaire

Références du tableau 2

- Duchemin, J.-B., Tsy, J.-M. L. P., Rabarison, P., Roux, J., Coluzzi, M. et Costantini, C. (2001). **Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps.** *Medical and Veterinary Entomology*, 15(1), 50-57.
- Fontenille, D. (1992). **Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar.** *Mémoires de la Société royale belge d'Entomologie*, 35, 129–132.
- Fontenille, D. et Campbell, G. H. (1992). **Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar?** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1), 28–30.
- Goupeyou-Youmsi J. M., Tantely L. and Bourguoin C. (2018b). ***Anopheles mascarensis*, an endemic malaria vector of Madagascar: a species in evolution or a complex of sibling species?** *Malaria Journal*. Soumission en cours.
- Goupeyou-Youmsi J. M., Rakotondranaivo T., Andriamiarimanana M. R., Rasoloharimanana T., Puchot N., Rakotoarison R. L., Rakotomalala E., Girod R., Bourguoin C., Ndiath O. and Vigan-Womas I. (2018c). **Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar?** *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Soumission en cours.
- Grjébine, A. (1966). *Insectes diptères Culicidae Anophelinae*. (22). Centre IRD de Bondy. Paris : ORSTOM.
- Le Goff, G., Randimby, F. M., Rajaonarivelo, V., Laganier, R., Léong Pock Tsy, J. M., Ceianu, C. S., ... Robert, V. (2003). ***Anopheles mascarensis* de Meillon 1947, vecteur de paludisme dans le Moyen-Ouest de Madagascar ?** *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 69(1-2), 57–62
- Léong Pock Tsy, J.-M., Duchemin, J.-B., Marrama, L., Rabarison, P., Goff, G. L., Rajaonarivelo, V. et Robert, V. (2003). **Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar.** *Malaria Journal*, 1-7.
- Marrama, L., Jambou, R., Rakotoarivony, I., Leong Pock Tsi, J. M., Duchemin, J. B., Laventure, S., ... Roux, J. (2004). **Malaria transmission in Southern Madagascar: Influence of the environment and hydro-agricultural works in sub-arid and humid regions: Part 1. Entomological investigations.** *Acta Tropica*, 89(2), 193–203.
- Marrama, L., Laventure, S., Rabarison, P. et Roux, J. (1999). ***Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947): vecteur principal du paludisme dans la région de Fort-Dauphin (Sud-est de Madagascar).** *Entomologie Médicale*, 2018, 5–7.
- Nepomichene J. J., T. N. (2017). **Biologie d'*Anopheles coustani* (Diptera : Culicidae) et implications dans la transmission du *Plasmodium* et du Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift à Madagascar.** (PhD Thesis). Université d'Antananarivo
- Ralisoa, O. B. (1996). Biogéographie du complexe *Anopheles gambiae* de Madagascar, vecteur de paludisme. Dans Biogéographie de Madagascar = Biogeography of Madagascar (Lourenço W.R. éd., p. 523-534). Edition ORSTOM, Paris.
- Tantely, M. L., Le Goff, G., Boyer, S. et Fontenille, D. (2016). **An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar.** *Parasite*, 23(20), 1-42.

#### II.4. Mesure de la transmission

La transmission du paludisme résulte de la rencontre et de la compatibilité du *Plasmodium* avec ses deux partenaires, le vecteur anophèle et l'hôte vertébré, l'homme. L'ensemble qui implique l'agent pathogène, l'arthropode vecteur et l'hôte vertébré, dans un environnement donné, constitue ce qu'on appelle le système vectoriel (Rodhain, 2015) illustré dans la figure 8. Le passage à une phase effective de transmission dépend d'un grand nombre de facteurs : la susceptibilité/immunité de la population d'hôtes vertébrés, l'aptitude du vecteur à s'installer durablement après son introduction et le niveau de sa compétence et de sa capacité vectorielles (Fontenille *et al.*, 2013). La mesure de la transmission du paludisme se fait donc à deux niveaux : au niveau de l'homme par des analyses parasitologiques (présence de parasites sanguins détectés par microscopie, test de diagnostic ou analyse biomoléculaire) et/ou des analyses de marqueurs sérologiques d'exposition au parasite ; et au niveau de la population d'anophèles par mesure des indices entomologiques permettant d'incriminer un vecteur.

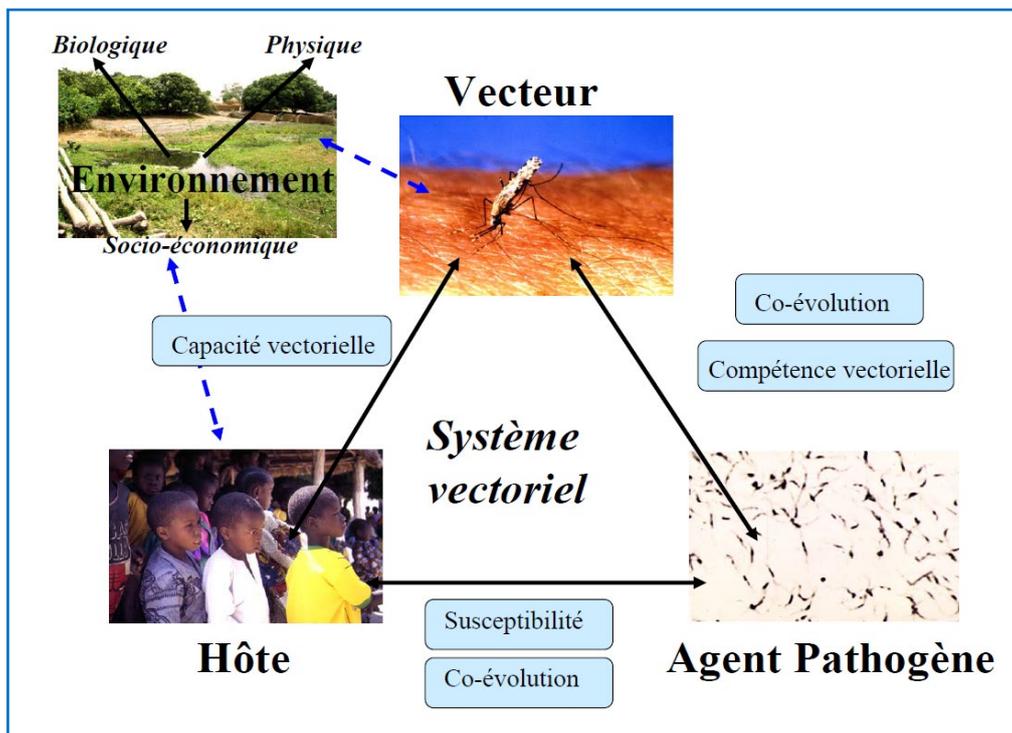


Figure 8. Système vectoriel : agent pathogène, vecteur, hôte et environnement. (Fontenille, 2009).

#### II.4.1. Marqueurs sérologiques

L'analyse des marqueurs sérologiques d'exposition au parasite sont de plus en plus utilisées pour mesurer les niveaux de transmission du paludisme en zone d'endémie et l'impact des stratégies de lutte déployées à grandes échelles. Elles se sont révélées particulièrement utiles dans les zones de faible transmission où les mesures traditionnelles telles que le taux d'inoculation entomologique et la prévalence parasitaire sont limitées (Pothin *et al.*, 2016 ; Cook *et al.*, 2010). En effet, la mesure des indices entomologiques – dont certains correspondent à des estimations – n'est pas applicable partout et nécessite d'avoir des entomologistes de terrain expérimentés. La mesure de la prévalence parasitaire chez l'homme par utilisation de la microscopie, des Tests de diagnostic rapide (TDR) et même par analyse moléculaire en utilisant la « Polymerase chain reaction » (PCR), manque parfois de sensibilité en raison du faible nombre de sujets infectés et ne fournit qu'une vision ponctuelle de l'exposition au paludisme.

L'utilisation des marqueurs sérologiques présente l'avantage d'être une technique simple et sensible, fournissant une image plus globale de la transmission sur une période prolongée et qui est considérée comme une des meilleures approches pour déterminer une exposition en cours, récente ou passée du paludisme (Kerkhof *et al.*, 2015 ; Drakeley et Cook, 2009 ; Corran *et al.*, 2007 ; Drakeley *et al.*, 2005). En effet, certains anticorps anti-*Plasmodium* ont une demi-vie longue (White *et al.*, 2014 ; Crompton *et al.*, 2010 ; Akpogheneta *et al.*, 2008) et peuvent être détectés plusieurs semaines, voire plusieurs années après la guérison. C'est le cas des anticorps anti-MSP1, anti-AMA1, ou anti-PfEMP1. D'autres antigènes, comme la protéine CSP entraînent des réponses immunes humorales de courte durée, de trois à douze mois (Moncunill *et al.*, 2013 ; Wijesundera *et al.*, 1990) et offrent de ce fait l'avantage d'identifier des infections plasmodiales beaucoup plus récentes. Pour augmenter la probabilité de mesurer de fins changements dans les réponses anticorps (prévalence et taux des anticorps circulants) en combinant différents marqueurs sérologiques, plusieurs essais en multiplex ont été récemment développés par la technologie Magpix-Luminex. Cette technique sérologique en multiplex permet de mesurer en simultanée différents marqueurs sérologiques dans un même échantillon de sérum (Perraut *et al.*, 2017, 2015 ; Kerkhof *et al.*, 2015 ; Ambrosino *et al.*, 2010 ; Fouda *et al.*, 2006). Elle a été utilisée au cours de nos études menées dans deux villages de la commune d'Andriba à Madagascar.

## II.4.2. Capacité vectorielle et autres indices entomologiques

### ✚ Capacité vectorielle et compétence vectorielle

Entomologiquement, la mesure de la transmission du paludisme s'appuie sur l'analyse de la **capacité vectorielle**, c'est-à-dire le nombre de piqûres infectantes qu'une population anophélienne distribuerait quotidiennement à un cas humain, à un endroit et à un moment donnés, en supposant des conditions de non-immunité (définition basée sur celle énoncée dans l'article de Garret-Jones (Garrett-Jones, 1964)). La capacité vectorielle inclut la **compétence vectorielle** qui est définie comme étant « l'aptitude d'un vecteur à permettre le développement d'un pathogène, de son ingestion dans un repas sanguin à sa maturation dans ses glandes salivaires, lui permettant alors de transmettre le pathogène à l'hôte vertébré ». La capacité vectorielle, illustrée dans la figure 9, est conditionnée par la densité vectorielle, la préférence trophique, la durée du cycle gonotrophique, le taux de survie et la durée du cycle d'incubation extrinsèque du pathogène. Elle est souvent mesurée par la formule suivante :

$$C = \frac{ma \times a \times p^n}{-\ln p}, \text{ selon Garrett-Jones (Garrett-Jones, 1964). Où :}$$

$C$  = capacité vectorielle qui s'exprime en nombre de piqûres infectantes que peut recevoir un homme par l'intermédiaire d'une population anophélienne par unité de temps.

$ma$  = densité anophélienne agressive pour l'homme estimée en nombre de piqûres par homme et par unité de temps.  $ma$  peut aussi s'écrire «  $m \times a$  », avec  $m$  désignant la densité des vecteurs par rapport à l'homme.

$a$  = nombre de repas de sang pris sur homme par un anophèle par unité de temps.

$p$  = probabilité quotidienne de survie de la population anophélienne considérée (calculée à partir du taux de parturité).  $p^n$  est la proportion de spécimens qui dépassent l'âge épidémiologiquement dangereux,  $1/-\ln p$  est l'espérance de vie et  $p^n/-\ln p$  désigne l'espérance de vie infectante. «  $\ln$  » désigne le logarithme népérien.

$n$  = durée (en jours) du cycle extrinsèque (ou sporogonique) de l'espèce plasmodiale étudiée dans la zone et pendant la période considérée.

Cependant cette formule n'inclut pas strictement la compétence vectorielle, paramètre important à prendre en considération. Il est depuis admis de définir la capacité vectorielle par

$$\text{la formule : } C = \frac{ma \times a \times p^n}{-\ln p} \times V, \text{ selon Reisen (Reisen, 1989).}$$

Avec «  $V$  » représentant la compétence vectorielle. Celle-ci dépend de facteurs génétiques (susceptibilité de l'hôte moustique) mais également de facteurs environnementaux tels que le microbiote intestinal du moustique (Dennison *et al.*, 2016 ; Tchioffo *et al.*, 2016b ; Tchioffo *et al.*, 2013 ; Boissière *et al.*, 2012).

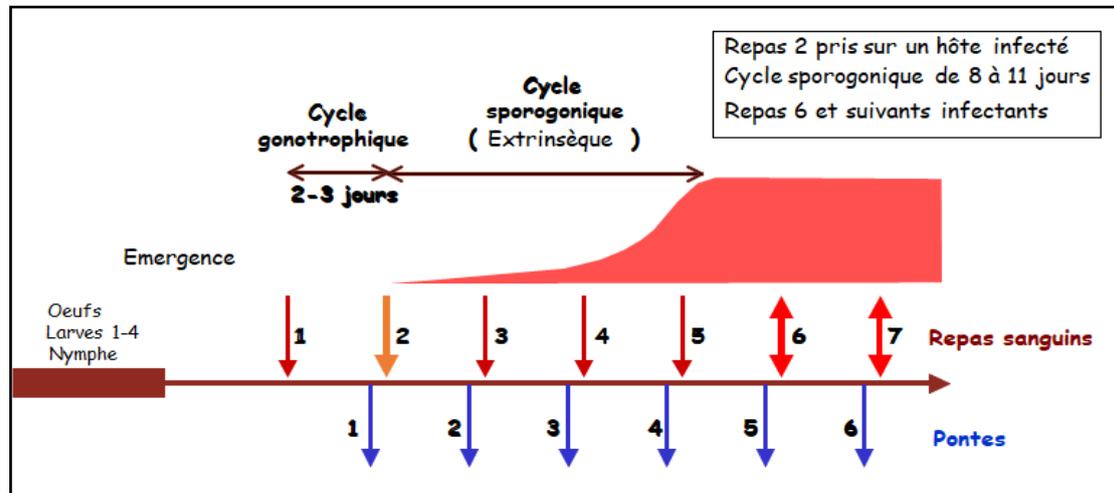


Figure 9. Schéma de la capacité vectorielle.

Après émergence, le moustique femelle met deux à trois jours pour que sa cuticule durcisse (surtout sa trompe) et qu'elle puisse trouver un hôte vertébré (cycle gonotrophique). Si une femelle prend son deuxième repas de sang sur un hôte infecté, elle pourrait être infectante pour l'homme à partir de son sixième repas sanguin. La durée de vie moyenne d'un anophèle est d'une vingtaine de jours.

Les paramètres pour le calcul de la capacité vectorielle ne sont pas toujours précis et faciles à obtenir, comme la détermination du taux de parturité requérant une expertise spécifique et l'estimation réelle de la durée du cycle sporogonique d'une espèce si on n'a pas les données de température au moment des captures. C'est pourquoi, la mesure de la transmission se fait généralement en estimant d'autres indices entomologiques spécifiques.

#### ✚ Autres indices entomologiques utilisés pour la mesure de la transmission

Hormis la formule de la capacité vectorielle, les autres paramètres entomologiques permettant de mesurer la transmission du paludisme sont : le taux d'agressivité (abondance), le taux d'endophilie/exophilie (habitudes de repos), le taux d'endophagie/exophagie (habitudes alimentaires), le taux d'anthrophilie (préférence d'hôte), le taux d'infection et le taux d'inoculation entomologique (WHO, 2014 ; Williams et Pinto, 2012).

**Taux d'agressivité ou densité agressive (*ma*)**

C'est le rapport du nombre de moustiques capturés sur homme par le nombre de captureurs, en une nuit et pour chaque espèce. Il s'exprime en nombre de piqûre/homme/nuit. Pour estimer ce paramètre, il faut réaliser des captures sur appât humain.

**Taux d'endophagie/exophagie**

C'est la proportion des femelles d'une espèce donnée qui piquent à l'intérieur (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie) des habitations.

**Taux d'anthrophilie (HBI, « Human blood index »)**

C'est la proportion de femelles d'une espèce donnée, portant du sang humain dans leur estomac. Cet indice est obtenu par analyse des repas de sang, généralement par la technique « Enzyme linked immunosorbent assay » (ELISA) (Beier *et al.*, 1988) et aussi par la technique PCR ciblant le gène Cyt B codant pour la cytochrome b oxydase mitochondriale (Kent et Norris, 2005) qui permettent de distinguer l'origine du repas sanguin entre homme, poulet, bœuf, porc, etc. Il sert à définir le *ma* quand on ne peut pas faire de captures sur homme, principalement dans les pays où capturer des moustiques sur appât humain n'est pas accepté par l'éthique.

**Taux d'infection ou Indice sporozoïtique (IS)**

C'est la proportion de moustiques d'une espèce donnée, porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires. Cet indice peut être obtenu par dissection des glandes salivaires et détection par microscopie des sporozoïtes ou par détection de la protéine CSP par analyses ELISA (Wirtz *et al.*, 1987 ; Wirtz *et al.*, 1985) et PCR (Bass *et al.*, 2008 ; Snounou *et al.*, 1993). Les deux dernières techniques sont les plus utilisées de nos jours.

**Taux d'inoculation entomologique (EIR, « Entomological inoculation rate »)**

C'est le produit du taux d'agressivité *ma* par le taux d'infection IS. Il est exprimé en nombre de piqûres infectantes par homme et par unité de temps (nuit, mois ou année) en zone de faible transmission. Cet indice permet d'évaluer la contribution d'une espèce vectrice dans la transmission du paludisme dans une région donnée, de comparer les niveaux de transmission selon les régions et les faciès épidémiologiques, et d'évaluer l'impact des méthodes de contrôle.

## II.5. Contrôle du paludisme

Réduire la transmission du paludisme à un niveau qui ne constitue plus un problème de santé publique est l'objectif de ce qu'on appelle le contrôle du paludisme. Le contrôle du paludisme diffère de son élimination (à portée locale ou régionale) et de son éradication (élimination mondiale). Bien que cela soit difficile à mettre en œuvre, surtout en Afrique qui représente le plus gros fardeau du paludisme, la plupart des programmes nationaux de lutte contre le paludisme visent à éliminer cette maladie. Les méthodes actuelles de contrôle du paludisme ciblent le parasite et le vecteur.

### II.5.1. Lutte anti-parasitaire

#### ✚ Traitements médicamenteux chez l'homme

Le traitement médicamenteux a pour objectif premier de guérir le sujet infecté en éliminant rapidement et totalement les plasmodies de son sang. Ceci afin d'éviter des complications pouvant conduire à une infection chronique et potentiellement à la mort. Du point de vue de la santé publique, un traitement efficace a aussi pour but de réduire la transmission du paludisme en diminuant les réservoirs, principalement les porteurs de gamétocytes, et d'éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (WHO, 2018b). Avant de commencer un traitement, il est nécessaire de faire un diagnostic précoce du paludisme. Le diagnostic se fait par confirmation parasitologique au moyen d'un examen microscopique (test de référence) ou au moyen d'un TDR. La chloroquine, premier antipaludique de synthèse, avait connu un grand succès au vingtième siècle dans la lutte contre le paludisme. Cependant, une résistance chez *P. falciparum* à ce médicament a été enregistrée dès les années cinquante et ultérieurement chez *P. vivax* (Howes *et al.*, 2016a ; Sidhu *et al.*, 2002 ; Wellems et Plowe, 2001 ; Moran et Bernard, 1989 ; Payne, 1987). La découverte de l'artémisinine a changé radicalement le paysage de la lutte contre le paludisme et a conduit à de nouvelles perspectives dans la recherche et le développement des médicaments antipaludiques (Su et Miller, 2015). Cela a valu au Professeur Youyou Tu en 2015, le Prix Nobel de Médecine pour sa contribution à la découverte de cette molécule. Aujourd'hui, le traitement de première ligne recommandé par l'OMS pour la majorité des cas

de paludisme, est l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, les ACT « Artemisinin-based combination therapy » (WHO, 2015). Cinq ACT sont recommandés par l'OMS : artemeter + lumefantrine ; artesunate + amodiaquine (ASAQ) ; artesunate + mefloquine ; dihydroartémisinine + piperaquine ; et artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine (S-P). Leur dose est administrée en fonction du poids de l'individu. Le traitement dépend des espèces plasmodiales et de la gravité de la maladie. Il suit les recommandations nationales qui peuvent différer d'un pays à un autre.

### **Traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum***

Le traitement des infections à *P. falciparum* se fait avec l'une des cinq combinaisons d'ACT, sur une durée de trois jours, excepté chez les femmes enceintes dans leur premier trimestre de grossesse. Chez ces dernières, le traitement se fait avec sept jours de quinine + clindamycine. Dans les zones à faible transmission, l'OMS recommande d'ajouter au traitement ACT une dose unique de primaquine, afin de réduire la transmission des plasmodies (WHO, 2012). En effet, la primaquine en dose unique peut être utilisée comme gamétocytocide et est peu susceptible d'avoir d'effets toxiques chez les sujets déficients en glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD), quels que soient les variants génotypiques en cause (WHO, 2018b). La haute efficacité de l'association S-P + primaquine ou de l'association dihydroartémisinine-piperaquine + bleu de méthylène pour prévenir la transmission de *P. falciparum*, a été récemment démontrée au Mali, avec une bonne tolérance chez des déficients en G6PD (Dicko *et al.*, 2018).

### **Traitement du paludisme non compliqué dû à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi***

Le traitement des infections aux quatre autres espèces plasmodiales se fait soit à base d'ACT – excepté les femmes enceintes durant leur premier trimestre de grossesse –, soit à base de chloroquine dans les zones où il n'existe pas de résistance à cette molécule. L'ajout de la primaquine est nécessaire pour prévenir les cas de rechute dus à *P. vivax* et *P. ovale*. Cependant, à forte dose la primaquine pourrait induire une hémolyse chez les déficients en G6PD.

### **Traitement du paludisme grave**

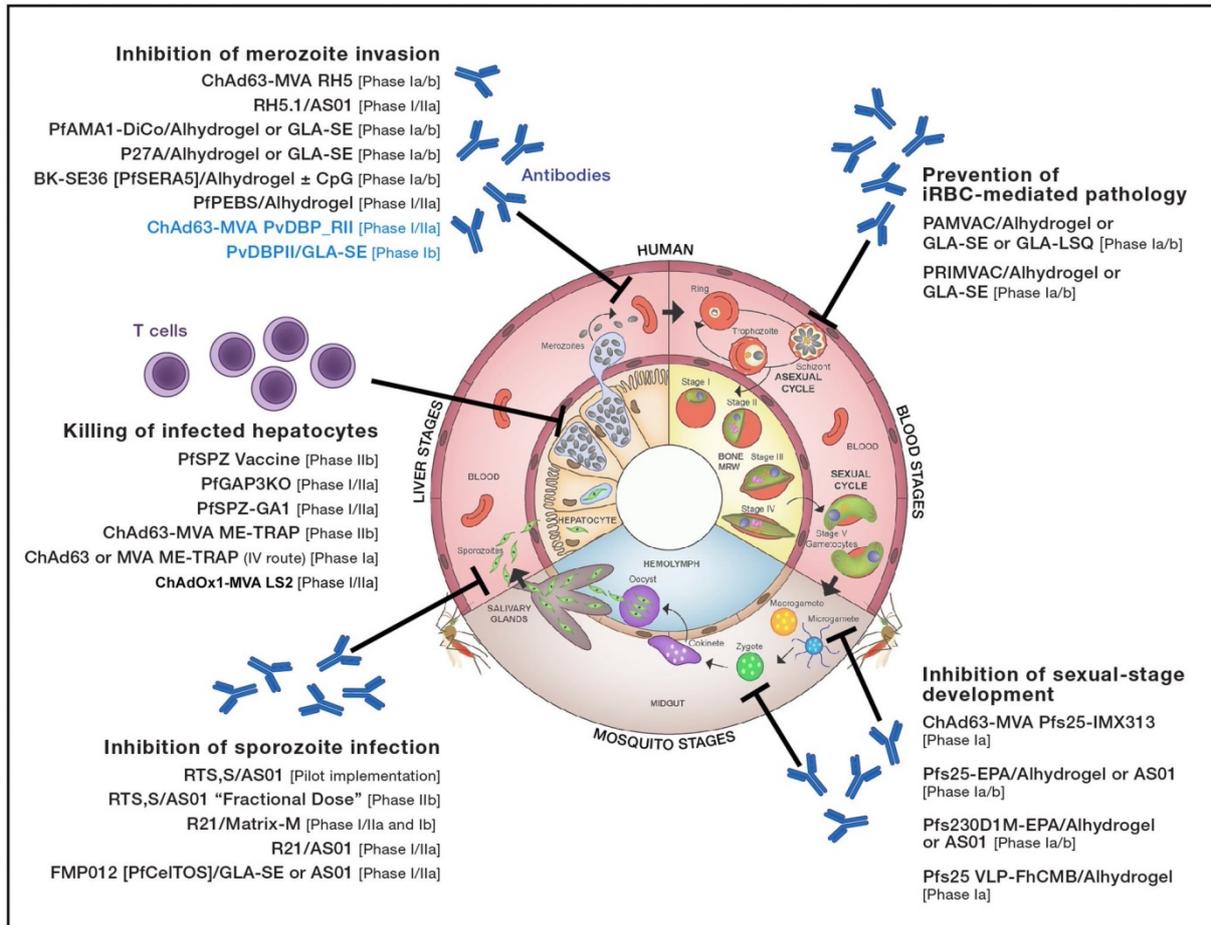
Le traitement du paludisme grave se fait avec une injection intramusculaire ou intraveineuse d'artésunate pendant au moins vingt-quatre heures, suivie d'un traitement de trois jours à base d'ACT une fois que le patient peut tolérer des médicaments par voie orale. Ce traitement est applicable chez tous les groupes de patients, aussi bien chez la femme enceinte à tous les trimestres de grossesse que chez les enfants de moins de cinq ans.

### **Traitement préventif chez les enfants et les femmes enceintes**

Une des recommandations de l'OMS est la chimio-prévention du paludisme chez les enfants âgés de moins de douze ans et les femmes enceintes au cours de leur première ou deuxième grossesse (WHO, 2015). Cette chimio-prévention inclue les Traitements préventifs intermittents (TPI) et la chimio-prévention saisonnière. L'objectif du traitement préventif est de prévenir le paludisme en maintenant un niveau de médicament thérapeutique dans le sang pendant la période de forte transmission. Chez les enfants, le TPI se fait avec la S-P en même temps que les deuxième et troisième vaccinations contre le tétanos-diphthérie-coqueluche et la vaccination contre la rougeole. Chez la femme enceinte, le TPI se fait toujours avec la S-P, avec trois doses administrées à un mois d'intervalle à partir du deuxième trimestre de grossesse. La chimio-prévention saisonnière se fait avec l'amodiaquine + S-P administrée mensuellement à des enfants âgés de moins de six ans pendant la période de transmission. Elle se fait dans des zones de transmission paludique élevée en Afrique subsaharienne.

### **✚ Vaccins antipaludiques**

Le cycle de vie complexe du *Plasmodium* chez l'homme ainsi que la grande variabilité antigénétique des protéines nécessaires au cycle de vie du parasite, représentent un défi pour le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme. Par conséquent, il existe de nombreuses approches différentes pour le développement de vaccins antipaludiques. Ils comprennent le ciblage de la production d'anticorps spécifiques contre les antigènes exprimés par les différents stades parasitaires (cf. pages 38 et 39). Plusieurs vaccins antipaludiques sont actuellement en phase préclinique chez des rongeurs et primates non-humains et en phase clinique chez l'homme (Draper *et al.*, 2018 ; Coelho *et al.*, 2017 ; Birkett, 2016 ; Moreno et Joyner, 2015). La synthèse des vaccins antipaludiques actuellement en cours de phase clinique est illustrée dans la figure 10.



**Figure 10. Candidats vaccins antipaludiques actuellement en développement clinique.**  
En bleu, les vaccins contre *P. vivax*. (Draper *et al.*, 2018).

➤ **Vaccins dirigés contre les stades exo-érythrocytaires**

Le vaccin le plus avancé à ce jour est dirigé contre les stades exo-érythrocytaires et cible la protéine CSP spécifique de *P. falciparum*, c'est le RTS,S/AS01 aussi connu sous le nom de Mosquirix™ (Malaria Vaccine Initiative, 2016). Il agit soit en empêchant la pénétration des sporozoïtes dans les hépatocytes, soit en inhibant complètement ou partiellement le développement des stades hépatiques. Des études de phase 3 sur l'efficacité et l'innocuité du RTS,S ont montré que ce vaccin pourrait apporter un bénéfice significatif pour la santé publique, en réduisant le fardeau du paludisme lorsqu'il est utilisé avec les autres moyens de lutte tels les moustiquaires et les insecticides (RTS,S Clinical Trials Partnership,

2015; Sauboin *et al.*, 2015 ; Leach *et al.*, 2011). Ces études ont été entreprises dans sept pays d'endémie palustre en Afrique subsaharienne, avec divers schémas de transmission, sur des nourrissons âgés de six à quatorze semaines et des jeunes enfants âgés de cinq à dix-sept mois. Après ce « succès » de phase 3, l'OMS a coordonné et soutenu à travers le « Malaria vaccine implementation programme », l'introduction en cette année 2018 du vaccin RTS,S/AS01 dans trois pays d'Afrique : le Ghana, le Kenya et le Malawi (WHO, 2018a). Ce Programme a pour but d'évaluer l'impact du vaccin sur la santé publique, dans le contexte d'une utilisation de routine et d'informer les décideurs nationaux sur son potentiel déploiement à plus grande échelle. Toutefois, l'efficacité du vaccin RTS,S n'est pas totale et dépend des tranches d'âge concernées.

### ➤ Vaccins dirigés contre les stades érythrocytaires asexués

Les antigènes exprimés par les stades érythrocytaires n'en font pas des candidats vaccins évidents car nombreux sont polymorphes et de milliers de protéines sont exprimées. Parmi les antigènes de stade sanguin ayant fait objet de candidats vaccins, il y a la protéine AMA1 qui aide le mérozoïte à infecter les érythrocytes. Le vaccin AMA1 a été testé en phase 1, chez des enfants âgés d'un à six ans, en bonne santé et exposés à un paludisme saisonnier, et il a été montré qu'il induit des taux d'anticorps élevés et soutenus chez eux (Thera *et al.*, 2010). Un autre exemple est le vaccin MSP3 testé en phase 1b chez des enfants âgés de douze à vingt-quatre mois, en Tanzanie et au Burkina Faso où il a été associé avec une diminution de l'incidence du paludisme clinique chez les patients qui l'avaient reçu (Sirima *et al.*, 2011 ; Lusingu *et al.*, 2009). La protéine PfrH5 «*P. falciparum* reticulocyte-binding protein homolog 5 » ou « Basigin » est une molécule très conservée dont il a été découvert qu'elle est commune à quinze souches différentes de *P. falciparum* et donc, qu'elle pouvait constituer la cible d'un nouveau vaccin (Crosnier *et al.*, 2011). Les premiers essais, réalisés sur des modèles animaux (souris et lapins), montrent que l'injection de PfrH5 induit une réponse immunitaire dont les anticorps sont capables de neutraliser toutes les souches testées de *P. falciparum* (Douglas *et al.*, 2011).

➤ **Vaccins dirigés contre les stades sexués : « Transmission-blocking vaccines »**

Pour accélérer l'élimination du paludisme voire son éradication, les stratégies actuelles portent un grand intérêt pour la réduction de la transmission, incluant les vaccins bloquant la transmission (TBV « Transmission-blocking vaccines ») (Dicko *et al.*, 2018 ; Tadesse *et al.*, 2018 ; Bompard *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2017 ; Sinden, 2017 ; Theisen *et al.*, 2017 ; Gonçalves et Hunziker, 2016 ; Sauerwein et Bousema, 2015 ; Nunes *et al.*, 2014 ; Birkett *et al.*, 2013 ; Bousema et Drakeley, 2011 ; Lavazec et Bourgoïn, 2008 ; Saul, 2007). Les TBV ciblent les stades sexuels chez l'homme et/ou le développement du parasite chez les moustiques (Kaslow, 1993 ; Romero, 1992). L'immunité de blocage de la transmission repose sur des anticorps fonctionnels contre les protéines membranaires de surface sur les stades sexuels/sporogoniques ou les antigènes de l'intestin moyen du moustique. Parmi les antigènes candidats pour les TBV, il y a ceux du parasite et ceux du moustique.

Bien qu'un nombre important de cibles plasmodiales aient été identifiées et testées dans des études précliniques au cours des dernières décennies, quatre antigènes de *P. falciparum* (et leurs orthologues chez d'autres espèces) ont attiré plus d'attention comme potentiels TBV. Il s'agit des protéines Pfs48/45 et Pfs230 exprimées avant la formation du zygote (aux stades gamétocytes et gamètes) et des protéines Pfs25 et Pfs28 exprimées aux stades zygote et ookinète (Saul, 2007). La protéine Pfs48/45 est un bon candidat vaccin car elle présente une faible variation génétique au niveau des acides aminés la constituant (Theisen *et al.*, 2017), suggérant une applicabilité géographique large. Il en est de même pour son orthologue Pvs48/45 chez *P. vivax* (Feng *et al.*, 2015). De plus, les titres d'anticorps contre Pfs48/45 dans les régions d'endémie palustre ont été corrélés avec une activité de blocage de la transmission (Theisen *et al.*, 2017). Contrairement à la protéine Pfs48/45, la protéine Pfs230 a une structure complexe et des études cliniques se sont focalisées sur sa région C, capable d'induire des titres d'anticorps élevés qui réduisent l'infectivité parasitaire pour les moustiques (Farrance *et al.*, 2011 ; Williamson, 2003 ; Williamson *et al.*, 1995). La protéine Pfs25 intervient pour la pénétration de l'ookinète dans la paroi stomacale du moustique. Sa diversité de séquence minimale en fait également un bon candidat vaccin. Des études en phase clinique ont montré une corrélation entre une immunité de blocage de la transmission chez l'homme et les titres d'anticorps contre Pfs25 et Pvs25 (Wu *et al.*, 2008 ; Malkin *et al.*, 2005).

Quatre catégories d'antigènes de moustique ont été identifiées comme potentiels TBV (Lavazec et Bourgoïn, 2008). A savoir : les TBV inhibant l'activité de l'aminopeptidase N servant de ligant pour les ookinètes et dirigés contre les antigènes comme la protéine « *Anopheles gambiae* alanyl aminopeptidase N 1 » AgAPN1 aussi connue sous le sigle AnANP1 ; ceux inhibant l'activité de la carboxypeptidase nécessaire au développement du parasite en ciblant les protéines comme la « Carboxypeptidase B *Anopheles gambiae* 1 » CPBAG1 (Lavazec *et al.*, 2007) ; ceux empêchant l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique en ciblant les protéines comme la « Saglin » ; et ceux inhibant l'activité de la trypsine nécessaire à la formation des oocystes. L'AnANP1 est un bon candidat vaccin car hautement conservé à travers les vecteurs anophèles (Mathias *et al.*, 2012). En utilisant une approche biochimique et immunologique, une étude réalisée dans des pays où le paludisme est endémique a montré que l'antigène AnANP1 pouvait verrouiller la transmission de *P. falciparum* et de *P. vivax* chez des espèces d'anophèles génétiquement éloignées (Armistead *et al.*, 2014).

### II.5.2. Lutte anti-vectorielle

Le nombre limité d'antipaludiques et l'absence d'un vaccin efficace jusqu'à nos jours, font de la lutte anti-vectorielle (LAV) la principale stratégie préventive contre le paludisme. Les méthodes de LAV ne sont efficaces que si certaines conditions sont réunies, en fonction du vecteur ciblé et de la situation locale. En effet, chaque méthode varie du point de vue de l'efficacité, des ressources nécessaires, des moyens potentiels de la rendre accessible à la population cible, et du personnel requis pour la mise en œuvre (WHO, 2014). D'après Carnevale et collaborateurs (Carnevale et Robert, 2009), les méthodes de LAV peuvent être classées selon : la technique de lutte (physique, biologique, chimique, génétique) ; la cible (les larves, les adultes) ; le niveau de la mise en œuvre (service spécialisé, communauté, individu) ; et l'effet recherché pour réduire le contact hôte/vecteurs, la densité et la longévité des vecteurs. Je vais me baser sur le classement selon la cible pour parler de la LAV.

### ✚ Lutte contre les larves

La lutte contre les larves nécessite les interventions comme la gestion de l'environnement et l'utilisation de larvicides biologiques et chimiques. La gestion de l'environnement se fait par la réduction ou l'élimination des gîtes propices au développement des larves d'anophèles. L'utilisation des bio-larvicides comme les bactéries *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus* ont montré leur efficacité sur le terrain et en laboratoire (Dambach *et al.*, 2014 ; Fillinger *et al.*, 2003 ; Barbazan *et al.*, 1998 ; Romi *et al.*, 1993 ; Delécluse *et al.*, 1988 ; Bourguin *et al.*, 1984). L'utilisation des poissons larvivores comme *Gambusia affinis* a aussi montré son efficacité (Walton, 2007 ; Rupp, 1996 ; Kramer *et al.*, 1987). Cependant, les traitements larvicides peuvent être inefficaces si les gîtes larvaires sont très nombreux et difficilement localisables (WHO, 2014), ce qui est le cas pour de nombreux vecteurs anophèles. C'est pour cela que de nos jours, les efforts de la LAV sont plus accentués sur la lutte contre les adultes dont les méthodes, recommandées par l'OMS, sont applicables à grande échelle. De plus ces méthodes permettent directement de diminuer le contact homme-vecteur.

### ✚ Lutte contre les adultes

La lutte contre les adultes, principale méthode de prévention contre le paludisme, consiste à limiter les piqûres de moustiques et revêt deux aspects complémentaires : l'utilisation des insecticides (adulticides) et l'utilisation de moustiquaires. Le Dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT), un insecticide de synthèse qui autrefois a connu un grand succès dans la LAV, a été interdit aux États-Unis dans les années soixante-dix à cause de son grand impact sur l'environnement et la santé. Ceci suite à la publication du livre « Silent spring » (Printemps silencieux) de la biologiste Rachel Carson sur les dangers du DDT et qui fut un best-seller (Carson, 1962). Néanmoins, le DDT est toujours utilisé, particulièrement dans les pays touchés par le paludisme. Aujourd'hui, les méthodes les plus couramment utilisées et recommandées par l'OMS sont de dormir sous une moustiquaire imprégnée d'insecticide et de faire des interventions de pulvérisations d'insecticides rémanents à l'intérieur des maisons ; insecticides appartenant le plus souvent à la famille des pyréthrinoïdes car inoffensifs pour l'homme. L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide a permis de réduire les taux d'incidence de paludisme de 50 % dans divers

contextes et de réduire de 55 % le taux de mortalité palustre chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique subsaharienne (WHO, 2017). En plus, elles sont simples d'utilisation et à faible coût. Les moustiquaires imprégnées agissent à deux niveaux : au niveau individuel, par protection de la personne qui dort en dessous et au niveau communautaire (effet de masse) lorsque l'insecticide tue les moustiques qui la touchent, diminuant ainsi la densité de la population vectorielle dans la zone couverte. Comme toutes les autres méthodes de LAV, les moustiquaires imprégnées ont leur limite. Leur efficacité baisse en présence de moustiques exophiles et exophages et en cas de participation insuffisante des populations exposées au risque de paludisme. Raison pour laquelle elle est renforcée par des pulvérisations d'insecticides rémanents dans les maisons et autres abris extérieurs, ainsi que d'autres méthodes comme l'utilisation des répulsifs (cutanés et vestimentaires) et la mise en place des protections au niveau des maisons (grillages de fenêtres, rideaux imprégnés, ventilateurs, etc.).

Sous la forte pression des insecticides, est apparue dans la population des vecteurs une résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT qui a été rapportée dans plusieurs pays en Afrique subsaharienne (Camara *et al.*, 2018 ; Olé Sangba *et al.*, 2017 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017, 2015 ; Rubert *et al.*, 2016 ; Ndiath *et al.*, 2015 ; Wanjala *et al.*, 2015 ; Djègbè *et al.*, 2014 ; Wondji *et al.*, 2012 ; Djouaka *et al.*, 2011 ; Konan *et al.*, 2011 ; Morgan *et al.*, 2010 ; Etang *et al.*, 2006, 2003 ; Ranson *et al.*, 2000 ; Chandre *et al.*, 1999 ; Coz *et al.*, 1968 ; Perry, 1960). Cette résistance se traduit par une diminution de la mortalité observée dans une population soumise à un traitement constant et se manifeste par l'apparition d'individus tolérant des doses normalement létales pour les individus dits « sensibles ». La résistance peut être comportementale, physiologique, ou biochimique (Haubruge et Amichot, 1998). La résistance comportementale peut être associée à la mobilité de l'insecte (comportement d'évitement de l'insecticide, les moustiques deviennent plus exophiles) et à l'immobilité de l'insecte (limitation du temps de contact avec l'insecticide) (Thomsen *et al.*, 2017 ; Ndiath *et al.*, 2016 ; Sokhna *et al.*, 2013). La résistance physiologique est caractérisée par une diminution de la pénétration de l'insecticide au niveau cuticulaire et par une augmentation de son excrétion. Mécanisme très efficace, la résistance biochimique est située au niveau cellulaire. Elle consiste d'une part en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de dégradation des insecticides et d'autre part, en une modification de la cible par diminution de

l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides (Ibrahim *et al.*, 2018 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Wondji *et al.*, 2009 ; David *et al.*, 2005). C'est pour cela que des études sur la résistance des moustiques aux insecticides tentent de mieux comprendre les différents mécanismes de résistance au niveau d'une population donnée et de mieux adapter des stratégies alternatives pour lutter efficacement contre les moustiques adultes.

### II.5.3. Lutte contre la transmission du *Plasmodium* : nouvelles approches

Face au développement de résistances des anophèles contre les insecticides couramment utilisés en LAV, de nouvelles approches ciblant les vecteurs ont été proposées : l'utilisation de bactéries symbiotiques des anophèles ou le développement de moustiques transgéniques.

De nombreuses études ont montré que certaines entérobactéries, comme *Escherichia coli*, résidant dans le tube digestif du moustique, peuvent inhiber le développement des plasmodies humaines chez les vecteurs de paludisme (Dennison *et al.*, 2016 ; Tchioffo *et al.*, 2016a, 2016b ; Boissière *et al.*, 2012 ; Cirimotich, Dong, *et al.*, 2011 ; Cirimotich, Ramirez, *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'utilisation de la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* a été largement proposée en tant qu'outil de lutte contre le paludisme car elle peut agir à la fois sur le développement du *Plasmodium* chez les vecteurs ainsi que sur la longévité et la densité de ces derniers (Hughes *et al.*, 2014 ; Walker et Moreira, 2011). D'autre part, cette bactérie endosymbiotique se transmet verticalement et permet de maintenir ses effets sur de nombreuses générations. Cependant ces données ont été obtenues avec un *Plasmodium* d'oiseaux se développant chez *Aedes aegypti* sensible à la colonisation par *Wolbachia*. Ce n'est qu'en 2014 que la présence naturelle de *Wolbachia* a été rapportée chez un anophèle, *An. gambiae*, jusque-là expérimentalement résistant aux *Wolbachias* capables d'infester *Ae. aegypti* (Baldini *et al.*, 2014). Depuis, une étude menée au Burkina Faso a montré que les infections à *Wolbachia* dans les populations naturelles d'*An. coluzzii* affectent la ponte et sont négativement corrélés avec le développement du *P. falciparum* (Shaw *et al.*, 2016). Une seconde étude au Mali (Gomes *et al.*, 2017) a montré que la prévalence et le taux d'infection à *P. falciparum* dans une population sauvage d'*An. gambiae* s.l., sont significativement plus faibles chez les femelles infectées par *Wolbachia*. Des résultats similaires ont été observés à

partir d'une colonie d'*An. coluzzii* mais avec une charge oocystique plus élevée chez les moustiques infectés. L'incompatibilité cytoplasmique n'a pas encore été observée chez les anophèles vecteurs de plasmodies humaines.

La seconde nouvelle approche de « LAV » fait appel aux développements d'anophèles transgéniques à des fins de remplacement des populations vectrices par des populations non vectrices, ou de « suppression » des populations vectrices. Ainsi, il a été montré que l'expression de molécules ciblant le développement sporogonique de *P. falciparum* chez un anophèle transgénique empêchait la production de sporozoïtes (Isaacs *et al.*, 2012). L'approche transgénique visant à la suppression de population, exploite l'inactivation de gènes essentiels à la reproduction. Il existe à l'heure actuelle un engouement très fort pour le déploiement de ces approches depuis la découverte de la technologie CRISPR-cas9 « Clustered regularly interspaced short palindrome repeats - associated protein 9 » (Jinek *et al.*, 2012) permettant de créer un système efficace de propagation des « transgènes » dans les populations naturelles (Macias *et al.*, 2017 ; Hammond *et al.*, 2016 ; Gantz *et al.*, 2015). Des essais sont programmés, en particulier au Burkina Faso où ce projet fait débat (Douce, 2018). Le déploiement de tels moustiques transgéniques et les risques associés sont examinés de près par différentes autorités (Godfray *et al.*, 2018 ; Groupe de travail « Saisine Moustiques modifiés », 2017).

### II.5.4. Cas de Madagascar

Les rizières jouent un rôle majeur dans l'épidémiologie du paludisme à Madagascar. Au moment où elle connaissait son essor, la riziculture avait été impliquée dans la première épidémie de paludisme sur les Plateaux malgaches en 1878. En effet, les rizières constituent les gîtes principaux des vecteurs de paludisme à Madagascar, principalement sur les Plateaux où elles occupent tous les bas-fonds (Mouchet et Blanchy, 1995). C'est en 1949 qu'ont débuté les opérations de lutte antipaludique à Madagascar, basées sur la lutte antilarvaire dans les grandes agglomérations, la chimio-prophylaxie chez les enfants et les pulvérisations d'insecticides dans les maisons (Joncour, 1956). La lutte antilarvaire avec le poisson *Gambusia* et les bactéries *Bacillus* a été appliquée mais les résultats n'ont pas été convaincants dans les rizières (Laventure *et al.*, 1996 ; Romi *et al.*, 1993). De 1949 à 1960,

l'ensemble du territoire a fait l'objet de campagnes de pulvérisations intra-domiciliaires de DDT et de dieldrine qui ont entraîné une forte diminution des populations anophéliennes et la disparition d'*An. funestus* dans nombreux villages (Brutus *et al.*, 2001 ; Laventure *et al.*, 1996). La combinaison de la LAV et de la chimio-prophylaxie a conduit à une nette régression du paludisme à Madagascar jusqu'à la fin des années 1980, période où la maladie a éclaté sous forme de vagues épidémiques suite au relâchement des mesures de contrôle (Randrianariveლოსია *et al.*, 2002).

Depuis 1998, Madagascar a élaboré sa politique nationale de lutte contre le paludisme, laquelle a été mise à jour en 2005 et révisée en 2012 (Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016). Cette politique consiste en la mise à grande échelle des interventions basées sur : la prise en charge par des traitements à base d'ACT avec renforcement des TPI chez les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans ; l'introduction des TDR pour renforcer le diagnostic ; des campagnes d'aspersions intra-domiciliaires (CAID) d'insecticide à effet rémanent et de distribution gratuite de moustiquaires imprégnées d'insecticides à efficacité durable (MID). Dans l'ensemble à Madagascar, 62 % de la population ont eu accès à une MID en 2016 mais avec des disparités, la proportion de population ayant une MID dans le ménage est plus élevée en milieu urbain qu'en milieu rural (72 % contre 61 %) (Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016). Sans compter que la distribution des MID se fait une fois tous les deux ou trois ans ; la dernière distribution remonte en 2015 et c'est en cette année 2018 (entre août et septembre) qu'aura lieu la prochaine campagne de distribution des MID (Razafimbelo, 2018). Bien qu'actuellement la chloroquine ne soit pas le traitement antipaludique de première ligne à Madagascar, il est à noter que des cas de résistance de *P. vivax* à la chloroquine ont été rapportés dans le pays (Barnadas *et al.*, 2008). D'autre part, les vecteurs de paludisme à Madagascar restent de manière globale sensibles aux insecticides (pyréthrinoïdes et DDT) et les CAID sont associées avec une diminution de la prévalence du paludisme (Ratovonjato *et al.*, 2014 ; Brutus *et al.*, 2001). Cependant, des cas de résistance d'*An. gambiae* s.l. à la perméthrine ont été rapportés dans quelques localités du pays (Rakotoson *et al.*, 2017).

### **III. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

Les méthodes détaillées dans cette partie sont celles du chapitre 3 qui n'a pas encore été soumis pour publication.

### III.1. Collecte des larves d'anophèles

Les collectes des larves se sont faites dans les rizières et flaques d'eau, principaux types de gîtes larvaires à Andriba (figure 11, A et B). La méthodologie utilisée est celle décrite dans le Manuel de formation à l'entomologie du paludisme (Williams et Pinto, 2012). Les larves collectées sont mises avec l'eau du gîte dans les bocaux puis transportées jusqu'à l'insectarium de terrain. Les larves sont alors transférées dans des bacs étiquetés avec la date et le nom du site de collecte. Prédateurs, larves de *Culicinae* et détritux sont enlevés pour ne garder que les larves d'*Anophelinae* qui sont élevées jusqu'au stade adulte et qui constituent la F0 (moustiques de génération 0). Une identification morphologique des adultes est faite et ces derniers sont regroupés par espèce dans des cages.

Note : Les larves d'*Anophelinae* et larves de *Culicinae* sont distinguables par leur position au repos par rapport à la surface de l'eau. Les premières sont horizontales sous la surface de l'eau (stigmates respiratoires situés sur la partie dorsale) et les secondes sont obliques par rapport à la surface de l'eau (siphons respiratoires situés à la partie terminale de l'abdomen) (Carnevale et Robert, 2009).

### III.2. Capture des femelles gorgées dans les étables et les parcs à zébus

La capture des femelles adultes consiste à capturer, grâce à un aspirateur à bouche, des moustiques au repos qui sont pour la plupart des femelles gorgées. La capture dans les étables est diurne et se fait de préférence le matin, afin de capturer les femelles ayant piqué la nuit (figure 11 C). La capture autour des parcs à zébus est une méthode de capture des moustiques adultes par moustiquaire piège, sur appât animal, le zébu (figure 11 D). Cette méthode consiste à tendre un voile moustiquaire de deux mètres de large, par des piquets autour d'un parc à zébus, en laissant un espace d'un mètre entre le voile et les zébus afin de permettre la circulation des captureurs et un espace de 20 cm entre le voile et le sol afin de permettre l'entrée des moustiques (Raharimalala, 2011). Sur le chemin vers leurs lieux de repos, les femelles venues se gorger sur les zébus sont piégées par le voile moustiquaire. Une fois posées sur le voile, elles sont capturées à l'aide d'un aspirateur à bouche. La capture autour des parcs à zébus est nocturne et se fait plusieurs fois au cours d'une 19 h, 0 h et 3 h), permettant de capturer différentes espèces. Tous les moustiques capturés sont mis dans des

cages puis identifiés morphologiquement afin de les regrouper par espèce dans l'insectarium de terrain. Pour le transport des femelles capturées jusqu'à l'insectarium, un coton imbibé de solution sucrée est posé sur la partie supérieure de la cage qui est ensuite recouverte d'un grand-voile noir humide. La bonne humidification du voile est maintenue tout au long du transport, la cage étant placée dans un coin de la voiture à l'abri du vent.

Note : les entomologistes expérimentés ne capturent que les moustiques du genre *Anopheles*, différenciables morphologiquement des autres genres communément présents dans les parcs à zébus et étables à Madagascar (*Culex*, *Aedes* et *Mansonia*). L'identification morphologique des anophèles adultes capturés est faite suivant la « clef de détermination des *Anophelinae* malgaches » de Grjebine (Grjebine, 1966).

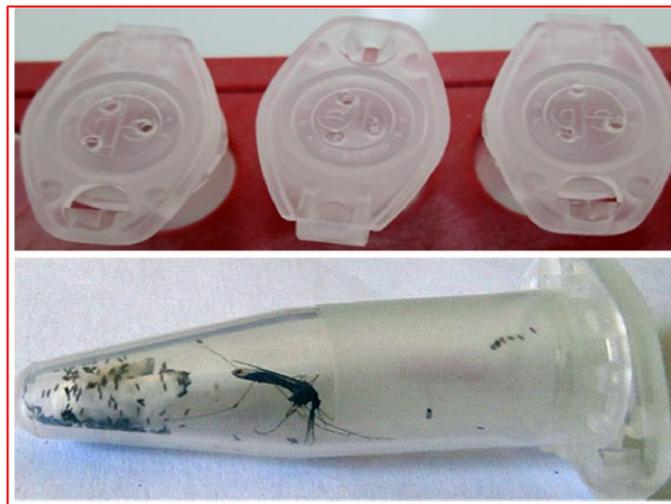


**Figure 11. Collecte des moustiques**

**A.** Collecte de larves dans une rizière. **B.** Flaque d'eau. **C.** Capture de femelles gorgées dans une étable. **D.** Système de captures de femelles gorgées autour d'un parc à zébus. Photo prise en journée mais la capture se fait durant la nuit.

### III.3. Pontes forcées

La technique de ponte forcée utilisée est celle décrite précédemment (Nepomichene *et al.*, 2017 ; Morgan *et al.*, 2010). Cette technique consiste à produire efficacement les moustiques de première génération (F1) à partir de moustiques femelles gravides mises dans des conditions de stress. Pour cela, les femelles sont placées individuellement à l'intérieur d'un tube Eppendorf® de 1,5 ml, contenant un morceau de papier filtre de 1 cm<sup>2</sup> humidifié et placé au fond du tube (figure 12). Le tube devant rester fermé une fois que le moustique y est introduit, son bouchon est percé de trois trous permettant la circulation de l'air. Capturées au hasard, une par une à l'intérieur de la cage, en utilisant directement les tubes modifiés, les femelles gravides y sont introduites. Elles sont laissées dans ces tubes durant trois à cinq jours, tout en vérifiant quotidiennement la présence d'œufs et en humidifiant le morceau de papier filtre à l'aide d'une seringue. Après la ponte, les œufs constituant la première génération ou F1, sont récupérés et mis en eau dans des bacs pour l'élevage. Les femelles qui ont survécu à la ponte forcée sont ensuite tuées au congélateur (-20 °C, une nuit) puis archivées pour de futures analyses génétiques.



**Figure 12. Ponte forcée.**

(Nepomichene *et al.*, 2017)

Femelle d'*An. coustani* mise en condition de stress dans un tube Eppendorf® 1,5 mL modifié (capuchon du tube percé de trois trous, papier filtre d'environ 1 mm<sup>2</sup> mouillé et mis au fond du tube). Les taches noires au fond du tube sont des œufs.

### III.4. Nutrition et entretien des moustiques

#### ✚ Stade larvaire

Les pontes (F0 ou F1) sont placées dans des bacs contenant de l'eau de la source locale alimentant le village. Les larves sont nourries quotidiennement avec de la nourriture pour alevins, le TetraMin® Baby, que l'on met dans les bacs à partir du stade œuf. A partir du stade larvaire L2, les croquettes pour chat (Purina One ®) sont rajoutées. Tous les bacs de larves sont étiquetés (date et lieu de capture) et couverts de voile moustiquaire. Les nymphes sont transférées dans des cristallisoirs en verre ou en plastique puis placées dans des cages d'émergence. Pour une plus grande efficacité, les moustiques adultes sont laissés à émerger dans les bacs de larves puis transférés, grâce à un aspirateur électrique, dans les cages. Dans ce cas, il faut prévoir des bacs hauts (hauteur : 9-13 cm), qui laissent aux adultes nouvellement émergés, un espace de vol suffisant entre l'eau et le voile. Quelle que soit la hauteur du bac, le niveau d'eau ne doit pas dépasser les 1,5 cm de hauteur. L'eau est changée régulièrement afin d'éviter des développements microbiens.

#### ✚ Stade adulte

Les moustiques adultes sont nourris d'une solution de sucre alimentaire à 10 % dans de l'eau filtrée (filtre pour eau alimentaire) placée dans la cage. La solution sucrée, mise dans un petit flacon en verre, est imbibée sur un rouleau de coton (type Parotisroll-Roeko ®) et l'ensemble est changé tous les deux à trois jours. Chaque cage est munie d'une fiche précisant : l'espèce, le lieu/ville d'origine, le mode de collecte, la date de mise en cage des nymphes, la date d'émergence, etc. L'insectarium ne dispose pas de système de contrôle de la température et de l'humidité, De ce fait, pour optimiser l'humidité au niveau des cages, un coton ou une éponge mouillé(e) d'eau, est posé(e) sur chaque cage qui est ensuite couverte d'un sac plastique. Pour le contrôle de la température, les étagères hébergeant les adultes sont couvertes latéralement de couvertures humides. Sur les deux autres faces, sont placés des rideaux de plastique fin. De cette manière, la température est toujours de 2 à 4 °C en dessous de la température ambiante avoisinant souvent 30 °C à 34 °C. L'enregistrement des températures et humidités ambiantes et sur étagère d'adultes est réalisé à l'aide de capteurs

Hobo data logger (Onset™). Pour éviter la prédation des moustiques adultes par les fourmis, les pieds des étagères reposent dans des petits pots contenant de l'eau et du liquide vaisselle.

### III.5. Sélection des porteurs de *Plasmodium*

La sélection des porteurs de *Plasmodium* s'est faite par des dépistages actifs dans les écoles et les « fokontany ». L'objectif du dépistage actif est de sélectionner dans la population humaine asymptomatique, des individus ayant les plus fortes densités gamétoctaires pour *P. falciparum* et/ou des individus porteurs de *P. vivax*. Avant de débiter les dépistages, une sensibilisation de la population est faite.

Les écoliers de plus de cinq ans ne présentant à priori aucun symptôme palustre ont constitué la tranche de la population ciblée pour les dépistages. Pour chaque individu dépisté, ont été faits un TDR (Malaria Pf/Pan, SD Bioline ®) et des frottis sanguins en deux exemplaires (deux lames constituées chacune d'un frottis épais et d'un frottis mince). Voir figure 13. L'évaluation de la parasitémie et le choix du porteur sont basés sur la lecture microscopique des frottis, test de référence. Pour cela, les lames sont colorées avec une solution de Giemsa 10 % puis observées au microscope en immersion à un grossissement x100. Tous les individus présentant les stades asexués de *Plasmodium* dans le sang reçoivent un traitement à base d'ACT, l'ASAQ. Les dépistages actifs sont menés selon les principes éthiques de la Déclaration d'Helsinki et approuvés par le Comité d'éthique malgache du ministère de la Santé publique, accords N° 122-MSANP/CE-2015 (Annexe 1) et N°141-MSANP/CE-2014 (Annexe 2).



**Figure 13. Sélection des porteurs de *Plasmodium***

**A. Dépistages actifs des porteurs de *Plasmodium* chez des enfants en milieu scolaire.** Pour chaque enfant, un TDR et des frottis sanguins épais et mince en deux exemplaires sont réalisés. Poids et température des enfants dont le TDR est positif sont enregistrés. **B. Test de diagnostic rapide.** Le TDR utilisé est le Malaria Pf/Pan, SD Bioline ®. Le test n'est validé que s'il y a apparition d'une bande sur la ligne contrôle « C ». L'interprétation se fait comme suit : C00 = Négatif ; C01 = Positif à *P. falciparum* ; C20 = Positif à une espèce autre que *P. falciparum* (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, ou une co-infection entre les trois) ; C21 = Positif à co-infection *P. falciparum*. **C. Frottis sanguins.** La lecture des frottis sanguins se fait le même jour que le dépistage actif, sous microscope optique après coloration.

### **III.6. Infections expérimentales des anophèles par le *Plasmodium***

L'infection expérimentale est une technique très utilisée pour l'étude de la transmission et des interactions hôte-pathogène. Dans le cadre de notre étude, nous avons fait des infections expérimentales des anophèles vecteurs majeurs à Madagascar avec *P. falciparum* et *P. vivax*. Le protocole utilisé est basé sur celui précédemment décrit (Vallejo *et al.*, 2016 ; Gouagna *et al.*, 2014 ; Stone *et al.*, 2014 ; Ouédraogo *et al.*, 2013 ; Bousema *et al.*, 2013, 2012 ; Awono-Ambene *et al.*, 2001). Selon l'éthique, deux formulaires de consentement éclairé ont été établis, chacun en versions française et malgache : une note d'information destinée à la communauté (Annexe 3) et un consentement pour le prélèvement veineux des porteurs (Annexe 4).

#### **III.6.1. Préparation des moustiques**

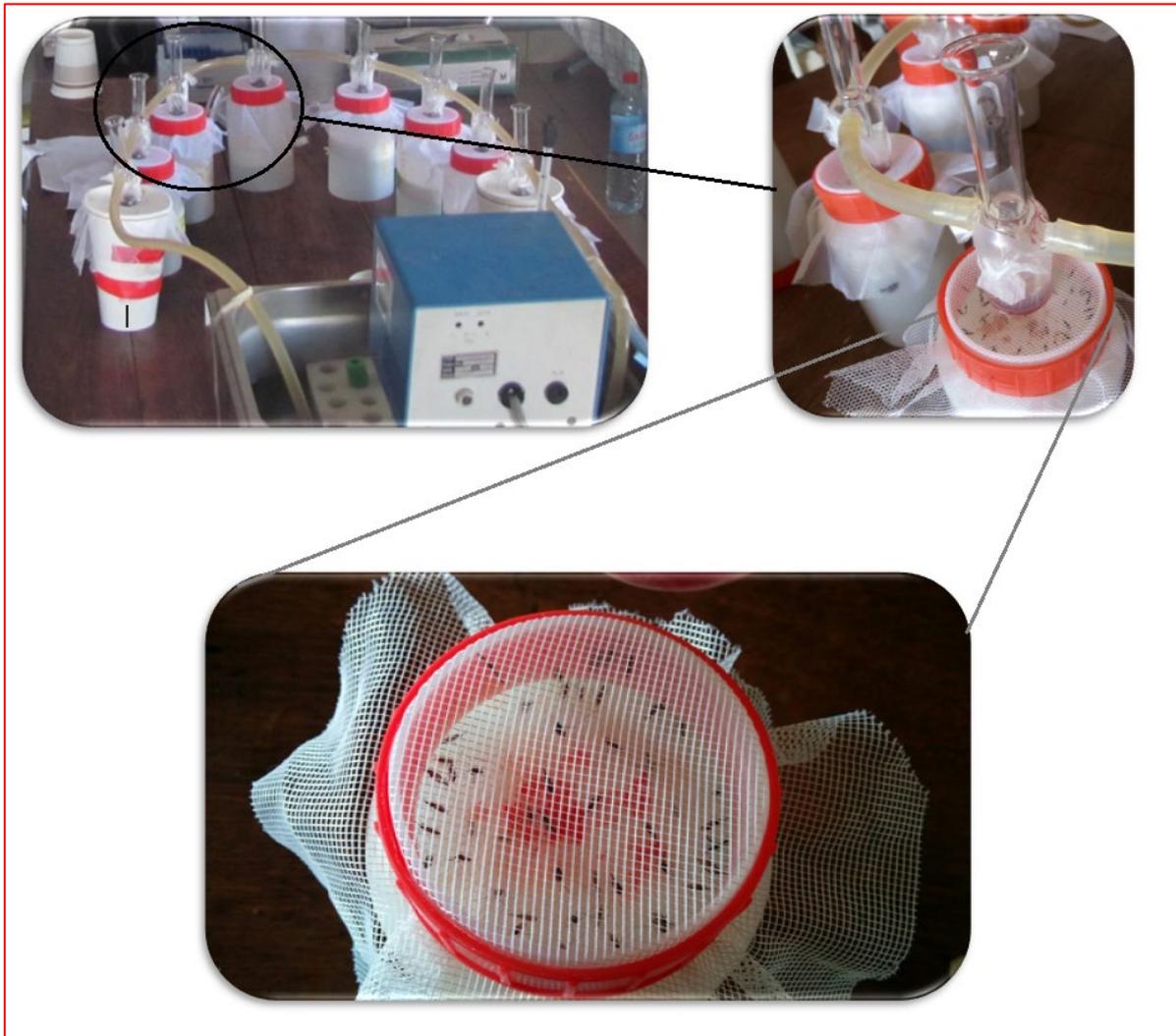
Les moustiques utilisés pour l'infection étaient d'une part des femelles d'*An. arabiensis* F0 et/ou de colonie, âgées de deux à sept jours. D'autre part, c'était des femelles d'*An. mascarensis* et d'*An. funestus* de la F1, âgées de cinq à dix jours. Pour optimiser le taux de gorgement et s'il y avait beaucoup de moustiques, des femelles agressives ont été sélectionnées. Trente à soixante moustiques femelles sont transférées délicatement, grâce à un aspirateur à bouche, dans un pot de gorgement en plastique (modèle Institut Pasteur Paris). Le haut du pot est recouvert d'un voile moustiquaire maintenu par un couvercle dépourvu de sa partie supérieure. L'extrémité inférieure est fermée par un disque en polystyrène amovible. Les dimensions du pot sont de 13 cm pour la hauteur et de 8 cm pour le diamètre basal. Après avoir introduit les moustiques, un morceau de papier filtre humide est posé sur les pots puis recouvert d'un film plastique pour garder une bonne hygrométrie. Cette étape se fait la veille de l'infection, préférentiellement dans l'après-midi car les moustiques en pots sont ainsi privés de jus sucré pendant au moins vingt-quatre heures avant l'infection. Une à deux heures avant l'infection, le papier humide est enlevé et le disque polystyrène remonté délicatement de telle sorte que les moustiques soient dans un confinement maximal pour un meilleur gorgement sur membrane.

### III.6.2. Prélèvement veineux

Avant de faire le prélèvement veineux, on s'assure que tout le dispositif pour l'infection expérimentale est prêt, le matériel de prélèvement étant déjà mis dans une étuve chauffée à 37 °C. Un volume de 5 ml du sang de porteur de *P. vivax* et/ou de porteur de gamétocytes de *P. falciparum* est prélevé au pli du coude dans un tube héparine. Le sang prélevé est maintenu à 37 °C dans un bain-marie jusqu'à la distribution dans les cellules de gorgement. Il est recommandé d'infecter les moustiques dans les vingt minutes qui suivent le prélèvement veineux. En fonction du type d'analyse et afin de limiter l'effet des facteurs humains pouvant bloquer la transmission du parasite chez le moustique, le sérum du porteur est remplacé par un sérum AB « non-immun » de donneurs ne vivant pas en zone d'endémie palustre (pool de dix poches provenant de l'EFS, Rungis, France) (Boudin *et al.*, 2005). Pour changer le sérum, le sang prélevé est centrifugé pendant 3 min à 2300 tours/min à 37 °C. Le plasma du porteur est remplacé par une quantité équivalente de sérum AB « non-immun ». Pour les infections à *P. vivax*, les donneurs ont été essentiellement des patients (enfants et adultes) se présentant au centre de santé de base (CSB) adjacent à notre laboratoire de terrain, ou d'un CSB situé à une heure de route. Dans ce dernier cas, le prélèvement sanguin a été transporté dans un thermostat à 38 °C.

### III.6.3. « Membrane Feeding Assay »

Le système pour les infections expérimentales est constitué de cellules de gorgement en verre reliées entre-elles par des tuyaux faisant circuler de l'eau chauffée à 37 °C (figure 14). Il est recommandé de hausser un peu la température du thermostat entre 37,5 et 38 °C pour prévoir la déperdition de chaleur lors de la circulation de l'eau dans les tuyaux. Chaque cellule comprend un circuit interne de régulation thermique et un circuit externe pour l'introduction du sang. Sa partie basale est recouverte d'une membrane Parafilm® étirée, à travers laquelle les moustiques prennent leur repas de sang. Une quantité de 500 µl de sang infecté est distribuée dans chaque cellule et les moustiques se gorgent pendant 30 à 60 min, à l'abri du vent et de la lumière. Après gorgement, les femelles sont transférées dans de petites cages et les femelles non gorgées sont éliminées et tuées au froid. Les femelles « infectées » sont approvisionnées en jus sucré et maintenues à l'insectarium jusqu'à la dissection, sept jours après l'infection.



**Figure 14. Dispositif pour les infections expérimentales des anophèles par le *Plasmodium***

Pots recouverts d'un tulle moustiquaire contenant des moustiques et au-dessus desquels sont posées des cellules de gorgement. Ces dernières sont reliées entre-elles par des tuyaux faisant circuler de l'eau chauffée à 37 °C et contiennent du sang des porteurs de *Plasmodium*. Photos C. Bourgouin, N. Puchot et J.M. Goupeyou-Youmsi.

### III.7. Détection des oocystes sur estomacs de moustiques infectés

Deux méthodes de détection des oocystes ont été utilisées. La première méthode très classique consiste à disséquer l'estomac de moustique sept jours post-infection dans une goutte de mercurochrome 0,4 % puis de le monter entre lame et lamelle pour détection immédiate des oocystes au microscope, objectif x40. La seconde méthode consiste à transférer le tube digestif disséqué dans la goutte de mercurochrome 0,4 %, dans un tube Eppendorf® contenant une solution de PBST (PBS1X-Tween 0,05 %). On dissèque ainsi 10 estomacs, placés dans le même tube Eppendorf®. Après plusieurs rinçages en PBST pour éliminer l'excès de mercurochrome, les estomacs sont fixés une nuit, à 4 °C, dans une solution de paraformaldéhyde 4 % en PBST. Après fixation et plusieurs lavages en PBST, les estomacs sont placés sur lame dans une goutte de milieu de montage plus couvert par une lamelle que l'on scelle sur ses quatre cotés avec du vernis à ongle. L'avantage de cette méthode est multiple : netteté des oocystes au grossissement x10 (cf. figure 19) et préservation des lames pour double lecture en cas de doute. La détection des oocystes peut se faire jusqu'à au moins quatre semaines après fixation.

### III.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Stata15 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). Les prévalences des infections à *Plasmodium* dans les populations humaines (prévalences palustres chez les enfants) et de moustiques (taux d'infections expérimentales des anophèles), ont été comparées entre-elles en utilisant le test Chi2 de Pearson lorsque la taille des échantillons était grande ( $n \geq 30$ ) et le test exact de Fisher lorsque la taille des échantillons était petite ( $n \leq 30$ ). Ce dernier n'a été utilisé que pour comparer les taux d'infection entre *An. arabiensis* et *An. mascarensis*. Pour comparer les moyennes des densités oocystiques moyennes entre *P. falciparum* et *P. vivax*, j'ai utilisé le test t de Student. Pour cela, j'ai d'abord comparé les variances entre les deux populations en utilisant le test de Welch. Puisque qu'il y avait inégalité des variances, le test t de Student a été utilisé avec correction de Welch. La corrélation entre le nombre d'oocystes et la parasitémie a été analysée en utilisant le test de Spearman. Pour chaque test, les valeurs de  $P < 0,05$  ont été considérées comme significatives. Les écart-types ont été calculés sous Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

#### **IV. RÉSULTATS**

---

## **Chapitre 1**

*Anopheles mascarensis*, un vecteur de paludisme endémique de Madagascar : espèce en pleine évolution ou complexe d'espèces ?

**Fait l'objet de l'article 1 en cours de soumission.**

Contribution :

Jessy Marlène Goupeyou-Youmsi

Luciano Tantely

Catherine Bourgouin

## Résumé en français

*Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947) est une espèce endémique de Madagascar et de l'archipel des Comores. Les principaux travaux sur cette espèce de moustique ont porté sur sa morphologie, son écologie et sa chorologie ; des études remontant aux années 1940 et 1960. Plusieurs auteurs ont noté des différences morphologiques et comportementales entre deux populations malgaches d'*An. mascarensis*, l'une de la côte Est et l'autre des Hauts Plateaux. Cette observation leur a permis d'ouvrir une discussion sur le fait qu'*An. mascarensis* serait une espèce en pleine évolution ou un complexe d'espèces. Discussion qui retient notre attention d'autant plus qu'*An. mascarensis* est un vecteur de paludisme particulièrement important à Madagascar. Pour essayer de mieux argumenter cette discussion, nous avons rassemblé dans cette revue des données non publiées sur la répartition géographique d'*An. mascarensis* pour mettre à jour la carte de distribution précédente et analyser les données publiées sur la biologie de ce moustique, ses variantes géographiques et les enregistrements de sa contribution à la transmission du paludisme. Les données rassemblées plaident davantage qu'*An. mascarensis* est un complexe d'espèces : son abondance relative à *An. gambiae* et *An. funestus* qui partagent des biotopes similaires ; son comportement endophagique et sa capacité vectorielle estimée en EIR annuel. Elles mettent aussi en évidence une différence nette entre les populations de la côte Est et des Hautes Terres Centrales, mais révèlent également un gradient possible des différentes régions climatiques et biogéographiques de Madagascar. Avec les avancées des outils moléculaires, tester l'hypothèse qu'*An. mascarensis* est un complexe d'espèces, est clairement à portée de main.

***Anopheles mascarensis*, an endemic malaria vector of Madagascar: a species in evolution or a complex of sibling species?**

Goupeyou-Youmsi J. M.<sup>1,2,3</sup>, Tantely L.<sup>4</sup> and Bourgouin C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unité d'Immunologie des maladies infectieuses, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar

<sup>2</sup>Unité de génétique fonctionnelle des maladies infectieuses, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

<sup>3</sup>Ecole doctorale Complexité du Vivant, Sorbonne Université, 21 rue de l'École de médecine 75006 Paris, France

<sup>4</sup>Unité d'Entomologie médicale, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar

Corresponding author: [catherine.bourgouin@pasteur.fr](mailto:catherine.bourgouin@pasteur.fr), Unité de génétique fonctionnelle des maladies infectieuses, UMR2000-CNRS, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Tel: +33 (0) 1 45 68 82 24, Fax: +33 (0) 1 40 61 34 71.

Keywords: *Anopheles mascarensis*, species evolution, endemic, Madagascar.

Author contributions: Data treatment from literature and graphic synthesis: BC; Database treatment from IPM: GYJM, TL, BC; Wrote the paper: GYJM, BC.

## INTRODUCTION

*Anopheles mascarensis* De Meillon, is a mosquito species endemic to Madagascar and the Comoros Archipelago. It was described by De Meillon in 1947 (De Meillon, 1947) from unique adult samples collected in Diego Suarez (actual Antsiranana), Northern tip of Madagascar, and named after the Mascarene islands which, in remote times, included Madagascar along with Mauritius, La Réunion and Rodrigues (Kitzmilller et America, 1982). It has long been confused with *Anopheles marshalli* Theobald, a continental African species that does not exist in Madagascar (Chauvet, 1962; De Meillon, 1947). *An. mascarensis* belongs to the *Cellia* subgenus of the *Anopheles* genus that includes many important malaria vectors in Africa and (Sinka *et al.*, 2012). During the numerous malaria surveillance campaigns of the last century, presence of *An. mascarensis* (or *An. marshalli*) was reported in several places of Madagascar but never implicated as a potential malaria vector until 1992 (Grjebine, 1966; Chauvet *et al.*, 1964). However, several entomologists reported subtle but significant morphological variations suggesting the existence of *An. mascarensis* geographical variants (Chauvet, 1962). In 1992, Fontenille and co-workers found that *An. mascarensis* was an important secondary vector of Human malaria in the Sainte Marie Island, located off the eastern coast of Madagascar (Fontenille *et al.*, 1992a, 1992b). In 1999, Marrama and co-workers reported that *An. mascarensis* acted as the primary malaria vector in a locality closed to Fort Dauphin (actual Tolagnaro) in the tropical South-East region of Madagascar (Marrama *et al.*, 1999).

The epidemiology of malaria transmission in Madagascar is complex due to the geography of this country and its climatic stratification (Ihantamalala *et al.*, 2018; Howes *et al.*, 2016; Mouchet *et al.*, 1993; Fontenille, 1992). Tremendous malaria vector control efforts were set up after the devastating malaria epidemics that occurs between 1986 and 1988, which provide evidence of the changing in malaria vector distribution, with the notably reemergence of *An. funestus* as a major malaria vector in the Central Highlands (Mouchet, 1998; Mouchet *et al.*, 1997; Laventure *et al.*, 1996; Fontenille et Rakotoarivony, 1988). With the benefit of novel tools, as ELISA for *Plasmodium* detection in mosquitoes (Burkot *et al.*, 1984; Wirtz *et al.*, 1987), the continuous entomological surveys led to the identification of *An. mascarensis* as a locally important malaria vector (*loc.cit.*). More recently, *Anopheles coustani* an abundant zoophilic *Anopheles* mosquito has also been shown as a possible malaria vector

(Nepomichene *et al.*, 2015) and further demonstrated using PCR Taqman assay as a locally major malaria vector (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018, in prep). Despite those efforts, malaria is still a major health problem in Madagascar, which is currently facing both climatic and societal changes towards increased poverty in areas where malaria could reestablish as a major threat (Kang *et al.*, 2018). In this context, the question may arise whether *An. mascarensis*, once demonstrated as a locally secondary or major vector might be today a neglected malaria vector owing to its geographical variation (morphological as well as behavioural) recorded more than 50 years ago that led some authors to propose that *An. mascarensis* was a species in full evolution (Chauvet, 1962).

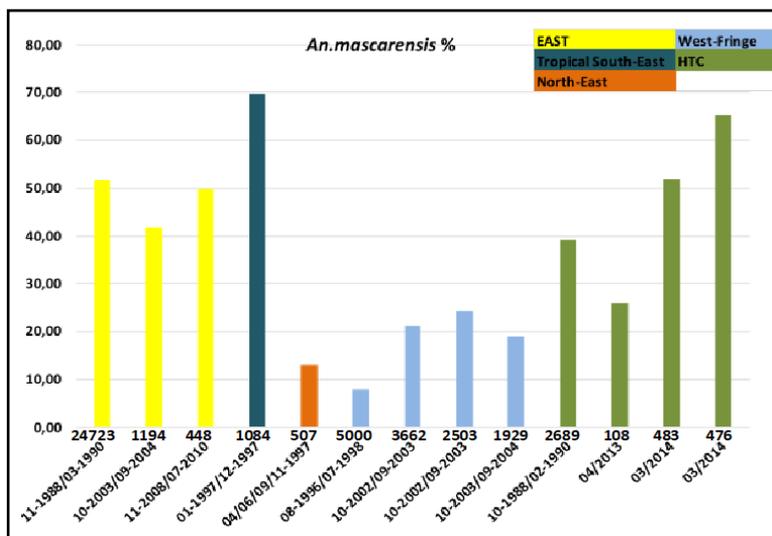
In this review, we assembled unpublished data on the geographical distribution of *An. mascarensis* to update previous distribution map and analysed published data on the biology of this mosquito, its geographical variants and records on its contribution to malaria transmission. This analysis found the ground to further investigate whether *An. mascarensis* is indeed a complex of species with different malaria vectorial capacity.

## SYSTEMATIC POSITION

According to Alexis Grjebine, *An. mascarensis* was once named *An. funesta* var *neireti* by Blanchard in 1906 and later *An. funestus* var *imerensis* by Monier and Treillard in 1935 from abundant samples collected around Antananarivo (Grjebine, 1966; Monier et Treillard, 1935). Unfortunately, no type of these mosquitoes was preserved. Until the holotype description by De Meillon in 1947 (De Meillon, 1947), *An. mascarensis* has long been described as *An. marshalli* (*loc.cit.*). Even later, it was still often confused with this species, despite typical morphological characteristics of the cibarial armature of the adults described by De Meillon (Chauvet, 1962). The larval and pupal stages were only described in 1961 (Grjebine *et* Chauvet, 1961). *An. mascarensis* belongs to the subgenus *Cellia* Theobald and the *Neomyzomyia* series (Christophers, 1924). Within this series a Mascarensis group was proposed, that contains the sole *An. mascarensis* species (Harbach, 1994). By contrast, *An. marshalli* Theobald belongs to the *Myzomyia* series of the *Cellia* subgenus (Christophers, 1924). It was later classified in the Marshalli complex (Gillies *et* Coetzee, 1987) within the Marshalli group (Gillies *et* De Meillon, 1968). This updated information was assembled by Harbach (Harbach, 2013a, 2013b).



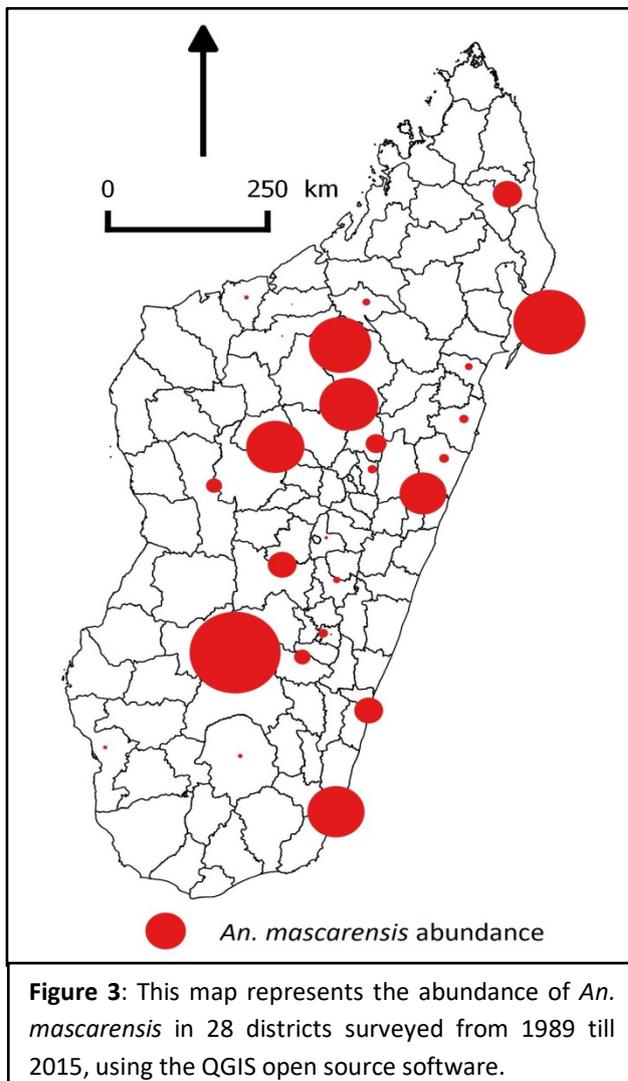
Published records on *An. mascarensis* occurrence are almost non-existent from 1966 till 1988. However, during arbovirus prevalence surveys in the Tsiroanomandidy region (West fringe of the Central Highlands) between 1984 and 1986, *An. mascarensis* has been reported as the second most prevalent *Anopheles* mosquito after *Anopheles maculipalpis* (Fontenille *et al.*, 1988a). Importantly, a similar survey enlarged to the whole Malagasy Island from January 1982 till May 1988 reports the presence of *An. mascarensis* in multiple places across the country confirming a higher prevalence of this mosquito species in the eastern region of Madagascar and its absence or scarce occurrence in the South and in the North, respectively (Fontenille, 1989). Finally, following the 1980's malaria epidemics in the Central Highlands, a specific survey on malaria vectors was conducted in 1987 in three villages closed to Antananarivo (Fontenille *et Rakotoarivony*, 1988). *An. mascarensis* was indeed found with abundance similar to the suspected malaria vectors *Anopheles gambiae* and *An. funestus*, but its abundance was far lower than that of *An. coustani* and *Anopheles squamosus*, labelled as potential secondary malaria vectors in Madagascar (Zahar *et al.*, 1985). In the Comoros, a single publication reports the detection of *An. mascarensis* larvae in Anjouan in 1974 (Starmühlner, 1976). A more recent survey (2008-2012) mentioned the still presence of *An. mascarensis* in Mayotte (Le Goff *et al.*, 2014).



**Figure 2:** Relative abundance of *An. mascarensis* among the malaria vectors *An. gambiae* s.l. and *An. funestus*. Data were obtained from HLC. Numbers underneath each vertical bar represent the sample size.

Following the discovery that *An. mascarensis* could be a malaria secondary vector in 1989 (Fontenille *et al.*, 1992b), more attention has been drawn to this mosquito species in malaria transmission surveys. From published records [1990-2015] (Table 1), covering collections from 1988 till 2014, when looking only at mosquitoes captured by HLC (Human Landing Catches) its relative abundance compared

to *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* varies greatly geographically (Figure 2). It was predominant in the tropical South East, represented roughly 50% of the malaria vectors in the East and the Central Highlands, and was less present in the North-East and the Western fringe of the Central Highlands. Those data confirm the conclusion from A. Grjebine (Grjebine, 1966) for the East and Western regions of Madagascar: high and low relative abundance, respectively. A. Grjebine did not make any specific comments on *An. mascarensis* abundance in the Tropical South-East Region that might have been included in his description of the East part of Madagascar. However, from the data collected since 1990, *An. mascarensis* relative abundance seems to have extended over the 10% recorded by A. Grjebine in the Central Highlands. However, care should be taken that the most recent data in that region (Nepomichene *et al.*, 2015) were collected over a single month per year and per site.



To complement that information, all records of *An. mascarensis* captured from 1989 till 2015 using diverse methods including odour baited-traps (human and animal), CDC light-traps, Muirhead-Thomson pit-traps, catches in stable and outdoor animal shelters, as well as HLC and indoor pyrethroid spraying were extracted from the mosquito database of the Medical Entomology Unit of the Institut Pasteur de Madagascar. Some data have been published elsewhere (ie, Tantely *et al.*, 2012, 2013; Andrianaivolambo *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2006) and others are still unpublished. The entomological surveys were performed in 126 localities (or villages). *An. mascarensis* was found in 93 localities distributed over 28 districts covering 19 of the 22 administrative

regions of Madagascar (Table 1 Sup.). From these records, 13026 *An. mascarensis* were caught in 28 districts during these twenty-six years of entomological surveys (Table 2 Sup). Except in years 1989, 1993, 1994 and 2005, *An. mascarensis* was caught every year. We present in Figure 3 the corresponding map using *An. mascarensis* abundance per district. However, it is important to note that some places have been surveyed only once as other benefit from longitudinal surveys. This map confirms the presence of *An. mascarensis* in areas where it was already present in the 1960's. It does not mean its distribution has shrunk as the spots for survey were selected according to the malaria surveillance activities over the period 1989-2015.

## **BIOLOGY**

### **Breeding sites**

*An. mascarensis* usually breeds in renewable watercourses, in particular in transplanted or uncropped rice fields (Robert *et al.*, 2002; Grjebine, 1966). The larvae occupy both forest streams and water bodies in deforested areas. It also breeds in irrigation canals and streams (Grjebine, 1966, 1953; Grjebine *et Chauvet*, 1961). In Anjouan (Comoros) it was found in watercourses (Starmühlner, 1976) and in marshy area (Marsden *et al.*, 2013) as in Mayotte (Le Goff *et al.*, 2014). *An. mascarensis* larvae can tolerate streams where the current reaches 40 centimeters per second; nevertheless, they search for calm reaches. While found in sunny rice fields, they look for shaded areas provided by shrubs or trees or upright vegetation. Regarding larval association with other malaria vectors, *An. mascarensis* is commonly found along with *An. gambiae* s.l. and *An. coustani*, but rarely with *An. funestus* (Grjebine, 1966).

### **Trophic and resting behavior**

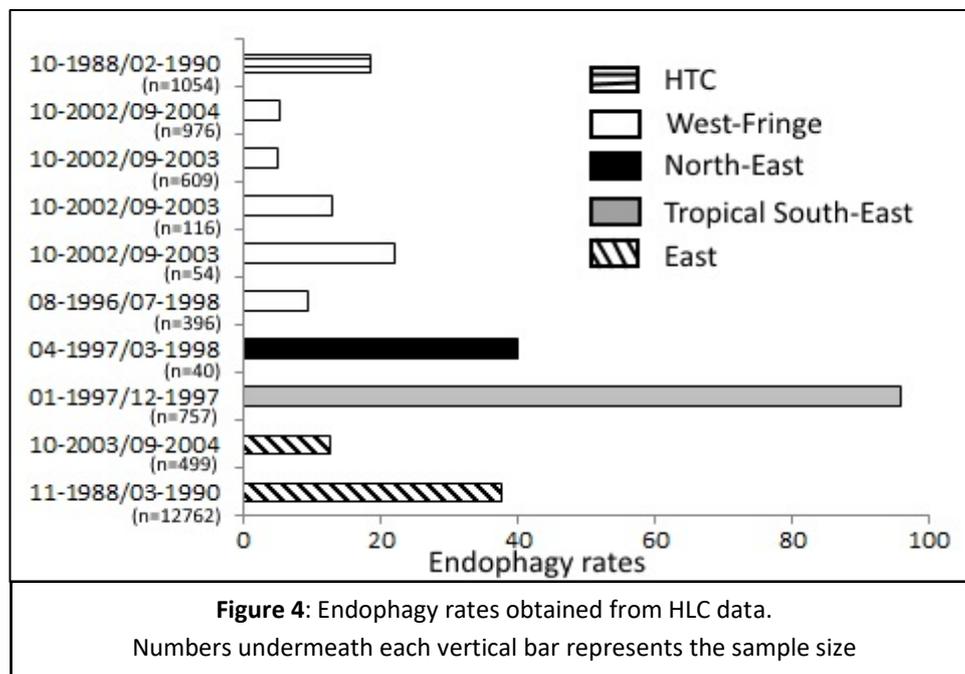
In his seminal work carried out in several regions of Madagascar, Grjebine concluded that *An. mascarensis* is a polyphagous species, largely zoophilic that feeds on humans where cattle are rare (Grjebine, 1966). He also concluded that *An. mascarensis* shows a clear predominance for exophily in the eastern, western and central areas with no mention on its behavior in the remaining regions of Madagascar. From the 1990-2015 published data, it is clear that all but one *An. mascarensis* populations surveyed from 1998 until 2013 are highly exophilic for resting (Table 4).

**Table 4:** Exdophily, endophily and zoophily rates of *An. mascarensis* according to the geographical zone.

Geographical zone	Date of mosquito collection	Exophily rate (%) (n=)	Endophily rate % (n)	Zoophily rate % (n)	Altitude	References
East	Nov.1988-March.1990	ND	37.48 (n=12762)	NT	0 m	Fontenille et al. 1992
	Oct.2003-Sept.2004	98.37 (n=307)	12.42 (n=499)	96,90 (n=129)	900 m	Andrianaivolambo et al. 2010
Tropical South-East	Jan-Dec1997	97.79 (n=3)*	96.04 (n=757)**	NT	160 m	Marrama et al. 1999
North-East	April.1997-March.1998	16.67 (n=6)	40 (n=40)	NT/NA	337 m	Ravoahangimalala et al. 2003
West-Fringe	Aug.1996-July.1998	97.32 (n=448)	9.34 (n=396)	NT	940 m	Rajaonarivelo et al. 2004
	July.1999	95.00 (n=80)	NT	NT	791-1542 m	Le Goff et al. 2003
	Oct.2002-Sept.2003	98.04 (n=102)	22.22 (n=54)	90,48 (n=42)	920 m	Le Goff et al. 2003
		88.89 (n=9)	12.93 (n=116)		900 m	
		96.53 (n=144)	4.93 (n=609)		885 m	
CHL	Oct.2002-Sept.2004	96.60 (n=324)	5.43 (n=976)	99.20 (n=125)	885 m	Robert et al. 2006
CHL	Oct.1988-Feb.1990	ND	18.31 (n=1054)	89.58 (n=48)	1300 m	Fontenille et al. 1990
	April-May.2013	100 (n=14)	NT	92.09 (n=531)	1200 m	Nepomichene et al. 2015

\* Deduced from the indoor residual spraying data; \*\* A likely bias due to high wind during the study; NT: Not Tested; ND: Not Determined; CHL: Central Highlands.

The one population not recorded as exophilic was sampled in the North-East (Ravoahangimalala *et al.*, 2003). Care should nevertheless be taken as the sample size was low. This population seems also more endophagic than the others, not considering the data from the tropical South-East, which endophagic behavior likely resulted from high winds during the survey (Table 4, Figure 4; (Marrama *et al.*, 1999)). Across the populations sampled, there is a quite diverse endophagic behavior, based on HLC data, with no geographical clear pattern (Figure 4)



Globally, *An. mascarensis* has a tendency for exophily (resting outside) and exophagy (feeding outside). Zoophily determined on resting mosquitoes suggests that *An. mascarensis* is highly zoophilic (Table 4). However, this needs to be reevaluated considering the proportion of resting zoophilic mosquitoes and the proportion of mosquitoes captured by HLC as those are considered anthropophilic mosquitoes. Unfortunately, the required information is not always available for each site. It would also be wise to have additional information on for instance presence of cattle and type of shelters.

### **Insecticide Resistance**

Possibly because of the exophilic and exophagic behavior of *An. mascarensis* and its renowned zoophily, this mosquito species was not included in insecticide resistance assays until recently. Past record just mentioned the high frequency of nulliparous *An. mascarensis* after insecticide treatments, suggesting that in the 1960's this mosquito species was fully susceptible to insecticides (Grjebine, 1966). To our knowledge as single recent report addressed the *An. mascarensis* susceptibility status to insecticides (Rakotoson *et al.*, 2017). From indoor collected adults in four sites located on the East and South East it can be concluded that in those areas *An. mascarensis* is fully susceptible to permethrin, deltamethrin and pirimiphos-methyl, despite the small sample sizes ( $18 < n < 65$ ).

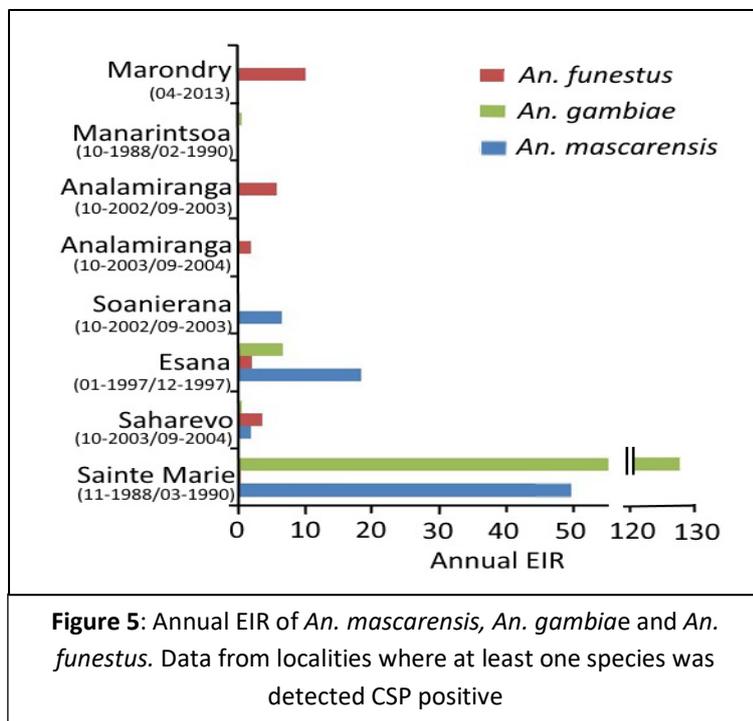
## **VECTOR ROLE OF *ANOPHELES MASCARENSIS***

### **Malaria**

In Madagascar, it has long been considered that malaria transmission was due only to *An. funestus* and *An. gambiae* s.l. Intensive entomological surveys till the 1960's did not find any *An. mascarensis* mosquitoes bearing sporozoites in dissected salivary glands, either from the East coast (4350 mosquitoes) or the West coast (959 mosquitoes) (Chauvet *et al.*, 1964). It was nevertheless suspected that due to their abundance, *An. coustani* and *An. squamosus* could act as local malaria vector in area with residual malaria where *An. gambiae* and *An. funestus* were barely detected (Zahar *et al.*, 1985). Based on this criteria of abundance, Fontenille and collaborators suspected that *An. mascarensis* could actually be an important malaria vector in the Sainte Marie island, where malaria prevalence reached 85% in children 10-15 years old (Fontenille *et al.*, 1992b). Thanks to the development of the ELISA technic

for detecting *Plasmodium* CS protein in preserved mosquito heads and thoraces (Wirtz *et al.*, 1987), they could show that *An. mascarensis* was indeed a vector of human *Plasmodium* with the detection of *P. falciparum* in 14 individuals among 1864 tested. During that survey *An. gambiae* infection rate was high with 165 infected mosquitoes among 9453 tested and by any of the four human *Plasmodium* species present in Madagascar (*loc.cit.*). In the years following this discovery, a systematic detection of *Plasmodium* CSP in *An. mascarensis*, using the ELISA technic and more recently PCR, was included in the entomological surveillance campaigns and malaria epidemiology studies. This led to the evidence that in the tropical South East of Madagascar, *An. mascarensis* was the main malaria vector even if *An. gambiae* and *An. funestus* were present (Marrama *et al.*, 1999).

A comprehensive summary of all published data where *An. mascarensis* was tested for the presence of *Plasmodium* sporozoites by ELISA, including as well data on *An. gambiae* and



*An. funestus* when available is assembled in table 2.

From these published data an annual EIR was calculated for comparison, even if transmission does not occur all year around in any places and keeping in mind that data were not collected over the same time scale in any places. In Figure 5, we plotted the annual EIR data from series where at least one species was detected CSP positive is plotted. This provides a picture of the relative

contribution of each species to malaria transmission in the different regions of Madagascar, not including Soanierana for which no data was available on neither *An. gambiae* nor *An. funestus*. This collated data confirms the important contribution of *An. mascarensis* to malaria transmission in the Eastern part of Madagascar, likely due in part to its abundance (see Fig. 2), but also possibly to a different vectorial competence.

**Table 5:** Summary of all published data mentioning *Plasmodium* sporozoite presence in *An. mascarensis* compared to *An. gambiae* and *An. funestus*

Regions	Species/site/date	ma	SI%	Annual EIR	n. tested for Plasmodium by ELISA	Plasmodium species
<b>East Coast</b>	<b>Sainte Marie (Nov-1988/March-1990)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	18.08	0.75	49.48	1864	Pf
	<i>Anopheles gambiae</i>	19.57	1.78	127.15	9453	Pf, Pv, Pm, Po
	<i>Anopheles funestus</i>	0.41	0.29	0.43	338	Pf
	<b>Saharevo (Oct-2003/Sept-2004)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	0.74	0.75	2.03	268	Pf, Pm
	<i>Anopheles gambiae</i>	0.39	0.48	0.68	211	Pf
	<i>Anopheles funestus</i>	0.65	1.58	3.73	633	Pf, Pv
<b>Tropical South</b>	<b>Esana (Jan-1997/Dec-1997)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	5.65	0.89	18.35	677	Pf
<b>East</b>	<i>Anopheles gambiae</i>	1.96	0.94	6.73	NA	Pf
	<i>Anopheles funestus</i>	0.48	1.25	2.18	NA	Pf
<b>West fringe</b>	<b>Ambohimena (Aug-1997/July-1998)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	0.10	0.00	0.00	197	
	<i>Anopheles gambiae</i>	NT	NT	NT	NT	
	<i>Anopheles funestus</i>	NT	NT	NT	NT	
	<b>Fenoarivo (Aug-1997/July-1998)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	0.06	0.00	0.00	209	
	<i>Anopheles gambiae</i>	NT	NT	NT	NT	
	<i>Anopheles funestus</i>	NT	NT	NT	NT	
	<b>Soanierana (Oct-2002/Sept-2003)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	2.07	0.86	6.51	116	Pf
	<i>Anopheles gambiae</i>	NT	NT	NT	NT	
	<i>Anopheles funestus</i>	NT	NT	NT	NT	
	<b>Analamiranga (Oct-2002/Sept-2003)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	3.17	0.00	0.00	722	
	<i>Anopheles gambiae</i>	0.72	0.00	0.00	672	
	<i>Anopheles funestus</i>	9.15	0.17	5.78	4056	Pf, Pv
	<b>Analamiranga (Oct-2003/Sept-2004)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	1.91	0.00	0.00	590	
	<i>Anopheles gambiae</i>	0.59	0.00	0.00	363	
	<i>Anopheles funestus</i>	7.55	0.07	1.98	2774	Pf
<b>CHL</b>	<b>Manarintsoa (Oct-1988/Feb-1990)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	1.14	0.00	0.00	17	
	<i>Anopheles gambiae</i>	1.67	0.11	0.66	2759	Pf, Pv, Pm
	<i>Anopheles funestus</i>	0.09	0.47	0.16	214	Pf
	<b>Marondry (April-2013)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	1.75	0.00	0.00	147	
	<i>Anopheles gambiae</i>	2.44	0.00	0.00	127	
	<i>Anopheles funestus</i>	2.56	1.08	10.05	93	
	<b>Marondry (march-014)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	15.69	0.00	0.00	251	
	<i>Anopheles gambiae</i>	2.31	0.00	0.00	37	
	<i>Anopheles funestus</i>	12.19	0.00	0.00	195	Pf
	<b>Kiangara (march-2014)</b>					
	<i>Anopheles mascarensis</i>	19.44	0.00	0.00	311	
	<i>Anopheles gambiae</i>	9.06	0.00	0.00	145	
	<i>Anopheles funestus</i>	1.25	0.00	0.00	20	

CHL: Central Highlands; NT: Not Tested; NA: Not Available; Pf: *Plasmodium falciparum*; Pv: *Plasmodium vivax*; Pm: *Plasmodium malariae*; Po: *Plasmodium ovale*

## Arbovirosis and Filariasis

In a systematic search and inventory for arbovirus circulating in Madagascar, *An. mascarensis* was found naturally infected by Ngari virus at the Anjiro region located 72km east from Antananarivo, on two occasions (Fontenille, 1989). Originally isolated from Senegalese *Aedes simpsoni* males in 1979, Ngari virus (Bunyaviridae family, Orthobunyavirus genus)

was responsible for haemorrhagic fever outbreaks in humans from whom it was isolated for the first time in 1993 (Zeller *et al.*, 1996). Up to now *An. mascarensis* was not implicated as a putative vector for other arboviruses.

Although A. Grjebine mentioned that *An. mascarensis* was found with metacyclic microfilariae on the East coast (Grjebine, 1966), likely from *Wuchereria bancrofti*, we could not trace this information was not traced from other accessible publication. However, Brunhes and collaborators were able to infect experimentally two *An. mascarensis* females fed on the blood of a patient infected with *W. bancrofti* worm (Brunhes *et al.*, 1972; Brunhes, 1969).

### ***ANOPHELES MASCARENSIS: A SPECIES IN FULL EVOLUTION OR A COMPLEX OF SIBLING SPECIES?***

In his careful work to demonstrate that *An. mascarensis* was formerly sometimes confused with *An. marshalli*, Chauvet established biometric diagnosis parameters (Chauvet, 1962). These biometric characteristics led him also to demonstrate that *An. mascarensis* populations from the East coast (Ivoloina) differ from populations collected around Antananarivo, Central Highlands. One characteristic relates to the colour of the palps (light versus dark) and the other on wing banding pattern. Already at that time Chauvet pointing to these observed geographical variations wrote that *An. mascarensis* was possibly a species in full evolution. Later on, Fontenille & Campbell provided additional behavioural evidence that *An. mascarensis* population from the East coast differs from the one of the Central Highlands: anthropophilic versus zoophilic (Fontenille *et* Campbell, 1992). They suggested that *An. mascarensis* is a complex of sibling species with different vectorial capacities.

The data collated in this review are further arguing for *An. mascarensis* being a complex of sibling species: from its relative abundance with *An. gambiae* and *An. funestus* that shared similar biotopes, from its endophagic behavior and vectorial capacity estimated as annual EIR. Supporting the observation and data from both Chauvet and Fontenille & Campbell, the collated data highlight a neat difference between populations from the East coast and from the central Highlands, but it also reveals a possible gradient along the different climatic and biogeographic regions of Madagascar.

With the advances of molecular tools, testing the hypothesis of *An. mascarensis* being a complex of sibling species is clearly at hands.

## REFERENCES

- Andrianaivolambo, L., Domarle, O., Randrianariveolosia, M., Ratovonjato, J., Le Goff, G., Talman, A., ... Robert, V. (2010). Anthropophilic mosquitoes and malaria transmission in the eastern foothills of the central highlands of Madagascar. *Acta Tropica*, 116(3), 240-245. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.08.017
- Brunhes, J. (1969). [New data on the vectors of *Wuchereria bancrofti* in Madagascar: the influence of temperature on the rate of development of the parasite and on the vectorial infection rate]. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(5), 763-769.
- Brunhes, J., Rajaonarivelo, E. et Nelson, S. (1972). Epidémiologie de la filariose de Bancroft à Madagascar. II. Recherches sur *Wuchereria vaucei* Galliard, 1959 et étude morphologique comparée des souches malgache et comorienne de *Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877. *Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Ent. med. et Parasitol.*, 10(3), 193–205.
- Burkot, T. R., Williams, J. L. et Schneider, I. (1984). Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(5), 783-788.
- Chauvet, G. (1962). Variabilité géographique chez les femelles d'*Anopheles mascarensis* de Meillon, 1947. Absence d'*A. marshalli* Theobald, 1929 à Madagascar. Dans *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* (p. 1145-1156).
- Chauvet, Guy. (1962). Variabilité géographique chez les femelles d'*Anopheles mascarensis* de Meillon, 1947, absence d'*A. marshalli* Théobald, 1929 à Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 55(6), 1145-1156.
- Chauvet, G, Coz, J., Gruchet, H. et Grjebine, A. (1964). Contribution à l'étude biologique des vecteurs du paludisme à Madagascar. *Médecine Tropicale*, 24(1), 26-45.
- Chauvet, Guy, Coz, J., Gruchet, H., Grjébine, A. et Lumaret, R. (1964). Contribution à l'étude biologique des vecteurs du paludisme à Madagascar: résultats de 5 années d'études (1958-1962). *Médecine Tropicale*, 24(1), 27-44.
- Christophers, S. R. (1924). Provisional list and reference catalogue of the Anophelini. *Indian Medical Research Memoirs*, 3, 1–105.
- Coz, J. (1964). Etude des variations de l'âge physiologique d'*A. gambiae*, Giles et *A. mascarensis*, de Meillon, au cours de captures de nuit. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 57(3), 619-626.
- De Meillon, B. (1947). *The Anophelini of the Ethiopian Geographical Region*. Johannesburg: South African Institute of Medical Research. 10 vol.
- Fontenille, D., Mathiot, C., Rodhain, F., Maleyran, D., Rakotoarivony, I., Digoutte, J. P. et Coulanges, P. (1988a). [Arbovirus diseases in the region of Tsiroanomandidy, Madagascar. Entomological, virological and serological studies]. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale*, 68(1), 43-52.

- Fontenille, D. et Rakotoarivony I. (1988) Reappearance of *Anopheles funestus* as a malaria vector in the Antananarivo region, Madagascar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 644-645
- Fontenille, D., Rakotoarivony, I., Rajaonarivelo, E. et Lepers, J. P. (1988b). [Study of Culicidae in Firaisam-Pokontany of Ambohimanjaka in the environs of Tananarive: results of a longitudinal study, in particular on the vectorial transmission of malaria]. *Archives De l'Institut Pasteur De Madagascar*, 54(1), 231-242.
- Fontenille, D. (1989). [Arbovirus transmission cycles in Madagascar]. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 55(1), 1-317.
- Fontenille, D. (1992). Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar. *Mémoires de la Société royale belge d'Entomologie*, 35, 129-132.
- Fontenille, D. et Campbell, G. H. (1992). Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1), 28-30. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.28>
- Fontenille, D., Lepers, J. P., Coluzzi, M., Campbell, G. H., Rakotoarivony, I. et Coulanges, P. (1992). Malaria transmission and vector biology on Sainte Marie Island, Madagascar. *Journal of medical entomology*, 29(2), 197-202. doi: 10.1093/jmedent/29.2.197
- Gillies, M. T. et Coetzee, M. (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). *Publications of the South African Institute for Medical Research*, 55, 1-143.
- Gillies, M. T. et De Meillon, B. (1968). The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*.
- Goupeyou-Youmsi J. M., Rakotondranaivo T., Andriamiarimanana M. R., Rasoloharimanana T., Puchot N., Rakotoarison R. L., Rakotomalala E., Girod R., Bourgoïn C., Ndiath O. and Vigan-Womas I. (2018). Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar. In prep.
- Grjebine, A. (1953). Observations sur les nématocères vulnérants de Madagascar. *Mémoires de l'Institut Scientifique de Madagascar*, Tome IV (Série E), 443-502.
- Grjebine, A. (1966). *Insectes diptères Culicidae Anophelinae*. (22). Centre IRD de Bondy. Paris: ORSTOM.
- Grjebine, A. et Chauvet, G. (1961). Position systématique d'*Anopheles mascarensis* De Meillon, 1947 et description de la larve et de la nymphe. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 54(1), 119-128.
- Harbach, R. E. (1994). Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*, 84(3), 331-342. doi: 10.1017/S0007485300032454

- Harbach, R. E. (2013a). The Phylogeny and Classification of Anopheles. Dans S. Manguin (dir.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. InTech. doi: 10.5772/54695
- Harbach, R. E. (2013b). Mosquito Taxonomic Inventory. Dans <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> accessed on 02 July 2018.
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K. et Hay, S. I. (2016). Global Epidemiology of Plasmodium vivax. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6 Suppl), 15-34. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141
- Ihantamalala, F. A., Rakotoarimanana, F., Ramiadantsoa, T., Rakotondramanga, J. M., Pennober, G., Rakotomanana, F., Cauchemez, S., Metcalf, C., Herbreteau, V., ... Wesolowski, A. (2018). Spatial and temporal dynamics of malaria in Madagascar. *Malaria journal*, 17(1), 58. doi:10.1186/s12936-018-2206-8
- Jean Jose Nepomichene, T. N., Elissa, N., Cardinale, E. et Boyer, S. (2015). Species Diversity, Abundance, and Host Preferences of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Two Different Ecotypes of Madagascar With Recent RVFV Transmission. *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 962-969. doi: 10.1093/jme/tjv120
- Kang, S. Y., Battle, K. E., Gibson, H. S., Ratsimbasa, A., Randrianarivelosia, M., Ramboarina, S., ... Howes, R. E. (2018). Spatio-temporal mapping of Madagascar's malaria indicator survey results to assess Plasmodium falciparum endemicity trends between 2011 and 2016. *BMC medicine*, 16(71). doi: 10.1186/s12916-018-1060-4
- Kitzmilller, J. B. et America, E. S. of. (1982). *Anopheline names: their derivations and histories*. [Anopheline names]. Maryland: Entomological Society of America.
- Laventure S., Mouchet Jean, Blanchy S., Marrama L., Rabarison P., Andrianaivolambo L., Rajaonarivelo E., Rakotoarivony I., Roux J. (1996). Le riz source de vie et de mort sur les plateaux de Madagascar. *Santé: Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones*, 6 (2), 79-86. ISSN 1157-5999
- Le Goff, G., Goodman, S. M., Elguero, E. et Robert, V. (2014). Survey of the Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Mayotte. *PLoS ONE*, 9(7), e100696. doi: 10.1371/journal.pone.0100696
- Marrama, L., Laventure, S., Rabarison, P. et Roux, J. (1999). *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947): vecteur principal du paludisme dans la région de Fort-Dauphin (Sud-est de Madagascar). *Entomologie Médicale*, 2018, 5-7.
- Marsden, C. D., Cornel, A., Lee, Y., Sanford, M. R., Norris, L. C., Goodell, P. B., ... Lanzaro, G. C. (2013). An analysis of two island groups as potential sites for trials of transgenic mosquitoes for malaria control. *Evolutionary Applications*, 6(4), 706-720. doi: 10.1111/eva.12056
- Monier, H. et Treillard, M. (1935). *Anopheles* (Myzomia) funestus var imerinensis ver. n. de Madagascar-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 28, 572-573.

- Mouchet, J. (1998). [Origin of malaria epidemics on the plateaus of Madagascar and the mountains of east and south Africa]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 91(1), 64-66.
- Mouchet, J., Laventure, S., Blanchy, S., Fioramonti, R., Rakotonjanabelo, A., Rabarison, P., ... Roux, J. (1997). [The reconquest of the Madagascar highlands by malaria]. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique* (1990), 90(3), 162-168.
- Mouchet, Jean, Blanchy, S., Rakotonjanabelo, A., Ranaivoson, G., Rajaonarivelo, E., Laventure, S., ... Aknouche, F. (1993). Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de MadaGascar*, 60(1-2), 50–59.
- Nepomichene, T. N. J. J., Tata, E. et Boyer, S. (2015 décembre). Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malaria Journal*, 14(1), 1-8. doi: 10.1186/s12936-015-1004-9
- Rakotoson, J.-D., Fornadel, C. M., Belemvire, A., Norris, L. C., George, K., Caranci, A., ... Dengela, D. (2017). Insecticide resistance status of three malaria vectors, *Anopheles gambiae* (s.l.), *An. funestus* and *An. mascarensis*, from the south, central and east coasts of Madagascar. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi: 10.1186/s13071-017-2336-9
- Ravoahangimalala, R., Rakotoarivony, H., Le Goff, G. et Fontenille, D. (2003). Ecoéthologie des vecteurs et transmission du paludisme dans la région rizicole de basse altitude de Mandritsara, Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96(4), 323–328.
- Robert, V., Le Goff, G., Andrianaivolambo, L., Randimby, F. M., Domarle, O., Randrianarivojosia, M., ... Arie, F. (2006). Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar. *International Journal for Parasitology*, 36(12), 1273–1281. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.005
- Robert, V., Le Goff, G., Arie, F. et Duchemin, J.-B. (2002). A possible alternative method for collecting mosquito larvae in rice fields fields. *Malaria journal*, 1(4), 1-4.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., ... Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5(1), 69. doi: 10.1186/1756-3305-5-69
- Starmühlner, F. (1976). Contribution to the knowledge of the freshwater-fauna of the isle of Anjouan (Comores). *Cahiers ORSTOM.Série Hydrobiologie*, 10(4), 255-265.
- Tantely, M. L., Rakotoniaina, J., Tata, E., Andrianaivolambo, L., Fontenille, D. and Elissa, N. (2012). Modification of *Anopheles gambiae* distribution at high altitudes in Madagascar. *Journal of Vector Ecology*, 37: 402-406. doi:10.1111/j.1948-7134.2012.00244.x
- Tantely M. L., Rakotoniaina J. C., Tata E., Andrianaivolambo L., Razafindrasata F., Fontenille D., Elissa N. (2013). Biology of Mosquitoes That Are Potential Vectors of Rift Valley Fever Virus in Different Biotopes of the Central Highlands of Madagascar, *Journal of Medical Entomology*, 50 (3), 603–610. doi:10.1603/ME12069
- Wirtz, R. A., Zavala, F., Charoenvit, Y., Campbell, G. H., Burkot, T. R., Schneider, I., ... Andre, R. G. (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against

*Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. Bulletin of the World Health Organization, 65(1), 39-45.

Zahar, A. R., Control, W. H. O. D. of V. B. and et Programme, W. H. O. M. A. (1985). Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria. Part I: The WHO African region & the Southern WHO eastern mediterranean region. Section III: Vector bionomics, malaria epidemiology and control by geographycal areas, VBC/85.3-MAP/85.3, 244.

Zeller, H. G., Diallo, M., Angel, G., Traoré-Lamizana, M., Thonnon, J., Digoutte, J. P. et Fontenille, D. (1996). [Ngari virus (Bunyaviridae: Bunyavirus). First isolation from humans in Senegal, new mosquito vectors, its epidemiology]. Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990), 89(1), 12-16.

**SUPPLEMENTARY FILES**

**Table 1:** Malagasy localities where *Anopheles mascarensis* was found during entomological surveys carried out between 1989 and 2015

Region	District	Commune	Locality
Alaotra-Mangoro	Moramanga	Ambohibary	Ampitambe
Alaotra-Mangoro	Moramanga	Ambohibary	Befotsy
Amoron'i Mania	Ambatofinandrahana	Amborompotsy	Amborompotsy
Amoron'i Mania	Ambatofinandrahana	Amborompotsy	Manavotra
Amoron'i Mania	Ambatofinandrahana	Amborompotsy	Ambalamborona
Amoron'i Mania	Ambatofinandrahana	Amborompotsy	Ankaditsiary
Amoron'i Mania	Ambositra	Ambositra	Ambohimandroso
Amoron'i Mania	Ambositra	Ambositra	Ambahipo
Amoron'i Mania	Ambositra	Andina	Andina
Analamanga	Anjozorobe	Ambongamarina	Anorana forest
Analamanga	Anjozorobe	Ambongamarina	Anorana village
Analamanga	Anjozorobe	Ambongamarina	Antanofotsy village
Analamanga	Anjozorobe	Ambongamarina	Mananta
Analamanga	Ankazobe	Ankazobe	Avarabohitra
Analamanga	Ankazobe	Kiangara	Ambohimanjaka
Analamanga	Ankazobe	Kiangara	Ambohimiandana
Analamanga	Ankazobe	Kiangara	Bemasaondro
Analamanga	Ankazobe	Kiangara	Kianjasoa
Analamanga	Ankazobe	Mahavelona	Ambohidrano)
Analamanga	Ankazobe	Mahavelona	Soamandroso
Analamanga	Ankazobe	Marondry	Miarinarivo Sud
Analamanga	Ankazobe	Marondry	Morafeno
Analamanga	Ankazobe	Marondry	Tsarahonenana
Analamanga	Ankazobe	Marondry	Voninahitrinitany
Analamanga	Manjakandriana	Nandihizana Carion	Ankadiefajoro
Analanjirofo	Fenoarivo-Atsinanana	Ambodimanga II	Anivorano
Analanjirofo	Fenoarivo-Atsinanana	Antsiatsiaka	Tanambao
Analanjirofo	Fenoarivo-Atsinanana	Fouulpointe	Ambalahasina
Analanjirofo	Fenoarivo-Atsinanana	Mahambo	Marovato
Analanjirofo	Fenoarivo-Atsinanana	Mahambo	Sahamandrotra
Analanjirofo	Sainte-Marie	Sainte-Marie	Antanantsinoa
Analanjirofo	Sainte-Marie	Sainte-Marie	Loukinty
Anosy	Betroka	Naniroa	Naniroa
Anosy	Fort-Dauphin	Fort-Dauphin	Esana
Antsinanana	Toamasina II	Antezambaro	Antezambaro
Antsinanana	Toamasina II	Foulpointe	Sahamandrotra

Résultats : chapitre 1

Atsimo-Andrefana	Toliara II	Andranovory	Andranovory
Atsimo-Atsinanana	Farafangana	Farafangana	Mahasoa
Atsimo-Atsinanana	Farafangana	Vohimasy	Vohimasy
Atsinanana	Brickaville	Brickaville	Ambodivandrika
Atsinanana	Brickaville	Brickaville	Ambodifaho
Betsiboka	Maevatanana	Andriba	Ambarinanahary
Betsiboka	Maevatanana	Maevatanana II	Mahatsinjo-Nord
Betsiboka	Maevatanana	Maevatanana II	Andramy
Betsiboka	Maevatanana	Mahatsinjo	Kiangara
Betsiboka	Maevatanana	Mahatsinjo	Mahatsinjo
Betsiboka	Maevatanana	Mahatsinjo	Ampotaka
Betsiboka	Maevatanana	Mahatsinjo	Manjakavaradrano
Betsiboka	Maevatanana	Mahatsinjo	Morarano
Boeny	Ambato-Boeny	NA	Ampijoroa
Boeny	Marovoay	Tsararano	Tsararano
Boeny	Mitsinjo	Antongomena Bevary	Analalava
Boeny	Mitsinjo	Antseza	Morafeno
Bongolava	Tsiroanomandidy	Antsiafabositra	Ambatofotsy
Bongolava	Tsiroanomandidy	Bevato	Soanafindra
Bongolava	Tsiroanomandidy	Mahasolo	Analamiranga
Bongolava	Tsiroanomandidy	Mahasolo	Andranonahoatra
Bongolava	Tsiroanomandidy	Mahasolo	Soanierana
Bongolava	Tsiroanomandidy	Soanierana	Tsiroanomandidy
Bongolava	Tsiroanomandidy	Tsiroanomandidy	Andrefanigara
Bongolava	Tsiroanomandidy	Tsiroanomandidy Fihaonana	Ambohidrangory
Bongolava	Tsiroanomandidy	Tsiroanomandidy Sakay	Soanierana
Bongolava	Tsiroanomandidy	Soanierana	Soanierana
Diana	Antsiranana I	Antsiranana	Anamakia
Ihorombe	Ihosy	Ambatolahy	Ambatolahy Village
Ihorombe	Ihosy	Ambia	Ambia
Ihorombe	Ihosy	Ankily	Ankily
Ihorombe	Ihosy	Sahambano	Sahambano
Ihorombe	Ihosy	Zazafotsy	Ambahatrazo
Ihorombe	Ihosy	Zazafotsy	Anivorano
Ihorombe	Ihosy	Zazafotsy	Ivandrika
Ihorombe	Ihosy	Zazafotsy	Vatovaky
Ihorombe	Ihosy	Zazafotsy	Zazafotsy
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ambalavao	Vatotokana
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Angodongodona	Angodongodona
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ankaramena	Mahasoa
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ankaramena	Ambatohirika
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ankaramena	Mandrapakaholo
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ankaramena	Sahanala

Résultats : chapitre 1

Matsiatra Ambony	Ambalavao	Ankaramena	Morafeno-Sud
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Besoa	Isaha
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Besoa	Ilomay
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Iarintsena	Ankadidisa
Matsiatra Ambony	Ambalavao	Iarintsena	Iarintsena
Matsiatra Ambony	Fianarantsoa	Fianarantsoa	Saharevo
Matsiatra Ambony	Lalangina	Sahambavy	Ampandrambato
Menabe	Miandrivazo	Miandrivazo	Morarano
Menabe	Miandrivazo	Miandrivazo	Tsarafidy
Sava	Andapa	Andapa	Andapa
Sofia	Mampikony	Ambohitoka	Ambalafety (Ankinajibe)
Sofia	Mampikony	Betoratsaka	Betoratsaka
Sofia	Mampikony	Mampikony I	Marojia
Vakinankaratra	Antsirabe II	Ambohibary	Masimpiefera

**Table 2** : Number of *Anopheles mascarensis* collected in 32 districts in Madagascar. during entomological surveys carried out by the *Institut Pasteur de Madagascar*. between 1989 and 2015.

District	Man Outdoor	Man Indoor	Resting Indoor	Shelters Outdoor	Animals (Odour Trap + Shelters)	Total	%
Ambalavao	73	30	1	1	0	105	0.8%
Ambato-boeny	1	0	0	0	1	2	0.0%
Ambatofinandrahana	264	31	3	26	0	324	2.5%
Ambositra	16	2	0	2	0	20	0.2%
Andapa	210	89	4	22	7	332	2.5%
Anjozorobe	0	0	11	165	0	176	1.4%
Ankazobe	777	302	20	252	1	1352	10.4%
Antsirabe II	4	0	0	1	0	5	0.0%
Antsiranana I	0	0	0	1	0	1	0.0%
Betroka	0	9	0	0	0	9	0.1%
Brickaville	19	19	0	0	1	39	0.3%
Farafangana	198	92	0	27	4	321	2.5%
Fenoarivo-Est	0	0	4	20	0	24	0.2%
Fianarantsoa	15	18	3	3	0	39	0.3%
Fort-Dauphin	153	1108	4	0	2	1267	9.7%
Ihosal	2371	724	28	31	22	3176	24.4%
Lalangina	0	0	0	2	0	2	0.0%
Maevatanana	1049	367	2	0	64	1482	11.4%
Mampikony	0	0	0	25	0	25	0.2%
Manjakandriana	0	0	0	35	0	35	0.3%
Marovoay	0	0	0	0	1	1	0.0%
Miandrivazo	69	32	0	1	0	102	0.8%
Mitsinjo	0	0	0	9	1	10	0.1%
Moramanga	456	53	5	330	0	844	6.5%
Sainte Marie	1384	571	5	20	14	1994	15.3%
Toamasina II	24	5	0	4	0	33	0.3%
Toliara II	0	0	0	7	0	7	0.1%
Tsiroanomandidy	971	79	8	237	4	1299	10.0%
Total	8054 (61.8%)	3531 (27.1%)	98 (0.8%)	1221 (9.4%)	122 (0.9%)	13026	

**Man Outdoor** (Outdoor Human landing cath. Odour Baited Entry Trap outside house)

**Man Indoor** (Indoor Human landing cath. Odour Baited Entry Trap inside house)

**Resting Indoor** (Indoor spraying. Indoor CDC Light Trap. Aspirator)

**Outdoor shelters** (Muirhead-Thomson well. Outdoor CDC Light Trap. Stream. WC)

**Animal Odour traps and shelters** (Odour Baited Entry Trap in animal shelters like piggery and chicken coop. CDC Light Trap in animal shelters).

## **Chapitre 2**

Contribution des vecteurs à la transmission du paludisme dans deux villages voisins dans la commune rurale d'Andriba, Madagascar

**Fait l'objet de l'article 2 en cours de soumission.**

Contribution :

Jessy Marlène Goupeyou-Youmsi

Tsiriniaina Rakotondranaivo

Mandaniaina Radotiana Andriamiarimanana

Tsikiniaina Rasoloharimanana

Nicolas Puchot

Rado Lalaina Rakotoarison

Emma Rakotomalala

Romain Girod

Ousmane Ndiath

Inès Vigan-Womas

Catherine Bourgouin

## Résumé en français

Dans une région où la transmission de paludisme est modérée à élevée, la prévalence des cas de paludisme entre deux villages voisins apparemment similaires était significativement différente. Pour tenter de déchiffrer les bases de cette différence, nous avons mené une étude pluridisciplinaire incluant l'entomologie, la parasitologie et l'immunologie. Trois séries d'enquêtes ont été réalisées entre novembre 2016 et avril 2017. Les moustiques ont été capturés sur appât humain et à l'intérieur des maisons par aspersion d'insecticide. La prévalence palustre dans la population humaine a été déterminée par TDR, microscopie et PCR en temps réel. La prévalence et la spécificité des anticorps dirigés contre les antigènes de *Plasmodium* ont été déterminées en utilisant un test sérologique en multiplex.

Les résultats obtenus ont montré que la prévalence du paludisme chez l'homme était de 8,0 % en TDR, 4,8 % en microscopie et 12,2 % en PCR. Les cas d'infection étaient dus à *P. falciparum* (84,3%), *P. vivax* (5,7%) et à *P. malariae* (1,4%) ; avec 8,6% d'infections mixtes impliquant toujours *P. falciparum*. La prévalence du paludisme chez l'homme, qui était plus élevée au milieu de la saison de transmission, était similaire entre les deux villages et correspondait parfaitement aux marqueurs sérologiques d'exposition des parasites et des vecteurs. Les analyses PCR ont confirmé le portage de *P. falciparum* (9 cas) et de *P. vivax* (4 cas) chez trois espèces d'anophèles : *An. funestus* (SI = 1,40 %), *An. coustani* (SI = 0,98 %) et *An. arabiensis* (SI = 0,80 %). Sans différence significative entre les deux villages (SI = 0,82 % à Ambohitromby et SI = 1,15 % à Miarinarivo). Cependant, nous avons observé une contribution différente des espèces de vecteurs dans la transmission du paludisme, *An. arabiensis* ayant une contribution majeure à Ambohitromby (EIR = 0,10 pi/h/n) alors que c'est *An. coustani* (EIR = 0,17 pi/h/n) qui contribue le plus à Miarinarivo.

Nos données confirment les variations épidémiologiques observées pendant la saison de transmission du paludisme dans les deux villages étudiés, avec une augmentation des anticorps dirigés contre les antigènes de *Plasmodium* au milieu de la saison de transmission. L'analyse entomologique détaillée a montré que la contribution des principaux vecteurs n'est pas la même dans les deux villages même si la prévalence du paludisme chez l'homme est similaire. Ces différences pourraient s'expliquer par l'évolution des conditions climatiques, l'environnement écologique différent et/ou la répartition des maisons. Ces études fournissent des informations pertinentes susceptibles de guider la lutte contre la transmission du paludisme à Madagascar.

**Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar**

Goupeyou-Youmsi J. M.<sup>1,2,3</sup>, Rakotondranaivo T.<sup>4</sup>, Andriamiarimanana M. R.<sup>5</sup>, Rasoloharimanana T.<sup>1</sup>, Puchot N.<sup>2</sup>, Rakotoarison R. L.<sup>1</sup>, Rakotomalala E.<sup>1</sup>, Girod R.<sup>5</sup>, Bourgouin C.<sup>2\*</sup>, Ndiath O.<sup>4\*</sup> and Vigan-Womas I.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unité d'Immunologie des maladies infectieuses, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar

<sup>2</sup>Unité de génétique fonctionnelle des maladies infectieuses, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

<sup>3</sup>Ecole doctorale Complexité du Vivant, Sorbonne Université, 21 rue de l'École de médecine 75006 Paris, France

<sup>4</sup>G4 Malaria Group, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar

<sup>5</sup>Unité d'Entomologie médicale, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar

\*Equal contribution

Corresponding author: [ines@pasteur.mg](mailto:ines@pasteur.mg), Unité d'Immunologie des maladies infectieuses, PhD-HDR, Institut Pasteur de Madagascar, PO box 1274 Ambatofotsikely Avaradoha, 101 Antananarivo, Madagascar, Tel: +261 (0) 20 22 590 03, Fax: +261 (0) 20 22 415 34.

Keywords: *Anopheles arabiensis*, *Anopheles coustani*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Andriba, Madagascar.

Funding Information

This work was supported by an Institut Pasteur de Madagascar grant. GYJM was supported by a grant from the Réseau International des Instituts Pasteur. The funders had no role in study design, data collection, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions: Sample collections: GYJM, RT, AMR, ER, RRL, RE; Sample treatment and experimentations: GYJM, RT, RRL, PN; Data treatment and statistical analysis: GYJM, IVW; Wrote the paper: GYJM, BC, IVW, NO; Providing the entomologist staff: GR.

## ABSTRACT

In a region of moderate to high malaria transmission, the prevalence of malaria cases in two nearby villages with apparent similar pattern was significantly different. To try deciphering the basis of this difference, we conducted a multidisciplinary study including Entomology, Parasitology and Immunology. Surveys were conducted from November 2016 to April 2017 at 3 time periods. Mosquitoes were collected by human landing and pyrethrum spray catches. *Plasmodium* prevalence in the human population was determined by RDT, microscopy and real time PCR. Prevalence and specificity of antibodies against *Plasmodium* antigens were determined using a multiplex bead-based serological assay. The overall human malaria prevalence was 8.0% by RDT, 4.8% by microscopy and 12.2% by PCR. The malaria infections cases were due to *P. falciparum* (84.3%), *P. vivax* (5.7%) and *P. malariae* (1.4%), with 8.6% of mixed infections always involving *P. falciparum*. The human malaria prevalence that was higher at the mid-term of the transmission season was similar between the two villages and perfectly matched with the serological markers for parasite and vector exposure. The real time PCR assays confirmed the carriage of *P. falciparum* (9 cases) and *P. vivax* (4 cases) in three anopheline species: *An. funestus* (SI=1.40%), *An. coustani* (SI=0.98%) and *An. arabiensis* (SI=0.80%). With no significant difference between the two villages (SI=0.82% in Ambohitromby and SI=1.15% in Miarinarivo). However, we observed a different contribution of vector species in malaria transmission, *An. arabiensis* having the major contribution in Ambohitromby (EIR=0.10 ib/m/n) while it is *An. coustani* (EIR=0.17 ib/m/n) that contribute more in Miarinarivo. Our data confirm the epidemiological variations observed during the malaria transmission season in the two villages surveyed, with an increase in antibodies against *Plasmodium* antigens at the middle of the transmission season. The detail entomological analysis showed that the contribution of major vectors is not the same in the two villages even if the human malaria prevalence is similar. These differences could be explained by the changing in climatic conditions, the different ecological environmental and/or the distribution of the houses. Those studies provide relevant information that might guide for adapted malaria transmission control in Madagascar.

## INTRODUCTION

Malaria remains a major health concern in Madagascar, with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* as the most prevalent parasite species (Kang *et al.*, 2018; Howes *et al.*, 2016a, 2016b). These two parasite species are mainly transmitted by *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus*. *Anopheles mascarensis* endemic to Madagascar and *Anopheles coustani* can also act as local or minor vectors can also act as local or minor vectors (Nepomichene *et al.*, 2015; Marrama *et al.*, 1999; Fontenille *et al.*, 1992). Malaria transmission is highly heterogeneous throughout Madagascar and it is therefore important to have the best possible knowledge of the transmission pattern and of the targets to implement proper vector control interventions. Detailed studies showed that the contribution of both principal and secondary vectors to *Plasmodium* transmission varies from one region to the other, even between very close areas (Fontenille, 1992a).

During a malaria survey in a region of moderate to high malaria transmission in 2016, we observed a significant difference in human malaria prevalence between two nearby villages with apparent similar pattern. To try to deciphering the basis of this difference, we conducted a multidisciplinary study including entomology, parasitology and immunology. Such studies are important for a better understanding of the effective contribution of each potential vector to transmit *P. falciparum* and/or *P. vivax* and to contribute to the development of alternative strategies to interrupt malaria transmission. In fact, any vector control strategy whether based on traditional methods (indoor residual spraying and insecticide-treated nets) or new ones (e.g. transgenic mosquitoes) requires the best possible knowledge of the mosquito species and populations that need to be targeted (Coetzee *et al.*, 2000).



latter time point corresponds to the theoretical vanishing of the transmission, which may vary according to the annual climatic situation. Additional parasitology data were recorded in February 2016 and in 2018 from active parasite detection in school children. The study followed ethical principles according to the Helsinki Declaration and was approved by the Malagasy Ethical Committee of the Ministry of Health (agreements N°122-MSANP/CE–2015 and N°141-MSANP/CE–2014). Before any sampling, oral information was given and individual written informed consents were obtained from all participants and from parents or legal guardians of the children enrolled.

### **Mosquito sampling**

Anthropophilic female mosquitoes were collected by human landing catch (HLC) and indoor pyrethrum spray catch (PSC), following WHO protocols (WHO, 2014). At each time point, HLCs were made on adult volunteers from 18h:00 to 06h:00 during three consecutive nights and in two houses per night. One volunteer was sitting inside and another outside and they change places every hour. Volunteers who captured between 18h:00 to 24h:00 have been replaced by two others who took over from 24h:00 to 06h:00. Therefore, for each village and each time point, mosquitoes were collected during 12 human-nights (HNs). PSCs were conducted in five houses different from those used for HLC, randomly chosen and where no kind of insecticide or repellent has been used during the previous week. No insecticide residual spraying (IRS) occurred in the villages from at least 2016 till 2018. We used a pyrethroid based insecticide containing a mixture of Prallethrin, Tetramethrin, and Deltamethrin. It was sprayed from outside of the houses, into openings, holes in walls and eaves, then in the rooms following WHO procedures. Knockdown mosquitoes were then collected by hand picking. The houses were typical Malagasy houses encountered in rural area: usually thatched roofs, with earth walls and composed by one to two rooms. Whether for HLCs or PSCs, houses were chosen randomly in the villages and with no repetition.

### **Blood sampling**

Blood samples were collected from malaria asymptomatic individuals (adult volunteer mosquito collectors, household members of collectors and villagers). Both children and adults present in each village at the time of each survey were involved in the study. For each individual, finger prick blood sample was obtained and used to perform Rapid Diagnostic

Test (malaria Pf/pan SD Bioline RDT), thick and thin blood smears and filter blood spots (standard Whatman 3MM filter paper). Malaria RDT used here allows detection of *P. falciparum* and any of the others *Plasmodium* parasites, *P. vivax*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* which all are present in Madagascar. Microscopy analysis was performed to determine *Plasmodium* species and parasites stages. *Plasmodium* carriage prevalence was also determined by PCR because this technique is more sensitive than RDT and microscopy (Doctor *et al.*, 2016). Additional blood was collected in microvette disposals (microvette® 500 Z-gel, Sarstedt) for detection of antibodies against parasite or mosquito specific antigens (see below). Microvettes were centrifuged daily in the field and conserved at -20°C until used. Blood smears were stained with Giemsa 10% and examined under a light microscope (100X). Species determination and parasite quantification were carried out by examination of thin blood smears. A slide was declared malaria-negative when *Plasmodium* parasites were not detected after examination of 100 high power microscopic fields. Slides were read for asexual parasites and gametocytes, enumerated against 500 leucocytes and expressed as density/ $\mu\text{L}$  assuming an average leucocyte count of 8,000/ $\mu\text{L}$  of blood. An artemisinin-based combination therapy was given to each people with a positive RDT according to national recommendations.

## Mosquitoes

### Mosquito identification

All mosquitoes were identified morphologically using the determination keys of Grjebine (Grjebine, 1966) and De Meillon (De Meillon, 1947). To discriminate *An. gambiae* from *An. arabiensis*, a TaqMan assay was used targeting the intergenic spacer region of the rDNA as described by Walker *et al.* (Walker *et al.*, 2007) following the initial work of Scott *et al.* (Scott *et al.*, 1993). PCR reactions (20  $\mu\text{L}$ ) contained 5  $\mu\text{l}$  of genomic DNA, 4  $\mu\text{L}$  of 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus /no ROX (Solis Biodyne), 300 nM of each primer and 200 nM of each probe. Reactions were run on a StepOnePlus (Applied Biosystems) using the following temperature: an initial step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 20 sec and annealing at 60°C for 1 min.

### **DNA extraction and quality control**

Genomic DNA from *Anopheles* head-thorax was extracted using the DNazol® Reagent (ThermoFisher Scientific). Briefly, head-thorax from each mosquito was put individually in a tube and care was taken to rinse the dissecting equipment in ethanol 70% between each mosquito. 150 µL of DNazol was added and the mosquito tissue crushed using a conical plastic pestle. DNA was then extracted following the manufacturer's protocol. After precipitation the DNA pellet was suspended in a final volume of 50 µL of nuclease-free water. The DNA quality was controlled using a SYBR Green Real-time PCR assay and Applied biosystems reagent (PowerSYBER® Green Master mix). For that, we target the gene encoding the 40S ribosomal protein S7, a highly conserved gene among species belonging to the same genus. Primers previously designed against the *An. gambiae* gene (Tahar, 2002) were aligned against all available *Anopheles* S7 sequences to ensure that those primers will efficiently amplified the S7 gene fragment from any *Anopheles* captured in the field. In addition, we validated the amplification conditions on a subset of lab and field mosquito samples including *Anopheles*, *Cellia* and *Nyssorhynchus* subgenera (not shown). Amplification was performed as follows: an initial step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C/45 sec, annealing at 55°C/30 sec and elongation at 60°C/45 sec. The specificity of the amplification was assessed by viewing the melting curves.

### ***Plasmodium* detection in *Anopheles* mosquitoes**

The detection of human *Plasmodium* gDNA in mosquitoes was performed in two steps. The first step used a TaqMan PCR assay targeting a conserved region of the 18S rRNA gene among the human infecting *Plasmodium* species. For this assay, we used primers and probe previously described (Rougemont *et al.*, 2004) using a MGB probe as Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2010); This combination was previously validated for *Plasmodium* detection in mosquitoes (Sandeu *et al.*, 2012). The *Plasmodium* TaqMan probe was labelled with 5'NED. PCR reactions (20 µL) contained 5 µL of genomic DNA, 4 µL of 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus/no ROX (Solis Biodyne), 300 nM of each primer and 200 nM of probe. Reactions were run on a StepOnePlus (Applied Biosystems) using the following temperature: an initial step at 95°C/10 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C/20 sec and annealing + elongation at 60°C/1 min. *P. falciparum* genomic DNA extracted from NF54 parasite cultures was used as positive control. Any sample with amplification signal before

the 38th cycle was considered positive. For high through put screening, we used a pool strategy (Rath *et al.*, 2017) equal volume of genomic DNA extracted as described above from 6 mosquitoes of the same species were mixed before PCR. Mosquitoes from a positive pool were then analysed individually as for pools. All positive samples in the TaqMan assay were then analysed for identification of *P. falciparum* and *P. vivax* species, in two distinct real-time PCR assays using species-specific primers targeting the cytochrome b gene, and purified gDNA from *P. falciparum* and *P. vivax*, as positive control. The real-time PCR conditions were as described by Canier *et al.* (Canier *et al.*, 2013): an initial step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C/20 sec and annealing + elongation at 60°C/1 min.

## Villagers

### ***Plasmodium* parasite identification from blood samples**

Blood spots were lysed overnight at 4°C with 150 µl per well of 1X HBS buffer (Hepes Buffer Saline) supplemented with 0.5% Saponin, final concentration. Samples were then washed twice with 1X PBS and DNA was extracted with Instagene® Matrix resin (Bio-Rad, France) according to manufacturer's instructions. Molecular detection and identification of *Plasmodium* parasites were performed in two steps: *Plasmodium* parasites were first detected by a "screening real-time PCR" with genus-specific primers targeting the *Plasmodium* cytochrome b gene. Secondly, DNA samples identified as positive for *Plasmodium* were analysed for *Plasmodium* species identification using a nested real-time PCR assay as described (Canier *et al.*, 2013).

### **Bead-based multiplex serological assays**

**Antigens:** Six soluble recombinant proteins and 7 Bovine Serum Albumin (BSA)-conjugated peptides from *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) or *P. malariae* (Pm) and one *Anopheles gambiae* salivary gland peptide gSG6 (Saliv1) were included in this study. BSA (provided by peptide manufacturer) was used as carrier control. Among the *Plasmodium* antigens, 7 are specific to *P. falciparum* (PfAMA1, PfEMP1-PF13, PfGLURP, PfSALSA, PfLSA3, PfLSA1-41, PfCSP), 4 specific to *P. vivax* (PvDBP, PvEBP, PvCSP-VK210 and PvCSP-VK247), and 1 specific to *P. malariae* (PmCSP). Detailed information is provided in Supp Table 2.

Recombinant proteins were previously produced “in house” following published procedures (see Supp Table 2). The size of the different recombinant proteins ranged from 19 to 70 kDa. The proteins coupled to the Luminex beads were estimated to be at or above 80% purity. For all peptides, a N-terminal cysteine residue was added to allow unidirectional coupling to BSA, by the manufacturer (GenScript HK *Inc.*, Hong Kong, China, or Genecust, France). Selection of peptides specific for *P. falciparum*, representing different life stages of the parasite was based on the work of (Kerkhof *et al.*, 2015; Perraut *et al.*, 2015, 2014; Ambrosino *et al.*, 2010; Sarr *et al.*, 2007). Purity of each BSA-peptide was estimated >85% by HPLC and mass spectrometry.

**Covalent coupling of antigens to beads:** Carboxylated Luminex magnetic MagPlex beads (Luminex corp, Austin, USA) were covalently coupled with recombinant proteins, peptide-BSA complexes or BSA used as background control using the ready to use xMAP® Antibody Coupling Kit (ref 40-50016, Luminex corp, Austin, USA) and following manufacturers’ instructions. In total, 14 different color-coded beads were used for this assay. After the coupling step, Ag-coupled beads were counted using a cell counter (Malassez counting chamber), and the coupled microspheres were stored in the dark at 2-8°C until use.

**Serological assays:** Equal numbers of Ag-coupled beads for each antigen were mixed and the mix distributed into a 96-well white polystyrene round bottom microtiter plate (Corning, Ref 3789, Fisher Scientific) to reach a final concentration of 1000 beads/Ag in each well. The plate was subsequently placed on a Luminex Magnetic Plate Separator (Luminex, Ref CN-0269-01) to remove the supernatant and 100 µl of each serum diluted at 1:50 in PTB (1X PBS, 0.05% Tween 20, 1% of BSA) were added in duplicate wells. Plates, protected from light, were incubated at room temperature (18-22°C), 45 min, under constant shaking (350 rpm). Plates were then washed three times in PTB buffer and 100 µl of secondary antibody (R-phycoerythrin conjugated goat F(ab’)<sub>2</sub> anti-human IgG, Molecular Probes/Life Technologies, H10104) diluted at 1:500 in PTB buffer was added in each well. After 45 min incubation in the dark at room temperature (18-22°C), under constant shaking (350 rpm), plates were carefully washed twice with PTB buffer. Beads were finally re-suspended in 120 µl PTB and plates were analysed using the Luminex-MAGPIX system (Millipore, USA) and the xPONENT 4.1 software for acquisition and assay design. The reader was set to read a

minimum of 50 beads per spectral address and the output measured as Median Fluorescence Intensity (MFI) as stated by manufacturer's instruction of use. The level of Ab responses was expressed in MFI (Median Fluorescence Intensity) and a sample was considered positive if its MFI value exceeds the mean MFI negative control values + 3.09 SD.

### **Statistical analysis**

Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA), Stata 15 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC) and GraphPad Prism5 (v5.03, GraphPad Software, San Diego, California, USA) were used for statistical analysis. Pearson's and Fisher's exact tests were used to compare proportion of collected anopheline species and malaria prevalence between the two villages. Student's t test was used to compare the mean of seroprevalences and the mean of antibody levels for each antigen between the two villages. *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Malaria vectors behaviour: Aggressiveness, Endophagy and Endophily rates

A total of 2407 mosquitoes were collected during 72 human-nights in the two villages Ambohitromby and Miarinarivo. *Anopheles* was the most abundant mosquito genus collected (68.6%, n=1650) followed by *Culex* (26.9%, n=647), *Mansonia* (3.5%, n=84), *Aedes* (1.0%, n=24) and *Coquillettidia* (0.1%, n=2). Among the known malaria vectors in Madagascar, *An. coustani* was the most abundant representing 53.0% (n=751) of the malaria vectors, followed by *An. arabiensis* (28.9%, n=410), *An. funestus* (12.8%, n=182) and *An. mascarensis* (4.7%, n=66) (Table 1). *An. gambiae s.s.* was barely represented (0.6%, n=8). Table 2 shows the details of the mosquito species collected in each village by HLCs over each three time points.

**Table 1:** Relative abundances of the four malaria vectors collected by HLCs.

	Ambohitromby				Miarinarivo				Total
	T1	T2	T3		T1	T2	T3		
<i>An. arabiensis</i>	32.5% (n=64)	70.9% (n=207)	4.0% (n=10)	<b>39.4%</b> <b>(n=281)</b>	16.5% (n=16)	41.3% (n=81)	7.8% (n=32)	<b>18.3%</b> <b>(n=129)</b>	<b>28.9%</b> <b>(n=410)</b>
<i>An. gambiae</i>	0% (n=0)	1.4% (n=4)	0% (n=0)	<b>0.6%</b> <b>(n=4)</b>	1.0% (n=1)	1.0% (n=2)	0.2% (n=1)	<b>0.6%</b> <b>(n=4)</b>	<b>0.6%</b> <b>(n=8)</b>
<i>An. funestus</i>	17.3% (n=34)	8.9% (n=26)	18.0% (n=40)	<b>14.0%</b> <b>(n=100)</b>	9.3% (n=9)	7.2% (n=14)	14.4% (n=59)	<b>11.6%</b> <b>(n=82)</b>	<b>12.8%</b> <b>(n=182)</b>
<i>An. mascarensis</i>	12.2% (n=24)	4.4% (n=13)	5.0% (n=12)	<b>6.9%</b> <b>(n=49)</b>	5.2% (n=5)	1.0% (n=2)	2.4% (n=10)	<b>2.4%</b> <b>(n=17)</b>	<b>4.7%</b> <b>(n=66)</b>
<i>An. coustani</i>	38.1% (n=75)	14.4% (n=42)	72.3% (n=162)	<b>39.1%</b> <b>(n=279)</b>	68.0% (n=66)	49.5% (n=97)	75.2% (n=309)	<b>67.1%</b> <b>(n=472)</b>	<b>53.0%</b> <b>(n=751)</b>
Total number of mosq.	197	292	224	<b>713</b>	97	196	411	<b>704</b>	<b>1417</b>

T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3

#### Ambohitromby

In the Ambohitromby village, *An. arabiensis* and *An. coustani* representing 39.4% (n=281) and 39.1% (n=279) of the malaria vectors respectively, were the most abundant species captured over the three time points (Table 1). The aggressive density considering all malaria vectors but *An. gambiae*, increased from 16.4 to 24.1 bites/man/night (b/m/n) respectively at T1 and T2 as the malaria season progressed and decreased again at T3 to 18.6 b/m/n (Fig. 2). There was also a variation in species aggressiveness across the survey with notably *An. arabiensis* being the most aggressive species at T2 ( $ma=17.25$ ) while *An. coustani* was the most aggressive species at T1 ( $ma=6.25$ ) and T3 ( $ma=13.50$ ).

Résultats : chapitre 2

**Table 2:** Mosquitoes collected by HLCs inside and outside houses at three Time points, in the villages Ambohitromby and Miarinarivo.

Species	Ambohitromby						Miarinarivo						Total		
	T1		T2		T3		T1		T2		T3				
	Indoor	Outdoor	Indoor	Outdoor	Indoor	Outdoor	Indoor	Outdoor	Indoor	Outdoor	Indoor	Outdoor			
<b>1.</b> <i>Anopheles arabiensis</i>	19	45	49	158	3	7	<b>281</b>	9	7	30	51	16	16	<b>129</b>	<b>410</b>
<i>Anopheles gambiae</i>	0	0	1	3	0	0	<b>4</b>	1	0	2	0	1	0	<b>4</b>	<b>8</b>
<i>Anopheles funestus</i>	14	20	13	13	31	9	<b>100</b>	8	1	7	7	29	30	<b>82</b>	<b>182</b>
<i>Anopheles mascarensis</i>	4	20	1	12	0	12	<b>49</b>	1	4	0	2	1	9	<b>17</b>	<b>66</b>
<i>Anopheles coustani</i>	12	63	1	41	3	159	<b>279</b>	21	45	37	60	80	229	<b>472</b>	<b>751</b>
<i>Anopheles squamosus/cydippis</i>	1	12	0	43	3	26	<b>85</b>	0	8	19	21	4	11	<b>63</b>	<b>148</b>
<i>Anopheles rufipes</i>	2	7	2	8	0	0	<b>19</b>	2	3	6	5	4	5	<b>25</b>	<b>44</b>
<i>Anopheles maculipalpis</i>	0	7	0	9	0	0	<b>16</b>	5	5	1	8	2	3	<b>24</b>	<b>40</b>
<i>Anopheles pretoriensis</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	1	0	<b>1</b>	<b>1</b>
<i>Culex antennatus</i>	3	27	38	220	0	4	<b>292</b>	26	23	35	64	4	21	<b>173</b>	<b>465</b>
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	4	40	63	0	0	<b>108</b>	4	11	8	15	1	18	<b>57</b>	<b>165</b>
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	1	0	1	0	0	<b>2</b>	<b>2</b>
<i>Culex univittatus</i>	0	4	0	0	0	0	<b>4</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	<b>4</b>
<i>Culex decens</i>	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>	1	1	0	0	0	0	<b>2</b>	<b>3</b>
<i>Culex giganteus</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	1	1	2	2	0	2	<b>8</b>	<b>8</b>
<i>Mansonia uniformis</i>	1	7	2	7	1	2	<b>20</b>	2	3	4	21	4	30	<b>64</b>	<b>84</b>
<i>Aedes skusea</i>	0	5	0	0	0	0	<b>5</b>	1	2	0	0	0	0	<b>3</b>	<b>8</b>
<i>Aedes vittatus</i>	0	1	0	1	0	0	<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	<b>2</b>
<i>Aedes tiptoni</i>	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>	2	6	0	0	1	0	<b>9</b>	<b>10</b>
<i>Aedes Albopictus</i>	0	0	0	1	0	0	<b>1</b>	1	0	1	0	0	0	<b>2</b>	<b>3</b>
<i>Aedes circumlateolus</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>	<b>1</b>
<i>Coquillettidia grandidieri</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>224</b>	<b>146</b>	<b>576</b>	<b>41</b>	<b>219</b>	<b>1267</b>	<b>84</b>	<b>121</b>	<b>150</b>	<b>257</b>	<b>147</b>	<b>377</b>	<b>1140</b>	<b>2407</b>

T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3

For all four malaria vectors, the hourly aggressiveness showed similar trend behaviour at T1, T2 and T3 (Fig. 3). They bit all night long and mainly outdoor, except for *An. funestus* (Fig. 3 & Table 3). *An. funestus* is the most endophagic and endophilic species, not departing from his known behaviour in other regions of Madagascar. Intriguingly, its endophagic rate increased over the three time points surveyed, reaching 77.5% at T3 (Table 3). The endophilic rates for resting behaviour of the four malaria vectors were 42.1% (n=16) for *An. funestus*, followed by *An. arabiensis* (31.6%, n=12), *An. coustani* (15.8%, n=6) and *An. mascarensis* (10.5%, n=4) (Table 4).

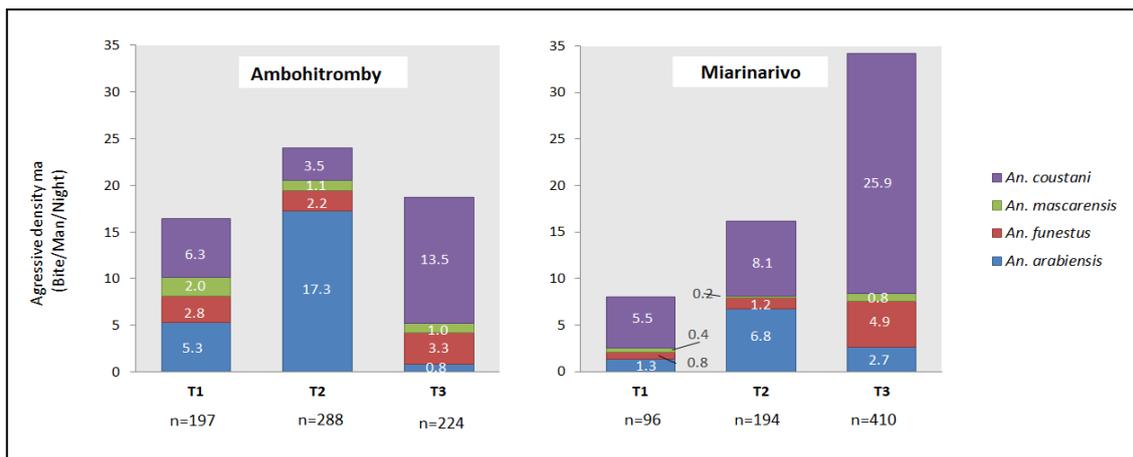


Figure 1: Aggressive density of the malaria vectors in Ambohitromby and Miarinarivo at the three

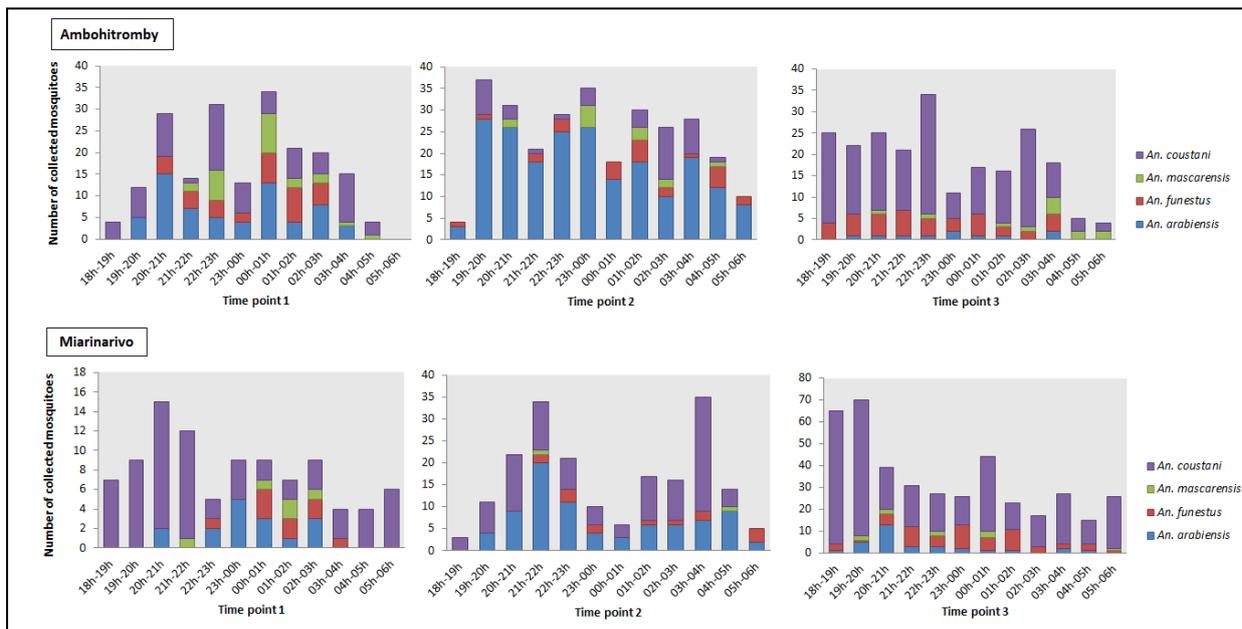


Figure 2: Hourly aggressiveness of malaria vectors in Ambohitromby and Miarinarivo at the three time points.

## Résultats : chapitre 2

**Table 3:** Proportion of the malaria vectors collected biting indoor by HLCs (Endophagic rate).

Species	Ambohitromby				Miarinarivo			Total Medium	
	T1	T2	T3		T1	T2	T3		
<i>An. arabiensis</i>	29.7% (19/64)	23.7% (49/207)	30.0% (3/10)	<b>25.3%</b> <b>(71/281)</b>	56.3% (9/16)	37.0% (30/81)	50.0% (16/32)	<b>42.6%</b> <b>(55/129)</b>	<b>30.7%</b> <b>(126/410)</b>
<i>An. funestus</i>	41.2% (14/34)	50.0% (13/26)	77.5% (31/40)	<b>58.0%</b> <b>(58/100)</b>	88.9% (8/9)	50.0% (7/14)	49.2% (29/59)	<b>53.7%</b> <b>(44/82)</b>	<b>56.0%</b> <b>(102/182)</b>
<i>An. mascarensis</i>	16.7% (4/24)	7.7% (1/13)	0% (0/12)	<b>10.2%</b> <b>(5/49)</b>	20.0% (1/5)	0% (0/2)	10.0% (1/10)	<b>11.8%</b> <b>(2/17)</b>	<b>10.6%</b> <b>(7/66)</b>
<i>An. coustani</i>	16.0% (12/75)	2.4% (1/42)	1.9% (3/162)	<b>5.7%</b> <b>(16/279)</b>	31.8% (21/66)	38.1% (37/97)	25.9% (80/309)	<b>29.2%</b> <b>(138/472)</b>	<b>20.6%</b> <b>(154/751)</b>

T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3

*An. gambiae* was not considered in this table due to its low number.

**Table 4:** Proportion of mosquitoes collected resting indoor by PSC (Endophilic rate).

Values in brackets represent the relative abundance (endophilic rate) to known malaria vectors collected resting indoor (*An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. mascarensis* and *An. coustani*).

Species	Ambohitromby				Miarinarivo			Total
	T1	T2	T3 <sup>(1)</sup>		T1	T2 <sup>(2)</sup>	T3	
<i>An. arabiensis</i>	9	3	0	<b>12</b> (31.6%)	0	0	0	<b>0</b> (18.8%)
<i>An. funestus</i>	10	4	2	<b>16</b> (42.1%)	5	2	18	<b>25</b> (96.2%) (64.1%)
<i>An. mascarensis</i>	3	0	1	<b>4</b> (10.5%)	1	0	0	<b>1</b> (3.8%) (7.1%)
<i>An. coustani</i>	2	0	4	<b>6</b> (15.8%)	0	0	0	<b>0</b> (7.8%)
<i>An. rufipes</i>	1	0	0	<b>1</b>	0	0	0	<b>0</b>
<i>Cx antennatus</i>	0	0	0	<b>0</b>	0	2	0	<b>2</b>
<i>Cx quinquefasciatus</i>	0	3	0	<b>3</b>	0	0	0	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>42</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>28</b> <b>70</b>

<sup>(1)</sup>Captures were performed during 2 days on 3. <sup>(2)</sup>Only 2 houses on 5 were performed.

T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3

### Miarinarivo

In the Miarinarivo village *Anopheles coustani* representing 67.1% (n=472) of the malaria vectors was the most abundant species over the three time points, with variation in its aggressiveness from 5.50 b/m/n at T1 to 25.75 b/m/n at T3 (Table 2 & Fig. 2), heavily contributing to the overall increase in *Anopheles* aggressive density from 8 to 34.3 b/m/n at T1 and T3 respectively. The hourly aggressiveness showed variation between time points (Fig 3). At T1, *An. arabiensis*, *An. funestus* and *An. mascarensis* bit in the middle of the night (22:00h to 03:00h), while *An. coustani* bit preferentially at the beginning (18:00h to 22:00h) and at the end (03:00h to 06:00h) of the night. At T2, the biting pattern showed two waves with peaks of aggressiveness at 21-22h and 03-04h. All species followed the same trends, which might suggest a human bias during the HLCs. At T3, the hourly aggressiveness resembles the one recorded for Ambohitromby at the same time point with *An. coustani* and *An. funestus* biting all the night. As in Ambohitromby, *An. funestus* recorded overall the highest endophagic rate, which was very high (88.9%) at the beginning of the survey and decreased during the transmission season (T2 and T3) to reach the same values as T1 and T2 in Ambohitromby (Table 3). As also noticed, *An. funestus* exhibited a strong endophilic rate (96.2%, n=25) (Table 4).

### Ambohitromby and Miarinarivo

Globally, mosquito abundance and species diversity were similar between the two villages. In both villages the malaria vectors are represented by *An. funestus*, *An. arabiensis*, *An. mascarensis* and *An. coustani*. Only 8 *An. gambiae* were collected by HLC and none by residual insecticide spraying. The most striking difference was the aggressive density, measured as *ma*, of *An. arabiensis* and *An. coustani*. Indeed, in Ambohitromby *An. arabiensis* was the most abundant biting species at T2, almost completely vanishing at T3 to the benefit of *An. coustani*, whereas in Miarinarivo *An. coustani* was the most aggressive mosquito species during the whole survey with an impressive biting rate reaching 25.9 bites/man/nights at T3. In both villages, *An. arabiensis*, *An. coustani* and *An. mascarensis* showed a tendency to exophily for both biting and resting, whereas *An. funestus* demonstrated a strong tendency to endophily (Table 4). *An. funestus*, as in many areas in Madagascar, was the most endophagic species with a medium rate equal to 56.0% for the three time points in both

villages (Table 3). Surprisingly, its endophagic rate even exceeded 77% in both villages, but at different timing: T3 for Ambohitromby, T1 for Miarinarivo, that could suggest the occurrence of different populations of *An. funestus* across the survey

### ***Plasmodium* carriage in human population**

A total of 380 individuals (218 in Ambohitromby and 162 in Miarinarivo) of both male and female sexes were involved in the parasitological study, with an age ranging from 5 months to 68 years old: 16.3% aged <5, 17.6% aged [5 – 10], 18.2% aged [10 - 15] and 47.2% aged >15. The same individuals were involved during the transversal parasitological study including the three malaria diagnostic methods. A total of 590 samples (351 in Ambohitromby and 239 in Miarinarivo) were analysed by each method, except at T3 were 3 blood smears from Miarinarivo were lost.

The overall human malaria prevalence was 8.0% by RDT, 4.8% by microscopy and 11.9% by real-time PCR (Table 5). According to the diagnostic method, no significant difference was observed between the two villages by comparing their prevalence of *Plasmodium* infections ( $P=0.990$  for RDT;  $P=0.491$  for microscopy;  $P=0.926$  for real-time PCR; Pearson Chi2 test). The same trend of *Plasmodium* carriage in both villages was observed: an increase of *Plasmodium* infection at T2 according to the RDT and PCR. Among the 70 positive samples by real-time PCR, 84.3% (n=59) were due to *P. falciparum*, 5.7% (n=4) to *P. vivax*, 1.4% (n=1) to *P. malariae* and 8.6% (n=6) to mixed infections always involving *P. falciparum* (Table 6). All mixed infections were observed in Ambohitromby. The highest prevalence was observed at T2 in both villages (15.2% in Ambohitromby and 18.5% in Miarinarivo) with no statistical differences between each time points ( $P=0.568$  for T;  $P=0.600$  for T2;  $P=0.177$  for T3; Pearson Chi2 test).

Résultats : chapitre 2

**Table 5:** Prevalences of *Plasmodium* infections in asymptomatic individuals obtained from RDT, Microscopy and real-time PCR

		RDT				Microscopy				Real-time PCR			
		T1	T2	T3	Total	T1	T2	T3	Total	T1	T2	T3	Total
Ambohitromby	n	173	79	99	<b>351</b>	173	79	99	<b>351</b>	173	79	99	<b>351</b>
	Positive	13	10	5	<b>28</b>	9	3	3	<b>15</b>	20	12	10	<b>42</b>
	%	7.5%	12.6%	5.1%	<b>8.0%</b>	5.2%	3.8%	3.0%	<b>4.3%</b>	11.6%	15.2%	10.1%	<b>12.0%</b>
Miarinarivo	n	122	65	52	<b>239</b>	122	65	49	<b>236</b>	122	65	52	<b>239</b>
	Positive	9	7	3	<b>19</b>	7	3	3	<b>13</b>	14	12	2	<b>28</b>
	%	7.4%	10.8%	5.8%	<b>7.9%</b>	5.8%	4.6%	5.8%	<b>5.5%</b>	11.5%	18.5%	3.8%	<b>11.7%</b>
Total positive (%)		7.5%	11.8%	5.3%	<b>8.0%</b>	5.4%	4.2%	4.1%	<b>4.8%</b>	11.5%	16.7%	7.9%	<b>11.9%</b>

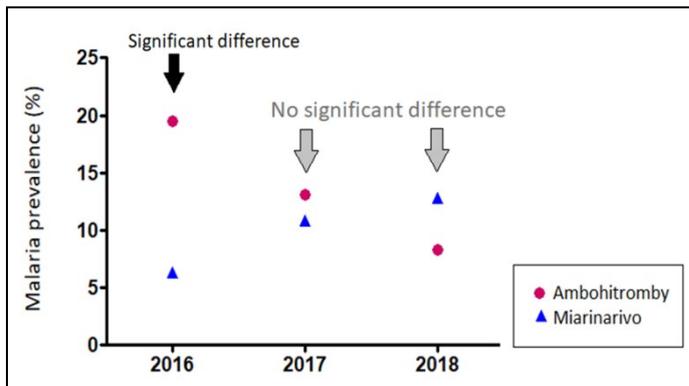
T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3.

The same individuals were involved during the transversal parasitological study including the three methods of malaria diagnostic. In Ambohitromby, were analysed a total of 173, 79 and 99 samples for T1, T2 and T3 respectively. In Miarinarivo, were analysed a total of 122, 65 and 52 samples for T1, T2 and T3 respectively, except at T3 were only 49 smears were read (the 2 others were lost).

**Table 6:** *Plasmodium* species detected by Real Time PCR in asymptomatic individuals

	Ambohitromby				Miarinarivo				Total parasite by species
	T1	T2	T3	Total	T1	T2	T3	Total	
Number of samples	173	79	99	<b>351</b>	122	65	52	<b>239</b>	590
<i>P. falciparum</i>	17	9	7	<b>33</b>	13	11	2	<b>26</b>	59
<i>P. vivax</i>	1	1	1	<b>3</b>	0	1	0	<b>1</b>	4
<i>P. malariae</i>	0	0	0	<b>0</b>	1	0	0	<b>1</b>	1
Mixed infection*	2	2	2	<b>6</b>	0	0	0	<b>0</b>	6
<b>Total parasite by Time point</b>	<b>20</b> (11.6%)	<b>12</b> (15.2%)	<b>10</b> (10.1%)	<b>42</b> (12.0%)	<b>14</b> (11.5%)	<b>12</b> (18.5%)	<b>2</b> (3.8%)	<b>28</b> (11.7%)	<b>70</b>

\*The 6 mixed infections implicate *P. falciparum* with 4 *P. vivax*, 1 *P. malariae* and 1 *P. ovale*. T1=Time point 1, T2=Time point 2, T3=Time point 3.



**Figure 3:** Human malaria prevalence by RDT between Ambohitromby and Miarinarivo over years 2016, 2017 and 2018.

The similarity in malaria prevalence between the two villages is in contrast to the significant difference that was observed in 2006 at a time point corresponding to T2. Figure 4 shows the human malaria prevalence obtained by RDT at T2 during the malaria transmission season in 2016, 2017 and 2018. During the 2016 study a significant difference

( $P=0.019$ , Pearson Chi2 test) in human malaria prevalence was observed between Ambohitromby (19.5%,  $n=41$ ) and Miarinarivo (6.3%,  $n=96$ ). We can likely exclude a size sample effect or a population effect, kipping in mind that in 2017 the survey involved adults and children while the 2016 survey involved mostly children. Indeed, a similar survey in 2018 targeting school children only, showed also no difference in malaria prevalence between the two villages, based on RDT (Figure 4). The malaria prevalence in 2018 was 8.3% ( $n=72$ ) and 12.8% ( $n=94$ ), for Ambohitromby and Miarinarivo, respectively.

### **Plasmodium carriage in anopheline mosquitoes and Entomological Inoculation Rate**

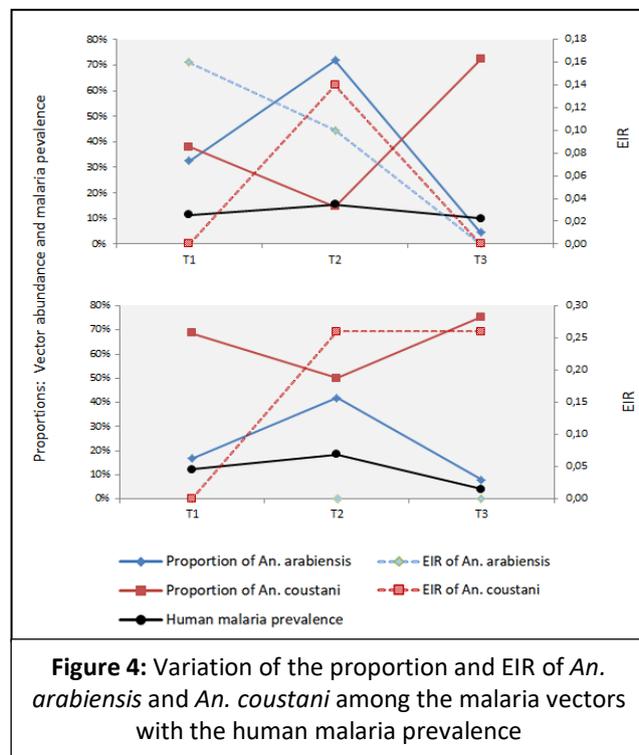
Among the 1650 anopheline mosquitoes captured by HLC, 1553 mosquitoes were tested for harboring *Plasmodium* sporozoites by genus specific Taqman assays using a pool strategy (see M&M). Among 261 pools 23 pools were positive which after deconvolution to individual mosquitoes revealed that 28 of them had *Plasmodium* sporozoites in their head-thorax. The *Plasmodium* species screen by SYBR Green assay revealed that 13 were carrying either *P. falciparum* or *P. vivax* parasite giving an overall sporozoite index (SI) of 0.84% (Table 6). Among the 15 remaining Taqman positives, either they were infected by *P. malariae* which circulate in the villages or our Taqman assay cut-off was not stringent enough, despite our DNA quality control. From the species-specific PCR, 9 mosquitoes were positive for *P. falciparum* and 4 for *P. vivax*, the latter being found only in Ambohitromby. Three anopheline species were found carrying *Plasmodium* parasites: *An. funestus* *An. arabiensis* and *An. coustani*, with the latter species the more frequently infected (Table 7). Nearly half of them (6/13) were collected at T2 (Table 8). No *An. mascarensis* was found positive to *Plasmodium*.

**Table 7:** *Plasmodium* carriage in anopheline mosquitoes analysed in pool and individually by the TaqMan assay. Only a species screening was done by a SYBR Green assay.

Species	Total screened	Pools analysed	Positive pools	Positive samples in pool	Positive in species screening	<i>Plasmodium</i> species (number)	Sporozoitic Index (SI)
<i>An. arabiensis</i>	374	60	8	9	3	<i>Pf</i> (1), <i>Pf</i> (2)	0.80%
<i>An. funestus</i>	213	36	3	3	3	<i>Pf</i> (2), <i>Pv</i> (1)	1.40%
<i>An. coustani</i>	715	122	10	14	7	<i>Pf</i> (6), <i>Pv</i> (1)	0.98%
<i>An. rufipes</i>	40	7	1	2	0	-	-
<i>An. mascarensis</i>	59	10	1	0	0	-	-
<i>An. squamosus</i>	117	20	0	0	0	-	-
<i>An. maculipalpis</i>	35	6	0	0	0	-	-
Total	1553	261	23	28	13	<i>Pf</i> (9), <i>Pv</i> (4)	0.84%

*Pf* : *P. falciparum*; *Pv*: *P. vivax*.

The *Plasmodium* carriage rate in mosquitoes, equivalent to the SI, was not significantly different between the two villages (Pearson’s test  $P=0.546$ , Pearson Chi2 Test). Of note *An. rufipes*, an anopheline species which is not known being a malaria vector in Madagascar, was found positive by the TaqMan *Plasmodium* assay (2/40) but not confirmed by the species-specific assay SYBR Green screen which did not include *P. malariae* (Table 7). It might be worth to include this



species for *Plasmodium* sporozoite carriage in future surveillance programs. When looking at the entomological inoculation rate (EIR), a proxy for malaria transmission, it appears that *An. arabiensis* and *An. coustani* are the vector species that contribute most to malaria transmission, but with striking differences between the two villages and over time. Indeed, in Ambohitromby *An. arabiensis* was the main vector at the beginning of the transmission season with an EIR of 0.16 infective bites per man per night (ib/m/n), followed by *An. coustani* at T2 whereas *An. coustani* was the main vector in

Miarinarivo with a mean EIR of 0.17 ib/m/n, with no role of *An. arabiensis* in that village. To illustrate this result, we plotted in Figure 5 the variation in the relative densities of *An. arabiensis* and *An. coustani* their EIR over time and the malaria prevalence in the screened population.

**Table 8:** Entomological parameters of the malaria vectors confirmed confirmed positive by the SYBR Green assay, at the three time points

Species	Ambohitromby						Miarinarivo						EIR mean by species
	Time point	<i>ma</i>	n	(+)	SI	EIR	Time point	<i>ma</i>	n	(+)	SI	EIR	
<i>An. arabiensis</i>	T1	5.33	66	2	3.03%	0.16	T1	1.33	16	0	-	-	0.05
	T2	17.25	169	1	0.59%	0.10	T2	6.75	81	0	-	-	
	T3	0.83	10	0	-	-	T1	2.67	32	0	-	-	
	Total	7.81	245	3	1.22%	<b>0.10</b>	Total	3.58	129	0	-	-	
<i>An. funestus</i>	T1	2.83	36	1	2.78%	0.08	T1	0.75	14	0	-	-	0.03
	T2	2.17	28	0	-	-	T2	1.17	16	1	6.25%	0.08	
	T3	3.33	42	0	-	-	T3	4.92	77	1	1.30%	0.06	
	Total	2.78	106	1	0.94%	0.03	Total	2.38	107	2	1.87%	0.04	
<i>An. coustani</i>	T1	6.25	70	0	-	-	T1	5.50	65	0	-	-	0.10
	T2	3.50	25	1	8.0%	0.14	T2	8.08	95	3	3.16%	0.26	
	T3	13.50	163	0	-	-	T3	25.75	297	3	1.01%	0.26	
	Total	7.75	258	1	0.39%	0.03	Total	13.11	457	6	1.31%	<b>0.17</b>	
<b>Grand total</b>	/	<b>6.11</b>	<b>609</b>	<b>5</b>	<b>0.82%</b>	<b>0.05</b>	/	<b>6.32</b>	<b>693</b>	<b>8</b>	<b>1.15%</b>	<b>0.07</b>	/

**ma**, the **Aggressive density**, is the proportion of the number of collected mosquitoes by the number of human/night (= 36 for each village). The *ma* is expressed in Bite/man/night.

**n** is the number of anopheline mosquitoes analysed by real time PCR. The DNA was extracted from the head-thorax.

**(+)** correspond to the number of samples positive to *Plasmodium* parasite.

**SI**, the **Sporozoitic Index**, is the number of positive samples divided by the number of analysed samples, in%.

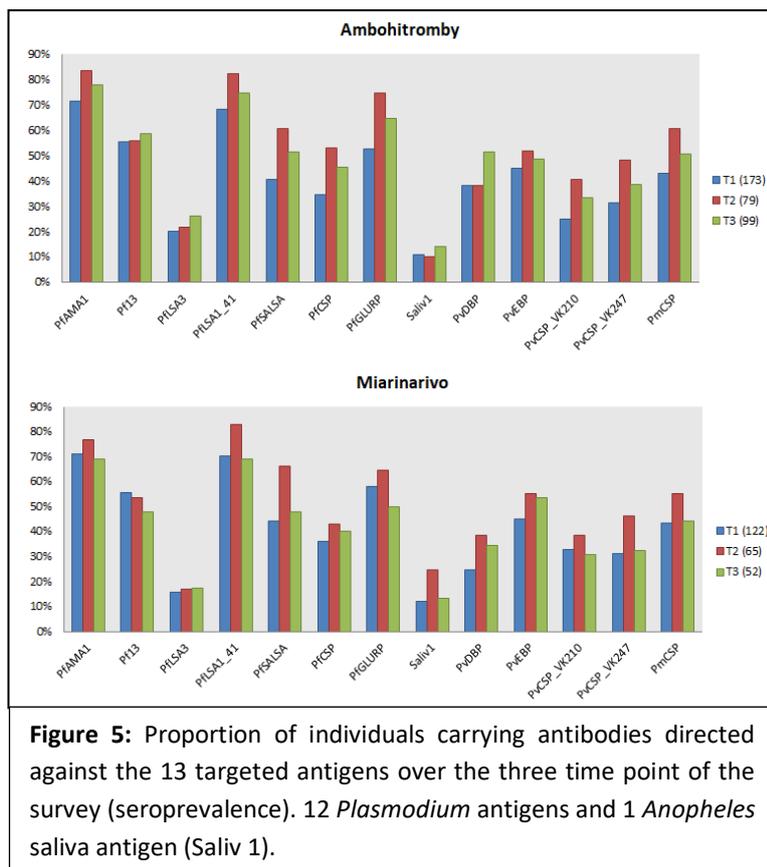
**EIR**, the **Entomological Inoculation Rate** = *ma* x SI. It is expressed in Infective bite/man/night

**T1**=Time point 1, **T2**=Time point 2, **T3**=Time point 3

To conclude, we can say that the *Plasmodium* carriage in mosquitoes was not significantly different between the villages but that the entomological inoculation rate showed the different contribution of vectors in malaria transmission between the two villages even if the human malaria prevalence was similar: *An. arabiensis* having a major contribution in Ambohitromby and *An. coustani* in Miarinarivo.

### Prevalence and levels of antibodies directed against *Plasmodium* and *Anopheles* antigens Seroprevalence

The seroprevalence were variable depending upon antigens, ranging from 10% (IgG to saliv1 peptide in Ambohitromby at T2) to 84% (IgG to PfAMA1 protein in Ambohitromby at T2) (Fig 6).



Globally, we observed a similar trend in immune responses between the two villages with an increase at T2. However, we observed some variations according to the time point. Comparing the seroprevalences between the two populations using the Student's t test, by antigens and for each time point, we observed a significant difference related to IgG to four antigens: PfcSP at T3 ( $P=0.017$ ); PvDBP at T1 ( $P=0.014$ ) and T3 ( $P=0.036$ ); PvCSP-VK247 at T3

( $P=0.022$ ); Saliv1 at T2 ( $P=0.003$ ). Except for the IgG to Saliv1 which significantly increased in Miarinario at T2, the differences observed with the three other IgG are rather related to a seroprevalence increase in Ambohitromby. The seroprevalence showed the strong circulation of the antibodies directed against the 13 target *Plasmodium* and *Anopheles* antigens, and

confirmed the variations observed in human malaria prevalence during the transmission season. Especially with the IgG to Saliv1 that significantly increased at T2 in Miarinarivo (25%) compare to Ambohitromby (10%).

### **Antibody levels**

From the 351 individuals involved in the cross-sectional study, 64 (41 in Ambohitromby and 23 in Miarinarivo) were included in the longitudinal study with a monitoring of changes in antibodies levels. Comparing the two villages, the antibody representing the highest level for the three time points was the IgG to PfAMA1 (13,047 MFI in Miarinarivo at T1) and the antibody presenting the lowest level was the IgG to Saliv1 (88 MFI in Ambohitromby at T2) (Sup. Table 3). There was not a similar trend in antibody levels between the two villages. In Ambohitromby, there was not an coherent evolution of antibody level during the time points. The peaks of different antibody levels that may be at T1, at T2 as at T3. However, in Miarinarivo, Among the four most expressed IgG in the population, IgG directed against both *P. falciparum* (PfAMA1, PfGLURP) and *P. vivax* (PvEBP and PvDBP) antigens were recorded in Ambohitromby. While it is IgG to *P. falciparum* antigens (PfAMA1, PfGLURP, PFLSA1-41, PfSALA), that were the first four more expressed in Miarinarivo. IgG to PmCSP, PvCSP-VK210, PvCSP-VK247 and Saliv1 were the last four expressed in both villages.

## DISCUSSION

In Madagascar, there is an extreme heterogeneity of malaria even in very close areas (Fontenille, 1992b), mainly related to the biogeographical domains (Mouchet *et al.*, 2004, 1993). Rice fields are efficient breeding places for anopheline mosquitoes and therefore malaria vectors (Robert *et al.*, 2002; Laventure *et al.*, 1996; Marrama *et al.*, 1995; Ravoniharimelina *et al.*, 1992). Rice activities take place during the rainy season (from November to April) which also corresponds to the malaria transmission season. The multidisciplinary study we conducted in the rural commune of Andriba located in the north-western part of Madagascar, showed that the contribution of vector species in malaria transmission is different between the two neighbouring villages surveyed even if the human malaria prevalence is similar.

### **Change in the aggressiveness of vector species over the malaria transmission season**

The abundance, the species diversity and the preferences of the mosquitoes were not significantly different between the two villages surveyed. From the anopheline mosquitoes collected, the vectors of human malaria *An. arabiensis*, *An. coustani*, *An. funestus* and *An. mascarensis* were the most abundant. They showed a tendency to exophily for both biting and resting except *An. funestus* that was previously shown to be an endophilic species in Andriba (Fontenille, 1992b). The other species are known to be exophilic malaria vectors in Madagascar. The aggressive density of the malaria vectors in the two villages varied from 8 to 34.3 b/m/n respectively for December and April in Miarinarivo. They have bitten all the night when they were present especially in Ambohitromby. The particularity was observed in Miarinarivo in February where *An. arabiensis* and *An. coustani* were most aggressive during the time slots 21:00-22:00h and 03:00-04:00h. We noticed a difference in the aggressive density according to the time point of the malaria transmission season. *An. arabiensis* was the most aggressive species at the mid-term of the transmission season (in February), mostly in Ambohitromby. While it is *An. coustani* that was most aggressive at the onset (in December) and at the late-term (in April), mostly in Miarinarivo. This change in species aggressiveness over the malaria transmission season could be explained by changes in ecological environment, precisely the rice fields. Indeed, the growing phases of the rice fields determine important changes in the characteristics of the breeding sites (Ravoniharimelina *et al.*, 1992).

Fields with rice in the early stages of growth and with young short plants offer sunny breeding sites favourable for the development of the *An. gambiae* s.l. larvae. As the rice plants grow, they shade the water of the rice field which becomes less favourable for the development of the *An. gambiae* s.l. larvae, giving way to the *An. coustani* larvae that prefer shaded breeding sites. This transition from *An. gambiae* s.l. to *An. coustani* in breeding sites by increasing vegetative cover was also demonstrated for borrow pits in Ethiopia (Kiszewski *et al.*, 2014).

### **Similar human malaria prevalence and immune responses between the two villages**

The human malaria prevalence determined by PCR in asymptomatic villagers revealed malaria infection cases due to the four *Plasmodium* species with 84.3% due to *P. falciparum*, 5.7% (4/73) to *P. vivax*, 1.4% to *P. malariae* and 8.6% to mixed infections always involving *P. falciparum* (with 4 *P. vivax*, 1 *P. malariae* and 1 *P. ovale*, all reported in Ambohitromby). In this parasitological study carried out in 2017, the human malaria prevalences between Ambohitromby and Miarinarivo were not significantly different, with a higher rate at the mid-term of the transmission season, in February. However during the malaria survey we carried out in 2016, we observed significant difference in human malaria prevalence between the two villages. This change in malaria prevalence over three successive years could be explain by climate changes and the mosquito net coverage of the populations (Kesteman *et al.*, 2016; Craig *et al.*, 1999). In fact, during the malaria survey in 2017, we had a cyclone in Madagascar which could influence mosquito breeding sites and therefore their abundance and probably behaviour. But no mosquito nets coverage in Andriba was done between 2016 and 2018.

The prevalence of antibodies directed against the 13 target *Plasmodium* and *Anopheles* antigens and confirmed the variations observed in human malaria prevalence during the transmission season. As in human malaria prevalence, we observed similar trend in immune responses between the two villages with an increase in February, especially with the gSG6 *Anopheles* saliva antigen that significantly increased in Miarinarivo compare to Ambohitromby. Suggesting the high exposition of human population to mosquito bites and therefore the vector density (Rizzo *et al.*, 2011). The IgG to PfAMA1 was the most expressed in both villages.

### Three anopheline species are involved in malaria transmission in Andriba

The real-time PCR assays confirmed the carriage of *P. falciparum* (9 cases) and *P. vivax* (4 cases) in three anopheline species: *An. funestus* (SI=1.40%), *An. coustani* (SI=0.98%) and *An. arabiensis* (SI=0.80%). The infection cases with *P. vivax* (2 of *An. arabiensis*, 1 of *An. coustani* and 1 of *An. funestus*) were recorded only in Ambohitromby, corroborating the *Plasmodium* species carried by the human population in this village. In fact, 3 of the 4 *P. vivax* infections case in human populations was recorded in Ambohitromby, with 4 mixed infections *P. falciparum/P.vivax* (no mixed infection was detected in Miarinarivo). All the mosquitoes positive to *Plasmodium* coming from the HLCs, with 8/13 collected outdoor and 6/13 at the mid-term of the transmission season. Despite his higher endophagic rate, *An. funestus* played a minor role in malaria transmission in Andriba for both villages (EIR mean equal to 0.03, 0.05 and 0.10 ib/m/n for *An. funestus*, *An. arabiensis* and *An. coustani* respectively). Reinforcing the hypothesis that malaria transmission mainly occurred outdoors in Andriba. The *An. mascarensis*, endemic to Madagascar and the Comoros archipelago, was not found positive to *Plasmodium* in the study area. However, it plays a malaria vector role in other Malagasy areas (Marrama *et al.*, 2004, 1993; Le Goff *et al.*, 2003; Fontenille et Campbell, 1992). We found *An. rufipes* positive to the TaqMan assay but we couldn't confirm the *Plasmodium* species by the SYBR Green assay which is known to be less sensitive than the TaqMan assay. The hypothesis of contamination it's not strong because we did two separate TaqMan assays with the same samples, in addition these one could be positive by the SYBR Green assay in case of contamination. Additional assay for the *Plasmodium* species detection by TaqMan would be necessary, and even the DNA sequencing of these samples to find a possible trace of the *Plasmodium* genome. To date, *An. rufipes* has not been shown naturally infected with *Plasmodium* in Madagascar. In continental Africa, it was found naturally infected with *Plasmodium* precisely in Burkina Faso (Holstein, 1949) and more recently in Cameroon (Tabue *et al.*, 2017) where its vector role was clearly demonstrated.

### Different contribution of malaria vector species in malaria transmission between the two villages

*An. arabiensis* is already known to be a good malaria vector in Madagascar unlike *An. coustani*. In this study, we clearly demonstrated the vector role of *An. coustani* in malaria transmission in Andriba (Miarinarivo village) despite the presence of *An. arabiensis*. Bringing more arguments to previous studies that have shown its probable implication in malaria transmission in Madagascar (Nepomichene *et al.*, 2015). In fact, in February in Miarinarivo were we noticed the higher human malaria prevalence (18.5%), among the collected *An. coustani* (n=97) and *An. arabiensis* (n=81) representing both 91.8% of the malaria vectors present there, we detected 3 *An. coustani* (SI=3.16%) positive to *Plasmodium* species against none *An. arabiensis*. Moreover, we didn't find any *An. arabiensis* positive to *Plasmodium* during the other two periods of the transmission season in Miarinarivo. From the multidisciplinary aspect of this study, we also demonstrated the relationship between the presence of *An. coustani* and the number of malaria cases in the study area, corroborating recent observations made in a thesis works (Jean Jose Nepomichene, 2017). *An. coustani* is also known to be a malaria vector in continental Africa: in Cameroon (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006), Zambia (Fornadel *et al.*, 2011), Kenya (Mwangangi *et al.*, 2013), Ethiopia (Kiszewski *et al.*, 2014).

As in human population, there was not significant difference in *Plasmodium* carriage in anopheline population between the two neighbouring villages, SI equal to 0.68% and 0.98% respectively for Ambohitromby and Miarinarivo, with a higher rates recorded in February. Despite this similarity and relying on the progressive replacement of *An. arabiensis* by *An. coustani* over the malaria survey, one would expect to have the same contributions of vector species in malaria transmission between the two villages. Interestingly the EIR showed that *An. arabiensis* plays a major role in malaria transmission in Ambohitromby (EIR=0.10 ib/m/n) while it is *An. coustani* that plays this role in Miarinarivo (EIR=0.17 ib/m/n). This difference strongly related to the species density could be first explained by the predominance in a village, of a type of breeding sites more suitable for one species and not for the other. Indeed, it seems like in Miarinarivo we have a predominance of breeding sites suitable for *An. coustani* with both upright and floating vegetation: last phases of rice fields and edge of rivers and streams (Grjebine, 1966; Jean Jose Nepomichene, 2017). The different contribution of

malaria vector species could also be explained by the layout of the houses and their distance from the rice fields. Previous studies provided a theory demonstrating that the large malaria transmission results to a large population density that is associated with a denser house network, and so a small distance between houses and vector breeding places (Endo et Eltahir, 2016). Indeed, the satellite view of the villages surveyed shows that the houses in Miarivaniro, more numerous and very close to each other compare o Ambohitromby, are also very close to the rice fields. Justifying the different EIRs obtained between the both villages.

## CONCLUSION

Between the two neighbouring villages with apparent similar patterns, the human malaria prevalence that was higher at the mid-term of the transmission season was similar and perfectly matched with the serological makers for parasite and vector exposure. Surprisingly, the detail entomological analysis showed a different contribution of vector species in malaria transmission: *An. arabiensis* having the major contribution in Ambohitromby and *An. coustani* in Miarinarivo. The differences observed could be mainly due to changes in ecological environment including the breeding sites (rice fields) and the layout of the houses and their distance to the breeding places. Those studies provide relevant information that might guide for adapted malaria transmission control. However, a multidisciplinary study over a whole year and from a year to another could provide more information about the differential pattern of malaria vectors and malaria cases in very close areas.

REFERENCES

- Ambrosino, E., Dumoulin, C., Orlandi-Pradines, E., Remoue, F., Toure-Baldé, A., Tall, A., ... Rogier, C. (2010). A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malaria Journal*, 9(1), 317. doi: 10.1186/1475-2875-9-317
- Antonio-Nkondjio, C., Hinzoumbe Kerah, C., Simard, F., Awono-Ambene, P., Chouaibou, M., Tchuinkam, T. et Fontenille, D. (2006). Complexity of the Malaria Vectorial System in Cameroon: Contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of medical entomology*, 43(6), 1215-1221.
- Bonnet, M. C., Dutta, A., Weinberger, C. et Plotkin, S. A. (2006). Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine*, 24(49-50), 7037-7045. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.049
- Canier, L., Khim, N., Kim, S., Sluydts, V., Heng, S., Dourng, D., ... Menard, D. (2013). An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malaria Journal*, 12(405). doi: 10.1186/1475-2875-12-405
- Climate-Data.org. (2018). *Climat Andriba*. <https://fr.climate-data.org/location/472281/>. accessed on 12 July 2018.
- Coetzee, M., Craig, M. et le Sueur, D. (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16(2), 74-77. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01563-X
- Craig, M., Le Sueur, D. et Snow, B. (1999). A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa. *Parasitology Today*, 15(3), 105-111. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01396-4
- De Meillon, B. (1947). *The Anophelini of the Ethiopian Geographical Region*. Johannesburg: South African Institute of Medical Research. 10 vol.
- Divis, P. C., Shokoples, S. E., Singh, B. et Yanow, S. K. (2010). A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. *Malaria Journal*, 9(1), 344. doi: 10.1186/1475-2875-9-344
- Doctor, S. M., Liu, Y., Whitesell, A., Thwai, K. L., Taylor, S. M., Janko, M., ... Meshnick, S. R. (2016). Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: Comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(1), 16–18. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.004
- Dutta, S., Lalitha, P. V., Ware, L. A., Barbosa, A., Moch, J. K., Vassell, M. A., ... Lanar, D. E. (2002). Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* Apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 70(6), 3101-3110. doi: 10.1128/IAI.70.6.3101-3110.2002
- Endo, N. et Eltahir, E. A. B. (2016). Environmental determinants of malaria transmission in African villages. *Malaria Journal*, 15(1), 1-11. doi: 10.1186/s12936-016-1633-7

- Fontenille, D. (1992a). Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar. *Mémoires de la Société royale belge d'Entomologie*, 35, 129–132.
- Fontenille, D. (1992b). Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar. *Mémoires de la Société royale belge d'Entomologie*, 35, 129-132.
- Fontenille, D. et Campbell, G. H. (1992). Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1), 28–30. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.28>
- Fontenille, D., Lepers, J. P., Coluzzi, M., Campbell, G. H., Rakotoarivony, I. et Coulanges, P. (1992, 1 mars). Malaria Transmission and Vector Biology on Sainte Marie Island, Madagascar. *Journal of Medical Entomology*, 29(2), 197-202. doi: 10.1093/jmedent/29.2.197
- Fornadel, C. M., Norris, L. C., Franco, V. et Norris, D. E. (2011). Unexpected Anthropophily in the Potential Secondary Malaria Vectors *Anopheles coustani* s.l. and *Anopheles squamosus* in Macha, Zambia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1173-1179. doi: 10.1089/vbz.2010.0082
- Grjebine, A. (1966). *Faune de Madagascar. XXII. Insectes Diptères Culicidae Anophelinae*. Paris: (n. é.). 22 vol.
- Grjebine, A. (1966). *Insectes diptères Culicidae Anophelinae*. (22). Centre IRD de Bondy. Paris: ORSTOM.
- Holstein, M. (1949). Un nouveau vecteur du paludisme en A.O.F.: *Anopheles rufipes* Gough 1910. *Office de la Recherche Scientifique d'Outre-Mer*, 379(Entomologie médicale et vétérinaire), 8. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K. et Hay, S. I. (2016a). Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6 Suppl), 15-34. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141
- Howes, R. E., Mioramalala, S. A., Ramiranirina, B., Franchard, T., Rakotorahalahy, A. J., Bisanzio, D., ... Ratsimbasoa, A. (2016b). Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar: operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malaria Journal*, 15, 1-18. doi: 10.1186/s12936-016-1556-3
- Jean Jose Nepomichene, T. N. (2017). *Biologie d'Anopheles coustani (Diptera : Culicidae) et implications dans la transmission du Plasmodium et du Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift à Madagascar*. Université d'Antananarivo.
- Kang, S. Y., Battle, K. E., Gibson, H. S., Ratsimbasoa, A., Randrianarivelojosia, M., Ramboarina, S., ... Howes, R. E. (2018). Spatio-temporal mapping of Madagascar's malaria indicator survey results to assess *Plasmodium falciparum* endemicity trends between 2011 and 2016. *BMC medicine*, 16(71). doi: 10.1186/s12916-018-1060-4
- Kerckhof, K., Canier, L., Kim, S., Heng, S., Sochantha, T., Sovannaroeth, S., ... Durnez, L. (2015). Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in Southeast Asian pre-elimination areas. *Malaria Journal*, 14(1). doi: 10.1186/s12936-015-0868-z

- Kesteman, T., Rafalimanantsoa, S. A., Razafimandimby, H., Rasamimanana, H. H., Raharimanga, V., Ramarosandrata, B., ... Randrianarivehojosia, M. (2016). Multiple causes of an unexpected malaria outbreak in a high-transmission area in Madagascar. *Malaria Journal*, 15(1), 1-6. doi: 10.1186/s12936-016-1113-0
- Kiszewski, A. E., Teffera, Z., Wondafrash, M., Ravasi, M. et Pollack, R. J. (2014). Ecological succession and its impact on malaria vectors and their predators in borrow pits in western Ethiopia. *Journal of Vector Ecology*, 39(2), 414-423. doi: 10.1111/jvec.12117
- Koffi, D., Varela, M. L., Loucoubar, C., Beourou, S., Vigan-Womas, I., Touré, A., ... Perraut, R. (2017). Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria cases do not mirror parasite transmission in peri-urban area of Cote D'Ivoire between 2010 and 2013. *PLoS ONE*, 12(2), 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0172899
- Laventure, Stephane, Mouchey, J., Blanchy, S., Marrama, L., Rabarison, P., Andrianaivolambo, L., ... Roux, J. (1996). Le riz source de vie et de mort sur les plateaux de madagascar. *Cahiers Santé*, 6(2), 79-86. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Laventure, Stéphane, Rabarison, P., Mouchet, J., Andrianaivolambo, L., Rakotoarivony, I., Rajaonarivelo, E. et Marrama, L. (1995). Paludisme: perspectives des recherches en entomologie médicale à Madagascar. *Cahiers Santé*, 5, 406-410.
- Le Goff, G., Randimby, F. M., Rajaonarivelo, V., Laganier, R., Léong Pock Tsy, J. M., Ceianu, C. S., ... Robert, V. (2003). *Anopheles mascarensis* de Meillon 1947, vecteur de paludisme dans le Moyen-Ouest de Madagascar ? *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 69(1-2), 57-62.
- Marrama, L., Jambou, R., Rakotoarivony, I., Leong Pock Tsi, J. M., Duchemin, J. B., Laventure, S., ... Roux, J. (2004 janvier). Malaria transmission in Southern Madagascar: Influence of the environment and hydro-agricultural works in sub-arid and humid regions: Part 1. Entomological investigations. *Acta Tropica*, 89(2), 193-203. doi: 10.1016/j.actatropica.2003.09.014
- Marrama, L., Laventure, S., Rabarison, P. et Roux, J. (1999). *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947): vecteur principal du paludisme dans la région de Fort-Dauphin (Sud-est de Madagascar). *Entomologie Médicale*, 2018, 5-7.
- Marrama, Laurence, Rajaonarivelo, E., Laventure, S. et Rabarison, P. (1995). [Anopheles funestus and rice agriculture in the Madagascar highlands]. *Cahiers Santé*, 5, 415-419.
- Mouchet, J, Blanchy, S., Rakotonjanabelo, A., Ranaivoson, G., Rajaonarivelo, E., Laventure, S., ... Aknouche, F. (1993). Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, (9), 50-59. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Mouchet, Jean, Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D. et Sircoulon, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*. (s. 1.): John Libbey Eurotext.
- Mwangangi, J. M., Muturi, E. J., Muriu, S. M., Nzovu, J., Midega, J. T. et Mbogo, C. (2013). The role of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coustani* in indoor and outdoor

- malaria transmission in Taveta District, Kenya. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1-9. doi: 10.1186/1756-3305-6-114
- Nepomichene, T. N. J. J., Tata, E. et Boyer, S. (2015 décembre). Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malaria Journal*, 14(1), 1-8. doi: 10.1186/s12936-015-1004-9
- Nepomichene, T. N., Tata, E. et Boyer, S. (2015). Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malaria journal*, 14(1), 475. doi: 10.1186/s12936-015-1004-9
- Perraut, R., Richard, V., Varela, M. L., Trape, J. F., Guillotte, M., Tall, A., ... Mercereau-Puijalon, O. (2014). Comparative analysis of IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1p19 and PF13-DBL1 $\alpha$ 1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX®-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. *Malaria Journal*, 13(410). doi: 10.1186/1475-2875-13-410
- Perraut, R., Varela, M.-L., Mbengue, B., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O. et Vigan-Womas, I. (2015). Standardization of a multiplex magnetic bead-based for simultaneous detection of igG to *Plasmodium* antigens. *Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases*, 4(2), 1–8. doi: 10.4172/2329-9541.1000134
- Rath, A., Prusty, M. R., Barik, S. K., Das, M., Tripathy, H. K., Mahapatra, N. et Hazra, R. K. (2017). Development, standardization and validation of molecular techniques for malaria vector species identification, trophic preferences, and detection of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Vector Borne Diseases*, 54(1), 25-34.
- Ravoniharimelina, B., Romi, R. et Sabatinelli, G. (1992). Etude longitudinale sur le gîtes larvaires d'*Anopheles gambiae* s.l. dans un canton de la province d'Antananarivo (Hautes terres centrale de Madagascar). *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 67(1), 26-30.
- Rizzo, C., Ronca, R., Fiorentino, G., Verra, F., Mangano, V., Poinsignon, A., ... Arcà, B. (2011). Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: A serological indicator of exposure to afrotropical malaria vectors. *PLoS ONE*, 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0017980
- Robert, V., Le Goff, G., Arieu, F. et Duchemin, J.-B. (2002). A possible alternative method for collecting mosquito larvae in rice fields. *Malaria journal*, 1, 4. doi: 10.1186/1475-2875-1-4
- Rougemont, M., Van Saanen, M., Sahli, R., Hinrikson, H. P., Bille, J. et Jaton, K. (2004). Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific Real-Time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5636-5643. doi: 10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004
- Sandeu, M. M., Moussiliou, A., Moiroux, N., Padonou, G. G., Massougboji, A., Corbel, V. et Tuikue Ndam, N. (2012). Optimized Pan-species and speciation Duplex real-time PCR Assays for *Plasmodium* parasites detection in malaria vectors. *PLoS ONE*, 7(12), e52719. doi: 10.1371/journal.pone.0052719
- Sarr, J. B., Remoue, F., Samb, B., Dia, I., Guindo, S., Sow, C., ... Riveau, G. (2007). Evaluation of antibody response to *Plasmodium falciparum* in children according to

- exposure of *Anopheles gambiae* s.l or *Anopheles funestus* vectors. *Malaria Journal*, 6(117). doi: 10.1186/1475-2875-6-117
- Scott, J. A., Brogdon, W. G. et Collins, F. H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(4), 520-529.
- Tabue, R. N., Awono-Ambene, P., Etang, J., Atangana, J., Antonio-Nkondjio, C., Toto, J. C., ... Bigoga, J. D. (2017). Role of *Anopheles* (*Cellia*) *rufipes* (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: a cross-sectional survey. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1-11. doi: 10.1186/s13071-016-1933-3
- Tahar, R. (2002). Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The EMBO Journal*, 21(24), 6673-6680. doi: 10.1093/emboj/cdf664
- Taylor, S. M., Juliano, J. J., Trottman, P. A., Griffin, J. B., Landis, S. H., Kitsa, P., ... Meshnick, S. R. (2010). High-throughput pooling and real-time PCR-based strategy for malaria detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 512-519. doi: 10.1128/JCM.01800-09
- Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Juillerat, A., Vallieres, C., Lewit-Bentley, A., Tall, A., ... Mercereau-Puijalon, O. (2011). Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* Erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. *PLoS ONE*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pone.0016544
- Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Le Scanf, C., Igonet, S., Petres, S., Juillerat, A., ... Mercereau-Puijalon, O. (2008). An in vivo and in vitro model of *Plasmodium falciparum* rosetting and autoagglutination mediated by *varO*, a group A *var* gene encoding a frequent serotype. *Infection and Immunity*, 76(12), 5565-5580. doi: 10.1128/IAI.00901-08
- Walker, E. D., Thibault, A. R., Thelen, A. P., Bullard, B. A., Huang, J., Odiere, M. R., ... Vulule, J. M. (2007). Identification of field caught *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* by TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping. *Malaria Journal*, 6, 23. doi: 10.1186/1475-2875-6-23
- WHO. (2014). *Module de formation à la lutte contre le paludisme : Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle. Guide du participant.*

**SUPPLEMENTARY FILES**

**Supplementary table 1:** Antigens (recombinant proteins and BSA-conjugated peptides) used in serological assays.

Antigen	Region	Protein or Peptide	Species	Stage of expression	Référence	Sequences
<b>Pf 13</b>	R13	Protein	<i>P. falciparum</i>	Mature blood stage	Vigan-Womas <i>et al</i> , 2011	Odile Puijalon/ Inès Vigan-Womas, Vigan-Womas <i>et al</i> , 2011
<b>PfMA1</b>	R19	Protein	<i>P. falciparum</i>	Sporozoite, Merozoite	Triglia <i>et al</i> , 2000	YKDEIKKEIERESKRIKLNNDNDEGNKKIIPRIFISDDKDSLKC
<b>PfCSP</b>	R20	Peptide	<i>P. falciparum</i>	<b>Sporozoite</b> , Intrahepatic	Webster <i>et al</i> , 1992	NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNVDPNVDPDPC
<b>PfGLURP</b>	R21	Peptide	<i>P. falciparum</i>	Merozoite/Schizont	Theisen <i>et al</i> , 1995	EDKNEKGQHEIVEVEEILC
<b>PfSalsa</b>	R22	Peptide	<i>P. falciparum</i>	Merozoite	Bottius <i>et al</i> , 1996	SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC
<b>PfLsa1-41</b>	R25	Peptide	<i>P. falciparum</i>	Intrahepatic	Fidock <i>et al</i> , 1994	LAKEKLQEQQSDLEQERLAKEKLQEQQSDLEQERLAKEKEKLQC
<b>PfLsa3</b>	R27	Peptide	<i>P. falciparum</i>	Blood stage	Daubersies <i>et al</i> , 2000	VLEESQVNDIDIFNSLVKSVQEQQHNV
<b>PvDBP</b>	R29	Protein	<i>P. vivax</i>	Merozoite	Menard <i>et al</i> , 2013	Odile Puijalon / Didier Menard / Inès Vigan-Womas (PvDBP-RII sequence, allele from Madagascar)
<b>PvEBP</b>	R30	Protein	<i>P. vivax</i>	Merozoite	Menard <i>et al</i> , 2013, Hester <i>et al</i> , 2013	
<b>PvCSP VK210</b>	R34	Peptide	<i>P. vivax</i>	Sporozoite	Henry-Halldin <i>et al</i> , 2011	DGQPAGDRAAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGC
<b>PvCSP VK247</b>	R35	Peptide	<i>P. vivax</i>	Sporozoite	Henry-Halldin <i>et al</i> , 2011	ANGAGNQPANGAGNQPANGAGNQPANGAGNC
<b>PmCSP</b>	R36	Peptide	<i>P. malariae</i>	<b>Sporozoite</b> , Intrahepatic		NAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNDAGC
<b>gSG6 (Saliv1)</b>	R28	Peptide	<i>An. gambiae</i>	Salivary gland	Poinsignon <i>et al</i> , 2008	EKVWVDRDNVYCGHLDCTRVATFC

**Supplementary table 2:** Sequences of the primers and Taqman Probes used in the study

<i>An. gambiae</i> SL	UNI-F	5'-GTGAAGCTTGGTGCCTGCT-3'	Walker <i>et al.</i> , 2007
	UNI-R	5'-GCACGCCGACAAGCTCA-3'	
<i>An. gambiae</i> ss	Probe	5'-VIC- CGGTATGGAGCGGGACACGTA-MGB	
<i>An. arabiensis</i>	Probe	5'-6FAM-TAGGATGGAGAAGGACACTTA-MGB	
<i>Plasmodium</i> spp.	Plasmo1-F	5'-GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA	Modified from Rougemont <i>et al.</i> , 2004
	Plasmo2-R	5'-AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA	
	Plasmoprobe	5'-NED-TCGTAATCTTAACCATAAAC-MGB	
<i>P. falciparum</i> -Cytb	Cytb F	5'-ATGGATATCTGGATTGATTTTATTTATGA	Canier <i>et al.</i> , 2013
	Cytb R	5'- TCCTCCACATATCCAAATTACTGC	
<i>P. vivax</i> -Cytb	Cytb F	5'- TGCTACAGGTGCATCTCTTGTATTC	
	Cytb R	5'- ATTTGTCCCAAGGTAAAACG	

**Supplementary table 3:** Mean antibody levels (in MFI) in the two villages at the three time point.

	T1		T2		T3	
	Amb	Miar	Amb	Miar	Amb	Miar
PfAMA1	11724	13047	11382	13046	11950	11080
Pf13	2089	2206	2485	2098	2214	1669
PfLSA3	771	592	854	876	930	709
PfLSA1_41	2924	3209	3396	5119	3284	3103
PfSALSA	2237	1725	3023	2390	3503	2384
PfCSP	1199	1104	2013	1869	2230	868
PfGLURP	4949	5722	5272	6978	5752	4577
Saliv1	150	126	88	212	128	203
PvDBP	2322	1547	2099	2947	2831	1883
PvEBP	2165	1457	2222	2943	2630	2361
PvCSP_VK210	411	665	1149	844	687	385
PvCSP_VK247	300	344	859	550	685	187
PmCSP	540	608	984	1088	552	605
Total mean	2445	2489	2756	3151	2875	2309

Amb: Ambohitromny; Miar: Miarinarivo.

### **Chapitre 3**

Mise en place d'une plateforme pour les infections expérimentales des  
anophèles par *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* à  
Madagascar

Contribution :

Jessy Marlène Goupeyou-Youmsi

Thiery Nirina Jean Jose Nepomichene

Majoline Tchioffo Tsapi

Sébastien Boyer

Romain Girod

Milijaona Randrianariveლოსია

Inès Vigan-Womas

Ousmane Ndiath

Catherine Bourgouin

#### IV.3.1. Résumé en anglais (Abstract)

Although *Anopheles* surveillance is very active in Madagascar, no vector competence studies have been carried out yet in this country. Such studies are important for a better understanding of the effective contribution of each potential vector to transmit *P. falciparum* and/or *P. vivax* and to contribute to the development of alternative strategies to interrupt malaria transmission. Towards these aims, we have set up an experimental platform in a district where both *P. falciparum* and *P. vivax* are prevalent.

There *Anopheles* mosquitoes are locally produced as F0 from larval catches or as F1 from gravid female catches. In addition, we used an *An. arabiensis* colony (Morafeno strain) that we newly established. Female mosquitoes were fed using a membrane feeding system on the blood of *P. falciparum* gametocyte carriers and any *P. vivax* carriers who were selected among children (5-17 years) attending local schools by blood smears and RDTs. Detection and quantification of oocysts were done by microscopy at day 7 post-infection.

The results obtained during this work have shown the importance of using both microscopy and RDT to select the *Plasmodium* carriers. During the 2016, 2017 and 2018 campaigns, 2748 children have been screened, 12.3% were detected carrying *Plasmodium* parasites by microscopy, with *P. falciparum* representing the major species (95.8%). The asymptomatic carriage of *Plasmodium* in children was negatively correlated to the socio-economic level of the households. We performed 23 successful experimental infections of *An. arabiensis* and 2 of *An. mascarensis*. Results showed that the susceptibility of *An. arabiensis* to *P. falciparum* and *P. vivax* varies according to whether it is a wild or colony strain, as well to the plasmodial species. Although based only on two experiments, the susceptibility of *An. mascarensis* to *P. falciparum* was similar to that of the *An. arabiensis* colony. Our data clearly show that we have now at hand the capacity to study the competence of *Anopheles* mosquitoes of Madagascar to transmit *P. falciparum* and *P. vivax*. In addition, this platform allows studying regularly the *Plasmodium* carriage in the local population.

### IV.3.2. Préambule

Contrairement au couple *Anopheles/P. falciparum*, très peu d'études portent sur les interactions *Anopheles/P. vivax* en Afrique. Ce sujet est d'autant plus intéressant qu'il a été montré que *P. vivax* pouvait infecter les érythrocytes des individus Duffy-négatifs qui sont en grande majorité d'origine africaine (Niangaly *et al.*, 2017 ; Russo *et al.*, 2017 ; Fru-Cho *et al.*, 2014 ; Woldearegai *et al.*, 2013 ; Menard *et al.*, 2010). Les études portant sur les interactions *Anopheles/P. vivax* ont été réalisées soit avec des moustiques de laboratoire (Moreno *et al.*, 2014 ; Zhu *et al.*, 2013 ; Adak *et al.*, 2005 ; Salas *et al.*, 1994 ; Kasap, 1990 ; Kasap *et al.*, 1987) soit avec des moustiques sauvages, essentiellement des F0 majoritairement pour les moustiques difficilement colonisables (Pang *et al.*, 2017 ; Abduselam *et al.*, 2016 ; Rios-Velásquez *et al.*, 2013 ; Klein *et al.*, 1991). Une étude récente a comparé la réceptivité à *P. vivax* d'une colonie d'*Anopheles stephensi* à ses congénères sauvages, concluant à un développement identique des oocystes, mais une plus grande production de sporozoïtes chez les moustiques sauvages (Mohanty *et al.*, 2018). La même équipe avait précédemment suivi la dynamique du développement sporogonique de *P. vivax* chez des *An. stephensi* sauvages, montrant l'apparition de sporozoïtes dès 7 jours après l'ingestion des parasites (Balabaskaran Nina *et al.*, 2017). La cinétique du développement sporogonique de *P. vivax* a été décrite chez des anophèles asiatiques (Zollner *et al.*, 2006) mais pas dans le contexte africain. Par ailleurs, des études ont montré que *P. vivax* et *P. falciparum* interagissent différemment avec le moustique vecteur, notamment dans la phase précoce de développement sporogonique (Mathias *et al.*, 2014 ; Ramasamy R. *et al.*, 1997). En effet, les ookinètes de *P. vivax* et de *P. falciparum* utilisent un groupe différent de glycoprotéines pour leur invasion des cellules épithéliales de l'estomac du moustique.

A Madagascar où le paludisme demeure un problème de santé majeur et où prévalent *P. falciparum* et *P. vivax*, nous-nous sommes proposés d'étudier les interactions entre *P. vivax* et ses hôtes vecteurs majeurs *An. arabiensis*, *An. funestus* et *An. mascarensis* précisément durant les quarante-huit premières heures de la sporogonie d'une part, et la compétence vectorielle de ces mêmes moustiques vis-à-vis de *P. vivax* et de *P. falciparum*. Cela nécessite de pouvoir infecter de manière contrôlée ces espèces de moustiques. Pour cela, il faut idéalement disposer de colonies de moustiques ou du moins avoir accès à du sang de porteurs

de *Plasmodium* car notamment *P. vivax* n'est pas encore cultivable en laboratoire. Il est aussi important de pouvoir confronter les moustiques avec des parasites circulants et non des souches adaptées au laboratoire. L'IPM situé dans la ville d'Antananarivo dispose uniquement d'une colonie d'*An. arabiensis*. De plus, à Antananarivo, la prévalence du paludisme est très faible (Ihantamalala *et al.*, 2018 ; Kang *et al.*, 2018 ; Bencimon *et al.*, 2006 ; Rabarijaona *et al.*, 2006). De ce fait, pour réaliser l'analyse de la compétence vectorielle des anophèles malgaches à Madagascar, il faut sélectionner un site où l'abondance des vecteurs et où la prévalence des infections palustres à *P. falciparum* et à *P. vivax* sont relativement élevées. D'après les récentes données de séroprévalence des anticorps PvMSP1 à Madagascar, allant de 6,6 à 49,5 % (Projet MEDALI, IPM, données non publiées) et d'après les résultats du suivi entomologique mensuel fait par l'IPM, le district de Maevatanana se trouve être le meilleur compromis répondant aux critères de sélection fixés. Cependant, sur place il n'y a pas de local équipé permettant de mettre en pratique ce projet. C'est pour cela que nous avons installé un laboratoire de base (plateforme) pour les infections expérimentales des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax* dans la commune d'Andriba.

### IV.3.3. Stratégie pour la mise en place de la plateforme

La mise en place de la plateforme pour les infections expérimentales des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax* a nécessité de faire en amont plusieurs missions sur le terrain. La première mission effectuée en juin 2015 a eu pour but de choisir les locaux potentiels où nous aurions pu installer la plateforme, et prendre contact avec les administrateurs publics locaux afin d'obtenir leurs autorisations. Les autorisations obtenues se sont faites à trois niveaux de la subdivision administrative de Madagascar : au niveau du district avec le chef de la Circonscription scolaire de Maevatanana, au niveau de la commune avec le maire et le commandant de brigade d'Andriba et au niveau des « fokontany » avec les chefs de village. La deuxième mission effectuée en novembre 2015 a permis de voir la faisabilité réelle sur le terrain des infections expérimentales : sensibilisation des populations dans les écoles et les ménages ; prospection des gîtes larvaires et des lieux de repos ou d'activité des moustiques adultes ; aménagement et organisation des locaux. Les missions effectuées durant la saison de transmission de paludisme de novembre 2015 à avril 2016, ont permis de démontrer la faisabilité sur le terrain des infections expérimentales des anophèles par *Plasmodium* avec mise en place de la plateforme proprement dit. Les missions réalisées durant les saisons de transmission 2017 et 2018 ont permis la réalisation avec succès de nombreuses infections. Pour cela, nous avons :

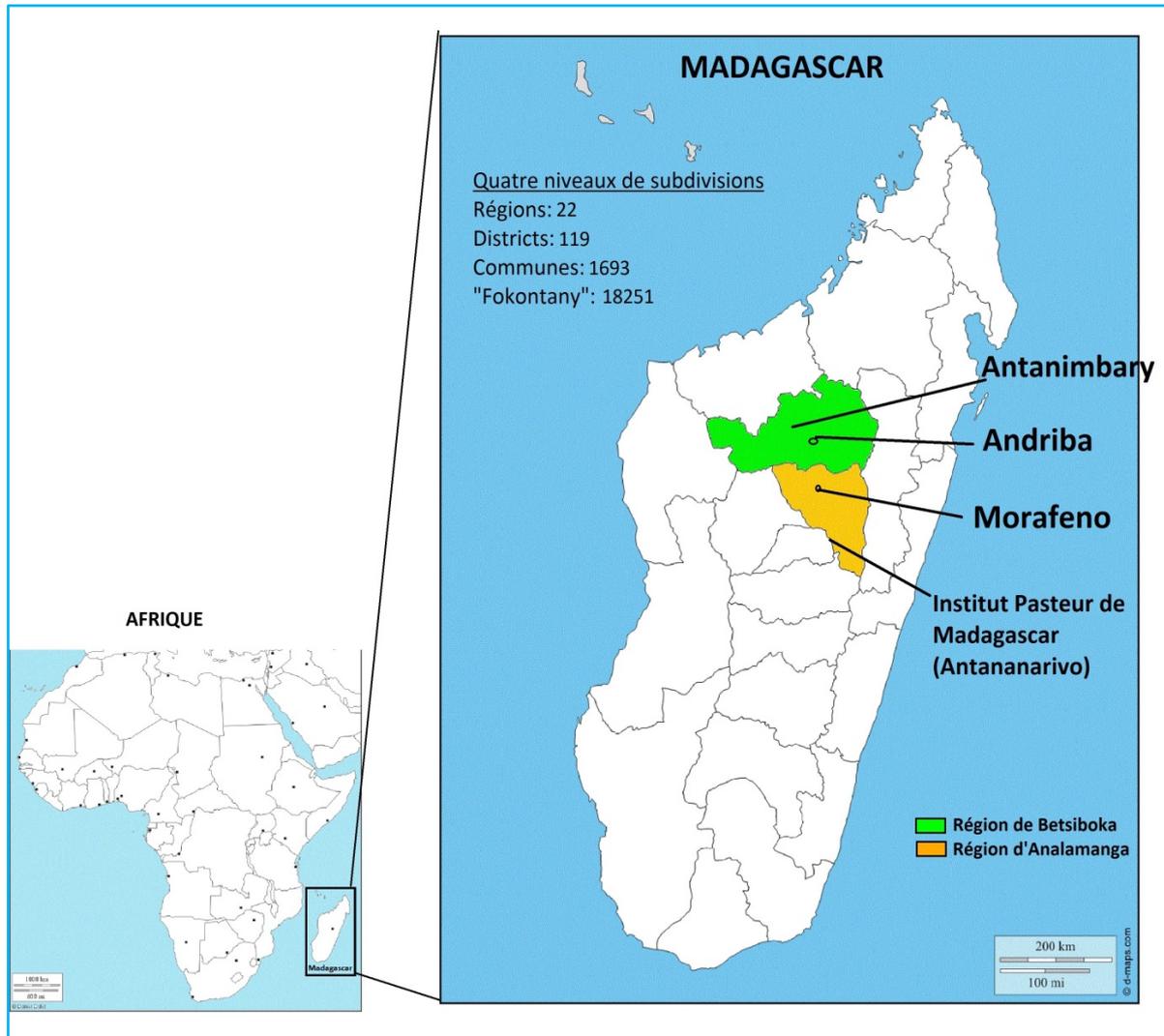
- capturé des anophèles (*An. gambiae* s.l., *An. funestus*, *An. mascarensis* et *An. coustani*), des larves et des femelles adultes gorgées pour la production des moustiques de la F0 et de la F1 respectivement ;
- fait des dépistages actifs dans les écoles et les « fokontany » pour sélectionner les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* et les porteurs de *P. vivax* ;
- infecté expérimentalement les anophèles F0 et F1 avec le sang des porteurs de *Plasmodium* ;
- fait des dissections de moustiques sept jours post-infection pour l'évaluation de la prévalence des infections.

#### IV.3.4. Choix du site d'étude

Plusieurs critères de sélection ont été pris en compte pour le choix du site d'installation de la plateforme à Madagascar. Les principaux sont mentionnés dans les lignes qui suivent.

- La prévalence des infections palustres à *P. falciparum* et à *P. vivax* doit y être relativement élevée. Ou à défaut, la plateforme ne doit pas être très éloignée d'une localité où la prévalence des infections palustres à ces deux espèces plasmodiales est élevée.
- La présence dans le site, en abondance élevée, des vecteurs majeurs de paludisme : *An. gambiae* s.l., *An. mascarensis* et *An. funestus*.
- L'accès à l'électricité et à l'eau courante.
- La disponibilité d'une équipe médicale locale.
- D'autres critères non négligeables ont aussi été pris en compte : la sécurité de l'équipe sur le terrain ; la distance du site par rapport au laboratoire de recherche localisé à l'IPM qui doit être idéalement d'une journée de voyage en voiture maximum.

Hormis les critères prenant en compte la logistique, tous les autres sont dépendant des conditions climatiques dans le site. De manière générale, le climat de Madagascar comporte deux saisons : une saison sèche d'avril à octobre et une saison des pluies d'octobre à avril. En tenant compte de tous les critères énoncés plus haut, deux communes rurales situées dans le district de Maevatanana ont été sélectionnées pour la mise en place et la fonctionnalité de la plateforme : Andriba et Antanimbary. Le district de Maevatanana (situé dans la région de Betsiboka) est caractérisé par un climat tropical chaud et les températures moyennes annuelles sont de 24,0 °C pour Andriba et de 26,6 °C pour Antanimbary. Il tombe en moyenne 1828 mm et 1715 mm de pluie par an, respectivement pour Andriba et Antanimbary (Climate-Data.org, 2018a, 2018c). Une partie des moustiques provenait du village de Morafeno situé dans le district d'Ankazobe qui est caractérisé par un climat chaud et tempéré, avec une température annuelle moyenne de 19,7 °C et des précipitations annuelles moyennes de 1481 mm (Climate-Data.org, 2018b). Les positions géographiques de ces lieux ainsi que celle de l'IPM situé à Antananarivo, sont représentées dans la figure 15 ci-après.



**Figure 15. Site d'étude pour la mise en place de la plateforme**

Les lignes en gris clair sur la carte de Madagascar délimitent les vingt-deux régions. Depuis la réforme de 1991, il y a quatre niveaux de subdivisions à Madagascar : les régions, les départements ou districts, les communes et les « Fokontany » = villages, hameaux ou quartiers (Nations unies, « Subdivisions de Madagascar », 2018).

➤ **Lieu d'installation de la plateforme : Andriba**

La commune rurale d'Andriba (17°36'37.8"S, 46°56'04.9"E) a été choisie pour l'installation de la plateforme parce qu'elle présente beaucoup d'avantages. Elle est située à une heure de route en voiture (soit 67,5 km) de la commune d'Antanimbary (17°11'06.4"S, 46°51'18.6"E), un des foyers à *P. vivax* où nous n'avons pas pu trouver un local adéquat pour

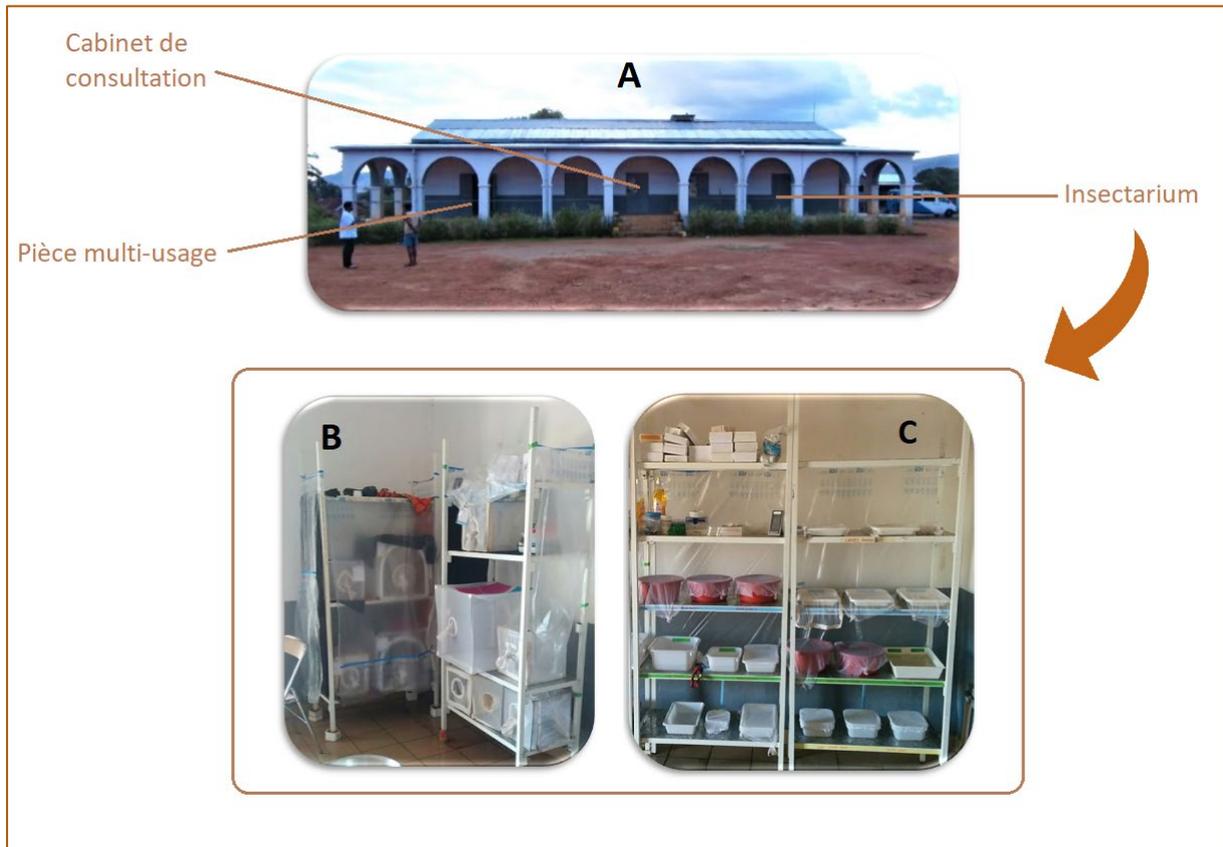
y installer la plateforme. Andriba est situé à environ cinq heures en voiture (soit 193 Km) de l'IPM. Les autres avantages du choix de cette commune sont entre autres la présence de plusieurs écoles à proximité, d'une équipe médicale sur place, d'eau courante, d'électricité, etc. La plateforme a été installée dans le Centre de santé de base (CSB) II d'Andriba (figure 16). Deux pièces y ont été aménagées. L'une est dédiée à l'élevage des moustiques (insectarium) et aux infections expérimentales et l'autre est réservée à la parasitologie. Cette dernière sert aussi de pièce à vivre.

➤ **Lieux des prospections des porteurs de parasites : Andriba et Antanimbary**

La grande partie des dépistages actifs s'est déroulée à Andriba. Le but était de sélectionner les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* et les porteurs de *P. vivax*. Pour renforcer le nombre de porteurs en *P. vivax*, quelques dépistages ont été faits à Antanimbary. Les six établissements scolaires où nous avons fait les dépistages actifs sont : les écoles primaires publiques (EPP) de Maroharona, d'Anatihazo, de Tsarahonenana et d'Antanimbary, l'école primaire Nazareta et le collège Sainte-Thérèse. En période de vacances scolaires, nous avons fait des dépistages dans les « fokontany » à Ambohitromby, Miarinarivo et Antanimbary.

➤ **Lieux des collectes de moustiques : Andriba et Morafeno**

Les collectes de larves se sont faites uniquement à Andriba car il y avait présence de nombreux gîtes larvaires accessibles tels que les rizières. Il y avait aussi des parcs à zébus, lieux principaux où on peut capturer des adultes d'*An. coustani*, juste après leur repas de sang. Cependant, il n'y avait pas d'étables, lieux principaux de repos des adultes d'*An. funestus*, d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. mascarensis*. C'est en grande partie pour cette raison que les collectes de moustiques adultes se sont faites dans le village de Morafeno (18°24'13"S, 47°03'03"E). Morafeno est un site de captures facile et identifié de longue date par l'équipe de l'unité d'Entomologie médicale de l'IPM. Cependant, il est situé à environ deux heures quinze minutes de route d'Andriba dont quarante-cinq minutes de piste.



**Figure 16. Plateforme à Andriba.**

**A.** Centre de santé de base II d'Andriba. Il est constitué de trois principales pièces, une pièce multi-usage qui sert de pièce de vie et ou pour les examens parasitologiques, une pièce qui est le cabinet de consultation du médecin et une autre qui sert d'insectarium et pour les infections expérimentales. **B.** Étagères dédiées aux moustiques adultes. **C.** Étagères dédiées aux larves.

#### **IV.3.5. Entretien de l'insectarium**

##### **➤ Organisation**

Au moment de son implantation, l'insectarium de la plateforme était une grande pièce unique dont l'isolation des murs n'était pas suffisante pour éviter de grandes variations de température entre le jour et la nuit. L'installation d'humidificateurs d'air et de chauffages n'était pas envisageable du fait de l'instabilité et de la faible tension du courant électrique à Andriba. De ce fait, les moustiques adultes ont été exposés aux conditions naturelles (température, humidité, lumière). Les larves ne bénéficiaient pas par contre de la chaleur journalière de leurs gîtes naturels fortement exposés au soleil (Rizières, Flaques d'eau).

Quatre espèces ont été en élevage dans l'insectarium : *An. gambiae* s.l., *An. mascarensis*, *An. funestus* et *An. coustani*. Nous avons organisé des étagères pour éviter les risques de mélange des espèces et pour une bonne gestion des conditions de température et d'humidité. Les étagères dédiées au stade adulte ont été placées dans un coin de la salle à l'abri du vent et de la lumière (figure 16B). Alors que celles dédiées au stade larvaire ont été placées dans un coin éclairé par la lumière du jour (figure 16C).

#### ➤ Suivi de la température et de l'humidité

Ne pouvant pas disposer d'équipements spécifiques pour contrôler la température et l'humidité, des enregistrements journaliers de ces paramètres ont été réalisés à l'aide de thermo-hygromètres disposés à plusieurs points au sein de la salle. Pour contrôler au mieux l'humidité dans l'espace des moustiques adultes, les étagères qui leur sont dédiées ont été recouvertes sur les côtés par des tissus humides recouverts à leur tour par des films plastiques, faisant ainsi baisser la température et augmenter l'humidité (figure 16B). Les tissus ont été humidifiés plusieurs fois par jour, surtout en période de chaleur intense. Avec ces méthodes d'humidification, la température au niveau des étagères a pu être maintenue entre 25 et 28 °C et l'humidité entre 70 et 85 %.

### IV.3.6. Prévalence des infections palustres chez des enfants asymptomatiques

Au total 2748 enfants âgés de 4 à 17 ans (moyenne de 10 ans) et ne présentant à priori aucun symptôme palustre ont été dépistés au cours des saisons de transmission de 2016, 2017 et 2018. Le tableau 3 présente les prévalences des infections à *Plasmodium* en TDR et en microscopie, obtenues durant les trois années dans les communes rurales d'Andriba et d'Antanimbary. De manière globale, les taux de portage asymptomatique de *Plasmodium* étaient de  $14,7 \pm 1,4$  % en TDR et de  $12,3 \pm 2,2$  % en microscopie, avec une différence significative entre les deux méthodes ( $P = 0,009$ , test Chi2). En se basant sur la microscopie, 11, 8 % (324) de la population infantile asymptomatique était porteuse de *P. falciparum*, principale espèce plasmodiale détectée. Les taux de portage de *P. vivax* et de *P. malariae* étaient de 0,2 % (7) et de 0,2 % (6) respectivement ; avec un cas de co-infection *P. falciparum*/*P. malariae*. Aucun cas d'infection due à *P. ovale* n'a été détecté en microscopie. Selon les résultats obtenus en TDR, il n'y a pas eu de différence significative dans les

prévalences d'infection durant les trois années ( $P = 0,110$ , test Chi2), même en comparant les années deux par deux ( $P = 0,077$  pour 2016 et 2017 ;  $P = 0,850$  pour 2016 et 2017 ;  $P = 0,055$  pour 2016 et 2018). Cependant, ce n'était pas le cas pour les résultats obtenus en microscopie où une différence significative des prévalences d'infection a été observée entre 2016 et 2017 ( $P = 0,006$ ) et entre 2016 et 2018 ( $P = 0,001$ ), mais pas entre 2017 et 2018 ( $P = 0,477$ ) ; test Chi2. Il est à noter que dans une école (Tsarahonenana), le taux de porteurs asymptomatiques sur la base des TDR atteignait 39 % en 2018. Cette donnée n'a pas été incluse dans la moyenne car les données de microscopie étaient incomplètes. En prenant en compte le type d'école (privée ou publique), nous avons observé une différence dans la prévalence d'infection entre les deux groupes ( $P < 0,001$ , test Chi2). Parmi les six établissements scolaires où nous avons fait les dépistages actifs, deux sont des écoles privées (l'école primaire Nazareta et le collège Sainte-Thérèse) et les quatre autres des écoles publiques (les EPPs de Maroharona, d'Anatihazo, de Tsarahonenana et d'Antanimbary). Parmi les 2748 élèves dépistés durant les trois années d'étude, 763 provenaient des écoles privées et 1985 des écoles publiques. Les prévalences d'infection à *Plasmodium* durant les trois années étaient différentes selon le type d'école peu importe la méthode de diagnostic ( $P < 0,001$ ; test Chi2). Elles étaient de 8,8 % (67) et 17,0 % (337) en TDR, et de 6,8 % (52) et 14,2 % (282) en microscopie, respectivement pour les écoles privées et les écoles publiques. Les différences observées entre les deux groupes ont été enregistrées en 2017 et 2018 (pour chaque année,  $P = 0,001$  en TDR et  $P < 0,001$  en microscopie, test Chi2) mais pas en 2016 ( $P = 0,112$  en TDR et  $P = 0,465$  en microscopie). Les écoles privées sont.

La parasitémie moyenne durant les trois années, toutes espèces plasmodiales et stades confondus, était de 4119 parasites/ $\mu$ L, avec un minimum et un maximum de 16 et 400640 parasites/ $\mu$ L respectivement. Parmi les 2748 enfants dépistés, 5,8 % (160) étaient porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* et 0,3 % (7) porteurs de *P. vivax*. Ces résultats témoignent du faible taux de portage de *P. vivax* chez les individus asymptomatiques. C'est pour cela que, pour réaliser un grand nombre d'infections expérimentales à *P. vivax*, nous avons eu recours aux individus « malades » venus en consultation au CSB d'Andriba ou d'Antanimbary et chez qui le médecin a diagnostiqué une infection à *P. vivax* confirmée par TDR. Il est à noter que parmi les 2344 TDR négatifs, 26 (soit 0,9 % du total général) ont été confirmés positifs en microscopie : 20 cas dus à *P. falciparum*, 4 cas dus à *P. malariae* et 2 cas dus à *P. vivax*.

Résultats : chapitre 3

**Tableau 3** : Prévalences des infections à *Plasmodium* chez des enfants asymptomatiques durant les saisons de transmission du paludisme des années 2016, 2017 et 2018, à Andriba et Antanimbary.

Année	Nombre d'individus	TDR*		Microscopie*				Espèces plasmodiales
		Résultat TDR	Total	Gaméto (+) uniquement	Tropho (+) uniquement	Gaméto (+) et Tropho (+)	Total	
<b>2016</b>	<b>911</b>	C00	<b>796</b>	1	5	0	<b>6</b>	5 <i>Pf</i> ; 1 <i>Pm</i>
		C01	<b>81</b>	12	29	3	<b>44</b>	44 <i>Pf</i>
		C21	<b>31</b>	6	15	10	<b>31</b>	30 <i>Pf</i> ; 1 <i>Pf/Pm</i>
		C20	<b>3</b>	1	2	0	<b>3</b>	2 <i>Pf</i> , 1 <i>Pv</i>
		Total positifs	/	<b>115 (12,6 %)</b>	20	51	13	<b>84 (9,2 %)</b>
<b>2017</b>	<b>956</b>	C00	<b>807</b>	6	6	2	<b>14</b>	12 <i>Pf</i> ; 2 <i>Pv</i>
		C01	<b>106</b>	22	39	9	<b>70</b>	70 <i>Pf</i>
		C21	<b>39</b>	6	21	12	<b>39</b>	39 <i>Pf</i>
		C20	<b>4</b>	1	1	2	<b>4</b>	1 <i>Pf</i> ; 3 <i>Pv</i>
		Total positifs	/	<b>149 (15,6 %)</b>	35	67	25	<b>127 (13,3 %)</b>
<b>2018</b>	<b>881</b>	C00	<b>741</b>	6	0	0	<b>6</b>	3 <i>Pf</i> ; 3 <i>Pm</i>
		C01	<b>117</b>	22	48	29	<b>99</b>	99 <i>Pf</i>
		C21	<b>21</b>	2	8	10	<b>20</b>	20 <i>Pf</i>
		C20	<b>2</b>	1	1	0	<b>2</b>	2 <i>Pm</i>
		Total positifs	/	<b>140 (15,9 %)</b>	31	57	39	<b>127 (14,4 %)</b>
<b>Total général</b>	<b>2748</b>	C00	<b>2344</b>	13	11	2	<b>26</b>	20 <i>Pf</i> ; 2 <i>Pv</i> ; 4 <i>Pm</i>
		C01	<b>304</b>	56	116	41	<b>213</b>	213 <i>Pf</i>
		C21	<b>91</b>	14	44	32	<b>90</b>	89 <i>Pf</i> ; 1 <i>Pf/Pm</i>
		C20	<b>9</b>	3	4	2	<b>9</b>	3 <i>Pf</i> ; 4 <i>Pv</i> ; 2 <i>Pm</i>
		Total général	/	<b>404 (14,7 %)</b>	86	175	77	<b>338 (12,3 %)</b>

\*Sont présentés dans les colonnes TDR les résultats négatifs (C00) et positifs (C01, C21, C20). En microscopie ce sont uniquement les résultats positifs répartis en trois catégories (frottis présentant soit uniquement le stade gamétocyte, soit uniquement le stade trophozoïte, soit les deux stades). Gaméto : gamétocytes ; Tropho : trophozoïtes ; (+) : positif ; *Pf* : *P. falciparum* ; *Pv* : *P. vivax* ; *Pm* : *P. malariae* ; *Pf/Pm* : co-infection *P. falciparum/P. malariae*.

### IV.3.7. Infections expérimentales des anophèles sauvages et de colonie par *Plasmodium*

Les résultats des infections réalisées durant la saison de transmission de paludisme de 2016 n'étaient pas statistiquement exploitables car le nombre de moustiques infectés par expérience était très faible, ajoutés à cela des taux d'infection également très faibles. C'est pour cela que je ne vais présenter que les résultats des infections réalisées durant les saisons de 2017 et 2018. Les moustiques infectés en 2017, étaient des femelles F0 d'*An. arabiensis*. Ceux infectés en 2018 provenaient d'une colonie d'*An. arabiensis* (souche Morafeno) nouvellement établie par N. Puchot et M-T Lecoq (équipe C. Bourgouin, GFMI) à l'Institut Pasteur à Paris, à partir de pontes forcées obtenues en avril 2017. La colonie a été d'abord transférée à l'IPM en septembre 2017, puis dans la plateforme à Andriba en novembre 2017 ; les moustiques infectés étaient ceux des générations 13 à 20. Des femelles F1 de l'espèce *An. mascarensis*, provenant de capture de femelle gravides, ont également été infectées en 2018.

#### ✚ Taux d'infection

Au total, 25 infections expérimentales d'anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax* ont été réalisées durant les saisons de 2017 et 2018 avec au moins dix anophèles disséqués sept jours post-infection (j7PI), à l'exception de l'expérience n° 10 où seulement neuf moustiques ont été disséqués (tableau 4). Chez *An. arabiensis*, les taux d'infection n'étaient pas significativement différents ( $P = 0,723$ , test Chi2) selon qu'il s'agissait de *P. falciparum* (50,36 % ;  $n = 417$ ) ou de *P. vivax* (52,25 % ;  $n = 111$ ) (figure 17A). Cependant, nous avons observé une différence dans les taux d'infection entre *P. falciparum* et *P. vivax* selon qu'il s'agissait de moustiques sauvages (F0) ou de moustiques issus de la colonie. Pour les individus *An. arabiensis* F0 (figure 17B), les taux d'infection n'étaient pas significativement différents entre les deux espèces plasmodiales ( $P = 0,111$ , test Chi2) ; ils étaient de 49,65 % ( $n = 282$ ) et de 38,33 % ( $n = 60$ ) respectivement pour *P. falciparum* et *P. vivax*. Par contre, pour les femelles issues de la colonie *An. arabiensis* (figure 17C), nous avons observé une différence significative entre les deux espèces plasmodiales ( $P = 0,040$ , test Chi2), les taux d'infection étant de 51,85 % ( $n = 135$ ) et de 68,63 ( $n = 51$ ) % respectivement pour *P. falciparum* et *P. vivax*.

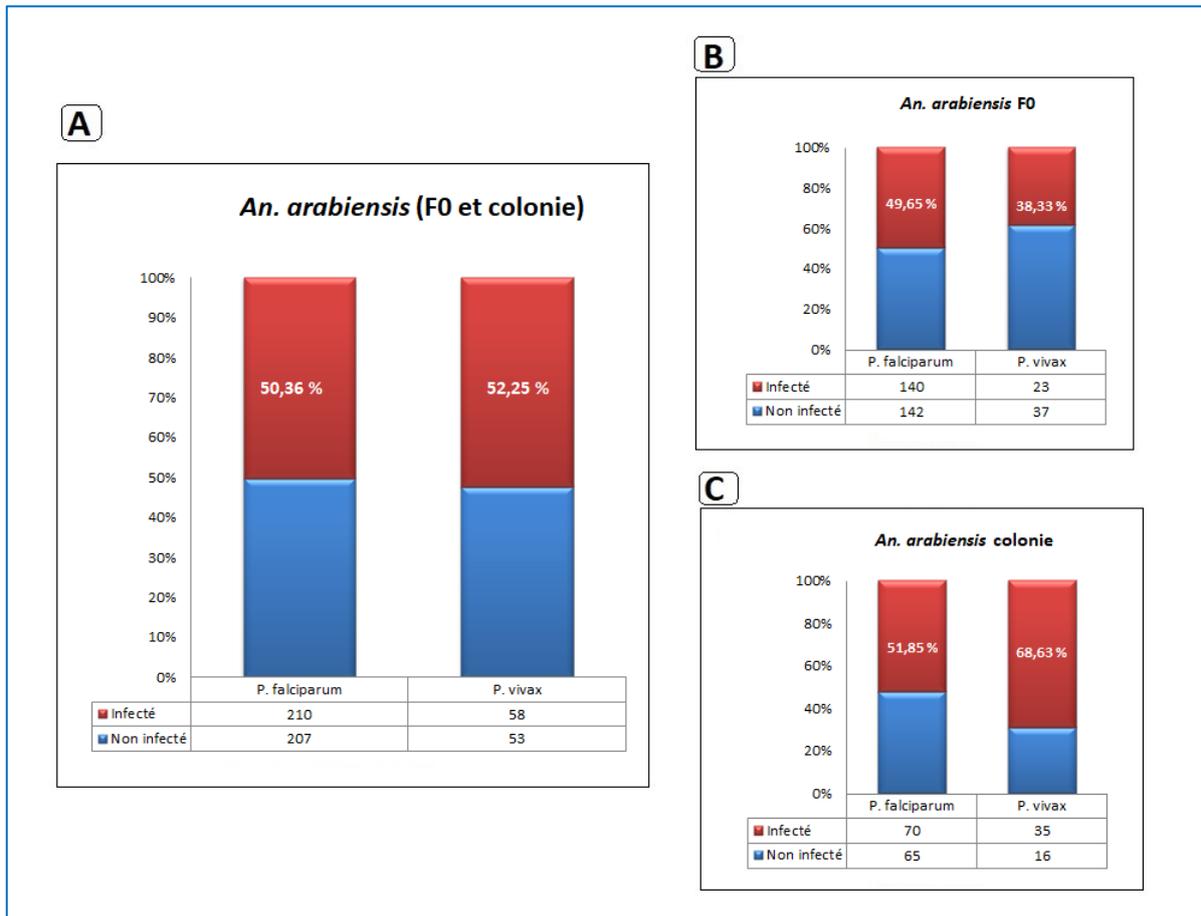
Résultats : chapitre 3

Tableau 4 : Bilan des infections expérimentales d'*An. arabiensis* et d'*An. mascarensis* par *P. falciparum* et *P. vivax*

Exp.	Année	Espèce d'anophèle	Espèce plasmodiale	Parasitémie le jour de l'infection	Nbre disséqué	Nbre infecté	Taux d'infection	Densité Oocy. moy.	Nbre oocyste [min ; max]
n° 1	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	25g / 0t / 505GB	12	7	58,33 %	4,60	[1 ; 13]
n° 2	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	2g/777t/503GB	18	0	0 %	-	-
n° 3	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	19g / 0t / 507GB	58	44	75,86 %	14,30	[1 ; 36]
n° 4	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	17g / 0t / 502GB	60	37	61,67 %	5,60	[1 ; 25]
n° 5	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	89g / 35t / 509GB	34	26	76,47 %	89,20	[3 ; 200[
n° 6	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	7g / 0t / 502GB	28	6	21,43 %	3,80	[1 ; 9]
n° 7	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	120g / 0t / 503GB	35	14	40,00 %	36,80	[2 ; 99]
n° 8	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	6g / 1320t / 503GB	22	6	27,27 %	3,00	[1 ; 6]
n° 9	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	20g/5t/502GB	15	0	0 %	-	-
n° 10	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	0g / 103t / 108GB	9*	4	44,44 %	57,00	[36 ; 78]
n° 11	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	20g / 801t / 507GB	18	7	38,89 %	10,00	[1 ; 18]
n° 12	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	12g / 10t / 512GB	16	3	18,75 %	0,30	[1 ; 2]
n° 13	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	13g / 140t / 501GB	17	9	52,94 %	8,20	[2 ; 32]
n° 14	2017	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	10gPv+7gPf / 0t / 500GB	20	2	10,00 %	1,00	1
n° 15a	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	27g / 6t / 228GB	32	16	50,00 %	7,10	[1 ; 21]
n° 16	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	11g / 07t / 504GB	31	21	67,74 %	46,71	[1 ; 201]
n° 17	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	120g / 0t / 505GB	17	4	23,53 %	1,75	[1 ; 3]
n° 18	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	7g / 0t / 508GB	14	3	21,43 %	1,33	[1 ; 2]
n° 19	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	8g / 820t / 508GB	12	6	50,00 %	24,66	[4 ; 50]
n° 20	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	7g / 64t / 510GB	29	26	89,66 %	22,38	[1 ; 63]
n° 21	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. vivax</i>	5g / 82t / 501GB	10	3	30,00 %	0,30	[1 ; 3]
n° 22	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	101g / 12t / 500GB	21	13	61,99 %	31,05	[1 ; 110]
n° 23a	2018	<i>An. arabiensis</i>	<i>P. falciparum</i>	30g / 0t / 501GB	20	13	65,00 %	3,76	[1 ; 13]
n° 15b	2018	<i>An. mascarensis</i>	<i>P. falciparum</i>	27g / 6t / 228GB	15	7	46,67 %	7,60	[1 ; 26]
n° 23b	2018	<i>An. mascarensis</i>	<i>P. falciparum</i>	30g / 0t / 501GB	13	5	38,46 %	5,80	[1 ; 13]

Exp. : expérience ; Nbre : nombre ; g = nombre de gamétocytes ; t = nombre de trophozoïtes ; GB = globules blancs ; Pv = *P. falciparum* ; Pp = *P. vivax* ; Oocy. moy. : oocystique moyenne. \*Exception (les infections validées sont celles où on a eu au moins 10 moustiques disséqués).

Les expériences 15 et 23 ont été faites parallèlement avec les deux espèces d'anophèles à partir du sang d'un même porteur.



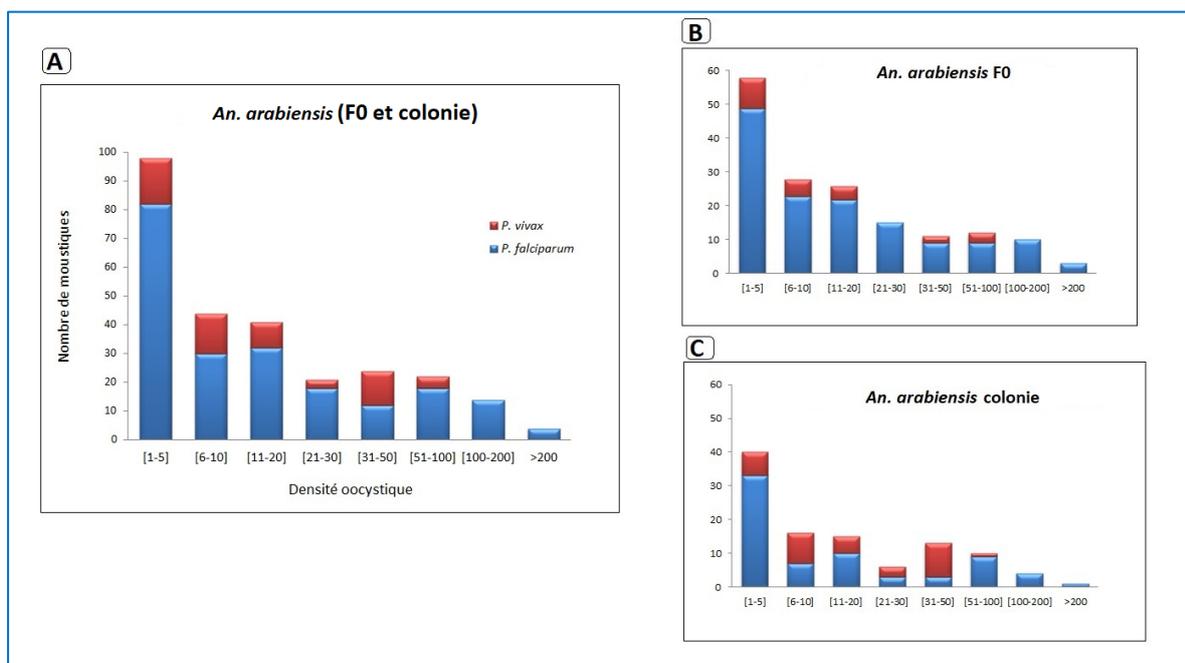
**Figure 17. Taux d'infection d'*An. arabiensis* par *P. falciparum* et *P. vivax* des expériences réalisées durant les saisons 2017 et 2018.**

**A.** Bilan issu de tous les *An. arabiensis* infectés par *P. falciparum* (n = 417) et par *P. vivax* (n = 111) au cours des expériences réalisées durant les saisons de transmission de 2017 et 2018. **B.** Concernant l'année 2017 (*An. arabiensis* F0 ; n = 282 pour *P. falciparum* et n = 60 pour *P. vivax*). **C.** Concernant l'année 2018 (*An. arabiensis* colonie ; n = 135 pour *P. falciparum* et n = 51 pour *P. vivax*).

Les résultats de l'expérience n° 14 où *An. arabiensis* a été infecté à partir du sang de porteur co-infecté *P. falciparum*/*P. vivax*, ont montré un taux d'infection faible (10%) alors que le sang « infectant » contenait une quantité de gamétocytes satisfaisante, tant de *P. falciparum* que de *P. vivax*. Soit la charge en gamétocytes « infectants » était de fait trop faible, soit cela pourrait traduire une compétition entre les deux espèces de parasites comme le suggère les travaux de Ramasamay M. et collaborateurs au Sri Lanka (Ramasamy M. *et al.*, 1997).

### ✚ Densité oocystique moyenne

Au total, 25 infections expérimentales Au total 528 femelles d'*An. arabiensis* ont été disséquées à j7PI, durant les saisons de transmission du paludisme de 2017 et 2018, dont 417 infectées par *P. falciparum* (282 F0 et 135 de colonie) et 111 infectées par *P. vivax* (60 F0 et 51 de colonie). Parmi les 528 femelles disséquées, 268 présentaient au moins un oocyste dans leur estomac. De manière globale, la densité oocystique moyenne était de 14,27 [1 ; 201] (IC 95 % : 10,86-17,68) pour *P. falciparum* et de 10,01 [1 ; 78] (IC 95 % : 6,85-37,18) pour *P. vivax*, avec près de 37 % (98/268) de moustiques présentant 1 à 5 oocystes. La distribution des densités oocystiques est présentée dans la figure 18.



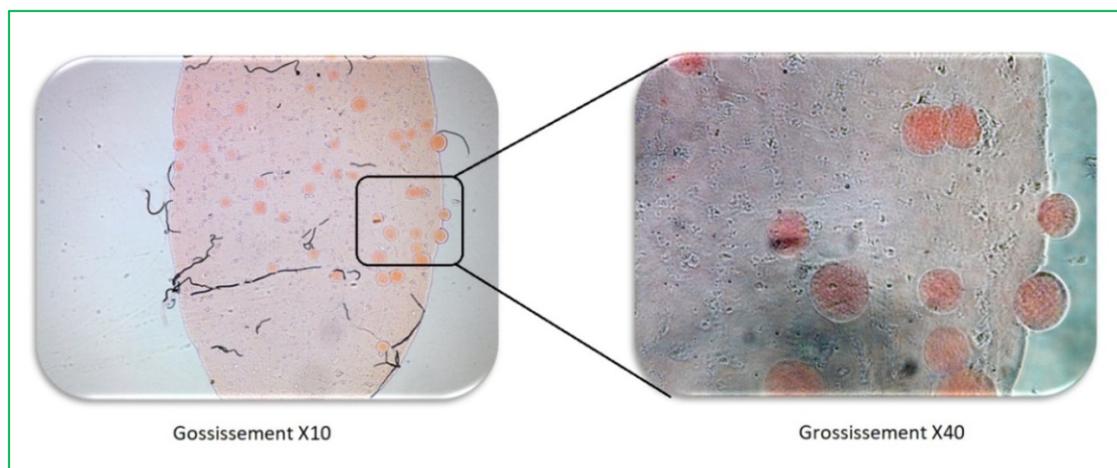
**Figure 18. Densité oocystique de *P. falciparum* et de *P. vivax* chez *An. arabiensis*.**

**A.** Bilan issu de tous les *An. arabiensis* infectés par *P. falciparum* (n = 210) et par *P. vivax* (n = 58) au cours des expériences réalisées durant les saisons de transmission de 2017 et 2018. **B.** Concernant l'année 2017 (*An. arabiensis* F0 ; n = 140 pour *P. falciparum* et n = 23 pour *P. vivax*). **C.** Concernant l'année 2018 (*An. arabiensis* de colonie ; n = 70 pour *P. falciparum* et n = 35 pour *P. vivax*).

Globalement, nous avons observé une différence significative de la densité oocystique moyenne entre *P. falciparum* et *P. vivax* ( $P = 0,036$ , test t). En regardant de plus près la densité oocystique selon la souche d'anophèle, nous avons observé une différence significative entre les densités oocystiques moyennes de *P. falciparum* et de *P. vivax* chez les

F0 *An. arabiensis* F0 ( $P = 0,002$ ) mais pas chez *An. arabiensis* de colonie ( $P = 0,314$ ). En effet, la densité oocystique moyenne chez les F0 *An. arabiensis* était de de 15,03 [1 ; 200] (IC 95 % : 10,61-19,44) pour *P. falciparum* et de 6,26 [1 ; 68] (IC 95 % : 2,23-10,21) pour *P. vivax*. Chez *An. arabiensis* de colonie, elle était de 12,68 (IC 95 % : 7,52-17,85) pour *P. falciparum* et de 14,43 (IC 95 % : 9,46-19,39) pour *P. vivax*.

Ces résultats révèlent donc une différence de compétence pour les individus F0 « sauvages » vis à vis de *P. falciparum* et de *P. vivax*, alors que les individus issus d'une colonie, montrent une compétence similaire pour les deux espèces plasmodiales. De manière surprenante cette différence de compétence est inverse de celle observée au niveau des prévalences d'infection. La figure 19 illustre un estomac d'*An. arabiensis* présentant des oocystes de *P. vivax*.



**Figure 19. Estomac d'*An. arabiensis* présentant des oocystes de *P. vivax* sept jours post-infection.**

Infection expérimentale réalisée dans la plateforme à Andriba. Photo prise quatre semaines après fixation des tubes digestifs infectés. (C. Bourgouin et N. Puchot).

Le tableau 5 présente un récapitulatif de la parasitémie des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* (gamétocytémie) et des porteurs de *P. vivax* (stades trophozoïtes et gamétocytes), dont le sang a été utilisé pour infecter *An. arabiensis* durant les saisons de 2017 et 2018, avec les densités oocystiques moyennes correspondantes. Le test statistique de Spearman montre qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le nombre d'oocystes et la parasitémie, aussi bien avec *P. falciparum* ( $\rho = 0,477$ ,  $P = 0,071$  ;  $n = 15$ ) que *P. vivax* ( $\rho = 0,612$ ,  $P = 0,143$  ;  $n = 7$ ). Ce résultat corrobore les observations faites par d'autres équipes (Balabaskaran Nina *et al.*, 2017).

**Tableau 5** : Parasitémie du porteur et densité oocystique moyenne des infections d'*An. arabiensis* par *P. falciparum* et *P. vivax*, durant les saisons 2017 et 2018.

Exp.	Espèce plasmodiale	Porteur	Taux d'infection	Densité oocystique moyenne	<sup>(1)</sup> Gamétocytémie	<sup>(2)</sup> Parasitémie totale
n° 1	<i>P. falciparum</i>	25g / 0t / 505GB	58,33 %	4,60	396,04	396,04
n° 2	<i>P. falciparum</i>	2g/777t/503GB	0,00 %	0,00	31,81	12389,66
n° 3	<i>P. falciparum</i>	19g / 0t / 507GB	75,86 %	14,30	299,80	299,80
n° 4	<i>P. falciparum</i>	17g / 0t / 502GB	61,67 %	5,60	270,92	270,92
n° 5	<i>P. falciparum</i>	89g / 35t / 509GB	76,47 %	89,20	1398,82	1948,92
n° 6	<i>P. falciparum</i>	7g / 0t / 502GB	21,43 %	3,80	111,55	111,55
n° 7	<i>P. falciparum</i>	120g / 0t / 503GB	40,00 %	36,80	1908,55	1908,55
n° 8	<i>P. falciparum</i>	6g / 1320t / 503GB	27,27 %	3,00	95,43	21089,46
n° 9	<i>P. falciparum</i>	20g/5t/502GB	0,00 %	0,00	318,73	398,41
n° 10	<i>P. vivax</i>	0g / 103t / 108GB	44,44 %	57,00	0,00	7629,63
n° 11	<i>P. vivax</i>	20g / 801t / 507GB	38,89 %	10,00	315,58	12954,64
n° 12	<i>P. vivax</i>	12g / 10t / 512GB	18,75 %	0,30	187,50	343,75
n° 13	<i>P. vivax</i>	13g / 140t / 501GB	52,94 %	8,20	191,62	2443,11
n° 15a	<i>P. falciparum</i>	27g / 6t / 228GB	50,00 %	7,10	947,37	1157,89
n° 16	<i>P. falciparum</i>	11g / 07t / 504GB	67,74 %	46,71	174,60	285,71
n° 17	<i>P. falciparum</i>	120g / 0t / 505GB	23,53 %	1,75	1900,99	1900,99
n° 18	<i>P. falciparum</i>	7g / 0t / 508GB	21,43 %	1,33	110,24	110,24
n° 19	<i>P. vivax</i>	8g / t 820 / 508GB	50,00 %	24,66	125,98	13039,37
n° 20	<i>P. vivax</i>	7g / 64t / 510GB	89,66 %	22,38	109,80	1113,73
n° 21	<i>P. vivax</i>	5g / 82t / 501GB	30,00 %	0,30	79,84	1389,22
n° 22	<i>P. falciparum</i>	101g / 12t / 500GB	61,90 %	31,05	1616,00	1808,00
n° 23a	<i>P. falciparum</i>	30g / 0t / 501GB	65,00 %	3,76	479,04	479,04

Exp. : expérience ; Nbre : nombre ; g = nombre de gamétocytes ; t = nombre de trophozoïtes ; GB = globules blancs ; *Pv* = *P. falciparum* ; *Pv* = *P. vivax*.

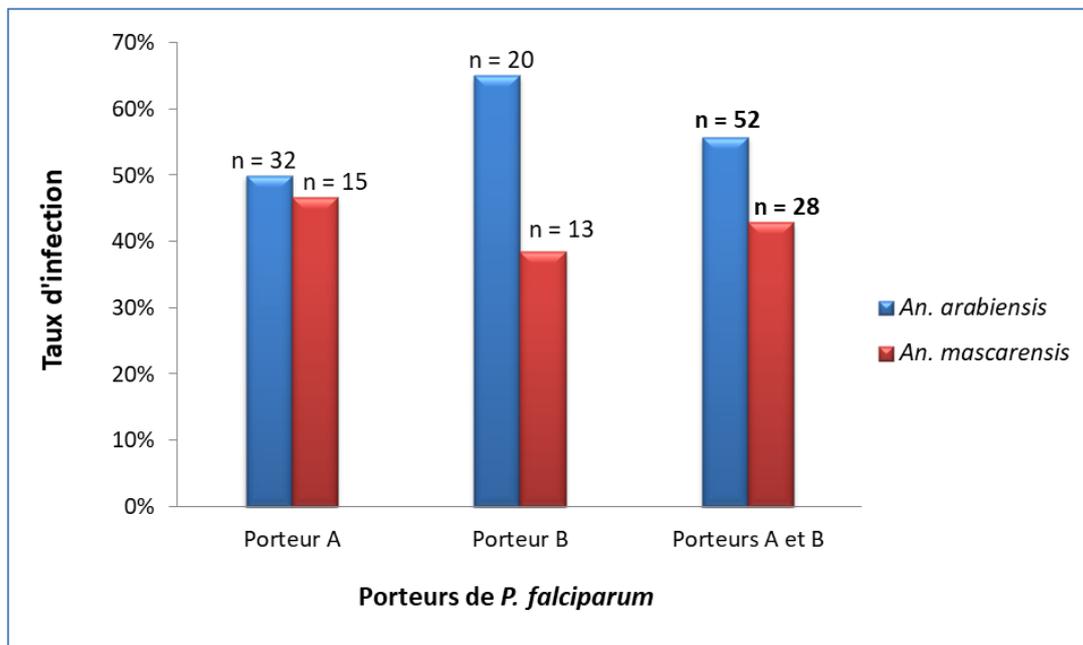
<sup>(1)</sup>Inclus seulement les gamétocytes. Le calcul s'est fait suivant la formule suivante : (nombre de gamétocytes x 8000) / nombre de globules blancs lus ; valeur exprimée en gamétocytes/μL de sang.

<sup>(2)</sup>Inclus les trophozoïtes et les gamétocytes. Le calcul est fait suivant la formule suivante : ((nombre de gamétocytes + nombre de trophozoïtes) x 8000) / nombre de globules blancs lus ; valeur exprimée en parasites par microlitre de sang.

Dans les deux cas, 8000 représente le nombre de globules rouges par μL de sang, valeur moyenne chez des individus d'origine africaine.

✚ **Susceptibilité à *P. falciparum* : *An. arabiensis* versus *An. mascarensis***

Au total, 25 infections expérimentales Pour comparer la susceptibilité des espèces d'anophèles à *Plasmodium*, nous avons réalisé en parallèle des infections d'*An. arabiensis* et d'*An. mascarensis* par *P. falciparum* à partir du sang d'un même porteur. Deux infections ont été réalisées avec succès, une avec le sang d'un porteur nommé A (27g/6t/228GB) et une autre avec le sang d'un porteur nommé B (30g/0 t/501GB) (figure 20). Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative des taux d'infection entre les deux espèces d'anophèles infectées par *P. falciparum* ( $P = 0,350$ , test exact de Fisher), que ce soit à partir du sang du porteur A ( $P = 1,000$  ; test exact de Fisher) ou du sang du porteur B ( $P = 0,169$  ; test exact de Fisher).



**Figure 20. Taux d'infection d'*An. arabiensis* et d'*An. mascarensis* par deux porteurs différents de *P. falciparum* de la saison 2018.**

Parasitémies : porteur A = 27g/6t/228GB, porteur B = 30g/0 t/501GB.

g = nombre de gamétocytes ; t = nombre de trophozoïtes ; GB = globules blancs.

#### **IV.3.8. Discussion**

##### **Une première dans le pays, la plateforme pour les infections expérimentales des anophèles par *Plasmodium* permettra de mieux étudier la compétence vectorielle des anophèles malgaches à Madagascar**

L'objectif principal de la mise en place de cette plateforme expérimentale est d'étudier la compétence vectorielle des anophèles vecteurs de paludisme à Madagascar. Ceci afin d'apporter des connaissances nouvelles pour la LAV à Madagascar, données qui compléteront les suivis entomologiques qui sont régulièrement faits dans le pays. Pour la première fois à Madagascar, nous avons montré la faisabilité et réalisé avec succès des infections expérimentales des anophèles sauvages et de colonie par *P. falciparum* et *P. vivax*. Il est à rapporter néanmoins qu'en 1964, Chauvet et collaborateurs ont réalisé une infection expérimentale d'*An. gambiae* A (actuel *An. gambiae*) et *An. gambiae* B (actuel *An. arabiensis*) afin de tester leur réceptivité respective vis à vis de *P. falciparum* (in Zahar et al., 1985). C'est à notre connaissance la seule notification d'infection expérimentale jamais réalisée à Madagascar. L'installation de la plateforme d'Andriba a permis d'étudier les niveaux de portage asymptomatique de *Plasmodium* chez des enfants en milieu scolaire de 2016 à 2018. Elle a aussi permis d'initier un projet d'analyse transcriptomique des interactions *An. gambiae*-*P. vivax*, projet mené par le Dr Tchioffo-Tsapi sous la direction du Dr C. Bourgoïn. A long terme, cette plateforme expérimentale permettra l'analyse de la compétence des espèces et populations d'anophèles vecteurs de Madagascar. De telles études sont importantes pour contribuer au développement de stratégies alternatives pour interrompre la transmission du paludisme. Dans le reste de cette partie, je vais discuter des résultats obtenus au cours de cette étude.

##### **L'utilisation combinée de la microscopie et du TDR pour la sélection des porteurs de *Plasmodium* est à encourager**

La microscopie et le TDR sont deux méthodes recommandées par l'OMS pour le diagnostic du paludisme (WHO, 2018b), car elles permettent une prise en charge rapide du sujet infecté. Cependant, dans le cadre de notre étude et comme dans la plupart des travaux du même genre, la microscopie est la méthode de choix pour la sélection des porteurs de

gamétocytes de *Plasmodium* parce qu'elle est plus spécifique que le TDR, elle permet de connaître le stade parasitaire et son matériel (microscope) est facilement transportable sur le terrain. Parmi les 2344 TDR négatifs, 20 ont été confirmés positifs en microscopie. Initialement, nous avons utilisé le TDR pour être en conformité avec la politique nationale de Madagascar (Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016). Néanmoins, il s'est avéré être une méthode de diagnostic mettant en confiance le patient, point très important pour notre étude. En effet, les résultats TDR sont obtenus après quelques minutes, ils sont faciles d'interprétation et donc il est plus aisé d'expliquer au patient son résultat d'examen avec preuve à l'appui. De plus, les résultats TDR positifs peuvent, dans une certaine mesure, cibler les frottis sanguins à lire en premier. De façon non surprenante, les résultats de prévalence étaient différents selon la méthode utilisée, le TDR détectant des antigènes parasitaires circulants traduisant soit une infection passée mais récente soit le démarrage d'une infection sans parasite détectable en microscopie. Les avantages et inconvénients de chacune des deux techniques sont connus, y compris celle de la PCR, méthode la plus sensible et spécifique des trois (Mogeni *et al.*, 2017 ; Dinko *et al.*, 2016 ; Doctor *et al.*, 2016 ; Gatti *et al.*, 2007 ; Gaye *et al.*, 1998). Des échantillons de sang ont été systématiquement collectés sur papier buvard pour des analyses ultérieures par PCR, non réalisables sur le terrain. Nous n'avons pas observé de différence dans la prévalence des infections estimées en TDR durant les trois années, même en comparant les années deux par deux. Ce qui n'était pas le cas pour les résultats obtenus en microscopie avec une différence significative entre 2016 et les années 2017 et 2018. L'expérience confirmée des parasitologistes sur le terrain ne pouvant être mise en cause, cette différence pourrait être due à l'effet « personne ». En effet, au début de notre étude en 2016 où nous ne disposions pas d'une équipe constante, les frottis sanguins lus par un parasitologiste n'étaient pas relus par un autre. Or, durant les années 2017 et 2018, nous disposions d'une équipe constante sur le terrain et les frottis sanguins douteux étaient systématiquement relus par une tierce personne. Bien que cela rajoute une tâche en plus, il est important de combiner les deux méthodes pour la sélection des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium*, surtout pour le cas d'une étude comme la nôtre et qui est menée dans un contexte social particulier où la relation avec l'individu est « délicate ». Recommandation d'autant plus dans le cas où l'étude perdurerait dans le temps.

### **Le portage asymptomatique de *P. falciparum* est élevé dans la zone d'étude**

Notre site d'étude, constitué par les communes d'Andriba et d'Antanimbary, appartient à l'écozone du Nord-Ouest. Les résultats de microscopie ont montré que 11,8 % de la population infantile asymptomatique était porteuse de *P. falciparum* dont 5,8 % étaient des porteurs de gamétocytes. Les taux d'infection à *P. vivax* et à *P. malariae* étaient très faibles et représentaient chacun 0,2 % des cas d'infection. Aucun cas d'infection par *P. ovale* n'a été décelé. Des travaux antérieurs ont montré que la détection d'infections asymptomatiques par la microscopie optique conventionnelle est limitée (Harris *et al.*, 2010). Particulièrement les cas d'infection à *P. vivax* où la prévalence apparemment plus faible dans les zones endémiques pourrait être due en partie à la forte préférence de *P. vivax* pour les réticulocytes (Mueller *et al.*, 2009). De plus à Madagascar, la forte prévalence des infections à *P. vivax* a été observée chez des cas cliniques, principalement dans le district de Tsiroanomandidy situé dans l'écozone de la marge Ouest des Hautes terres (Menard *et al.*, 2013 ; 2010) et où la prévalence des infections à *P. falciparum* se situe plutôt entre 3 et 5 % (Howes *et al.*, 2016b). En comparant nos données à celles des travaux récemment publiés (Kang *et al.*, 2018 ; Howes *et al.*, 2016b), il en ressort que le portage asymptomatique des infections à *P. falciparum* est relativement élevé dans notre zone d'étude, que ce soit en microscopie ou en TDR. Résultats d'autant plus intéressants car les travaux antérieurs avec lesquels ils ont été comparés se sont basés sur des cas cliniques. Les prévalences d'infection due à *P. falciparum* que nous avons observées par microscopie rentrent dans la fourchette des prévalences de l'écozone du Nord-Ouest (Kang *et al.*, 2018). En effet, Kang et collaborateurs ont établi une cartographie de Madagascar en se basant sur la prévalence de paludisme à *P. falciparum*, déterminée par microscopie, à partir d'échantillons collectés entre de 2011 et 2016, la plupart durant la saison de transmission du paludisme et chez des enfants âgés de moins de cinq ans (6 à 59 mois). Ils ont noté une augmentation de la prévalence des infections à *P. falciparum* au cours des années, allant de 10 à 30 %, particulièrement au niveau de l'écozone du Nord-Ouest où se trouve notre site d'étude. La prévalence des infections à *P. falciparum* déterminée par TDR (résultats C01 et C21) durant les trois années d'étude était de 14,4 %, ce qui est supérieur à la prévalence des infections à *P. falciparum* qui ont permis à Howes et collaborateurs de caractériser l'écozone du Nord-Ouest (Howes *et al.*, 2016b) avec des prévalences variant de 3 à 12 % sur la base des TDR.

### **La prévalence du paludisme est négativement corrélée avec le niveau socio-économique**

Nous avons observé une différence des prévalences des infections palustres entre écoles privées et écoles publiques. Elles étaient de 8,8 % et 17,0 % en TDR, et de 6,8 % et 14,2 % en microscopie, respectivement pour les écoles privées et les écoles publiques. Cette différence pourrait s'expliquer par des différences socio-économiques des familles des enfants des deux types d'écoles. En effet, d'après l'INSTAT (Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016), le statut socio-économique influence sur le mode d'approvisionnement en moustiquaires, les populations ayant des revenus plus élevés s'en procurent beaucoup plus dans les boutiques et marchés de la place et disposent d'autres moyens de prévention comme les répulsifs cutanés et les diffuseurs. Il est à noter que la dernière distribution nationale des MID à Madagascar remonte à 2015, peu de temps avant le début de notre étude. Et ce n'est qu'en 2018 (entre août et septembre) qu'aura lieu la prochaine campagne de distribution des MID (Razafimbelo, 2018). Cependant, de nombreux foyers de notre zone d'étude ont admis n'avoir pas reçu de moustiquaire. Ceux qui pouvaient financièrement s'en procurer durant cette période, le faisaient sur les marchés. Autre fait à noter est l'environnement des habitations qui pourraient influencer l'abondance des vecteurs autour des foyers. Plus le niveau socio-économique est élevé, moins il y a de gîtes larvaires autour des maisons, et donc moins de moustiques dont les vecteurs de paludisme.

### **La susceptibilité d'*An. arabiensis* à *P. falciparum* et à *P. vivax* varie selon qu'il s'agit d'une souche sauvage ou de colonie, ainsi que selon l'espèce plasmodiale**

Durant les saisons de transmission du paludisme (janvier à avril) de 2017 et 2018, nous avons infecté *An. arabiensis* par *P. falciparum* (15 expériences) et par *P. vivax* (7 expériences). Neuf infections *P. falciparum* et 4 infections *P. vivax* ont été réalisées avec des individus F0 tandis que 6 infections *P. falciparum* et 3 infections *P. vivax* ont été réalisées avec des individus de la colonie établie en 2017. Les prévalences d'infection des femelles F0 n'étaient pas significativement différents entre les deux espèces plasmodiales, 49,65 % pour *P. falciparum* et 38,33 % pour *P. vivax*. Ces résultats corroborent ceux des travaux publiés précédemment. En effet, les taux d'infection d'*An. arabiensis* F0 par *P. falciparum* sont similaires à ceux d'autres études réalisées au Sénégal (Ndiath *et al.*, 2011) et au Burkina Faso (Nguyen *et al.*, 2017), où les prévalences d'infection étaient de 55,38 % et de 54,36 %.

Pareillement, les taux d'infection d'*An. arabiensis* F0 par *P. vivax* sont similaires à ceux d'une étude réalisée en Ethiopie et où les taux d'infection étaient de 31,72 % (Abduselam *et al.*, 2016). Par contre, les moustiques de la colonie s'avèrent plus réceptifs à *P. vivax* que les individus F0 avec un taux moyen de prévalence d'infection de 63,63 % contre 38,33 % pour les F0 et une augmentation nette des charges en oocystes. De manière surprenante, alors qu'il n'y a pas de différence de prévalence d'infection à *P. falciparum* entre F0 et moustiques de colonie, la charge oocystique des moustiques de colonie infectés par *P. falciparum* est plus faible que celle des individus F0. Ces données sont à rapprocher des données récemment publiées sur *An. stephensi* et *P. vivax*, montrant une situation inverse : prévalence significativement plus élevée des moustiques sauvages par rapport à des moustique de colonie, également récemment établie (66-86 générations) et charge oocystique similaire (Mohanty *et al.*, 2018). Il existe donc clairement des bases génétiques à ces différences qu'il serait intéressant d'approfondir.

Les données des infections réalisées en 2016 n'étaient pas exploitables statistiquement car le nombre de moustiques disséqués à j7PI était très faible. Durant les saisons 2017 et 2018, nous avons d'une part, amélioré considérablement la production de moustiques sur le terrain et d'autre part, nous avons systématiquement remplacé le sérum du patient par un sérum de personnes n'ayant pas séjourné en zone d'endémie palustre. Au regard des données de faible taux d'infection de 2016, ceci suggère la présence d'une immunité bloquant la transmission et qui est en rapport avec la densité des gamétocytes (Boudin *et al.*, 2005). En effet, les réponses des anticorps de l'hôte aux protéines gamétocytaires comme la Pfs48/45 et la Pfs230, sont associées à une réduction de l'efficacité de la transmission du paludisme de l'homme aux moustiques (Stone *et al.*, 2018). Ceci se reflète mieux dans des zones à forte transmission palustre où, les populations plus âgées ont des niveaux de réponses immunes plus élevés et des densités gamétocytaires plus faibles (Coalson *et al.*, 2016 ; Bousema et Drakeley, 2011; Drakeley, Bousema *et al.*, 2006; Drakeley, Sutherland *et al.*, 2006). Raison pour laquelle les dépistages actifs pour la sélection des porteurs de gamétocytes se fait chez des enfants.

#### IV.3.9. Conclusion

La mise en place de la première plateforme pour les infections expérimentales des anophèles malagaches par *P. falciparum* et *P. vivax* dans la commune rurale d'Andriba à Madagascar, a été réalisée avec succès. Hormis mon projet de thèse qui tire déjà à sa fin, la plateforme a permis d'initier d'autres projets de recherche plus fondamentaux, telle que l'analyse du transcriptome d'*An. arabiensis* infecté par *P. falciparum* et *P. vivax*. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont montré l'importance de l'utilisation de la microscopie et du TDR pour sélectionner les porteurs de *Plasmodium*. Ils ont aussi montré que le taux de portage asymptomatique de *P. falciparum* était élevé pendant la saison de transmission du paludisme et inversement corrélé au niveau socio-économique. Nos résultats montrent clairement que les femelles sauvages d'*An. arabiensis* sont compétentes à transmettre aussi bien *P. falciparum* que *P. vivax*. Ce résultat est confirmé par l'étude épidémiologique que nous avons menée dans la commune d'Andriba (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018c) et qui fait l'objet du chapitre 2 de cette thèse. De façon très intéressante, les résultats des infections expérimentales ont montré que la susceptibilité d'*An. arabiensis* à *P. falciparum* et à *P. vivax* varie selon qu'il s'agit d'une souche sauvage ou de colonie. L'autre résultat important est la démonstration expérimentale de la compétence vectorielle d'*An. mascarensis* F1 pour *P. falciparum*, et cette compétence est similaire à celle d'*An. arabiensis*. En perspective et en rapport avec nos objectifs initiaux, la plateforme d'Andriba permettra d'analyser la compétence vectorielle des espèces vectrices de paludisme à Madagascar. Le challenge restera la production en nombre suffisant de moustiques pour les espèces qui se colonisent difficilement comme *An. mascarensis* et *An. coustani*.

## V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

---

Le but de ma thèse était d'étudier la contribution des anophèles à la transmission de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* à Madagascar. Pour y parvenir, nous avons établi trois objectifs principaux, à savoir : approfondir les connaissances sur *An. mascarensis* à travers une revue de la littérature ; estimer la contribution des vecteurs à la transmission de *Plasmodium* dans deux villages voisins dans la commune rurale d'Andriba ; et étudier la compétence vectorielle des anophèles malgaches à transmettre *P. falciparum* et *P. vivax*. La réalisation du troisième objectif n'a pu être initiée qu'après la mise en place d'une plateforme à Madagascar pour les infections expérimentales des anophèles par *Plasmodium*, point de départ de mes travaux de thèse.

### **Première plateforme pour les infections expérimentales des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax* à Madagascar**

La mise en place de la plateforme pour les infections expérimentales des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax*, dans la commune rurale d'Andriba à Madagascar, a nécessité d'établir un plan d'action en accord avec les procédures administratives locales. Bien que cela puisse paraître « inutile » et lourd comme procédure, il était indispensable d'obtenir les autorisations des autorités locales, allant de l'échelle du village (via le chef de « fokontany ») à l'échelle nationale (via le ministère de la Santé publique de Madagascar), afin de mettre sur pied ce projet. A présent, nous disposons des techniques et d'un timing permettant de maintenir son fonctionnement, allant de la production des moustiques F1 à la réalisation des infections expérimentales sur site, en passant par la sélection des porteurs de *Plasmodium*. Grâce à cette plateforme, nous avons étudié la susceptibilité des moustiques sauvages et issus d'une colonie d'*An. arabiensis* à *P. falciparum* et à *P. vivax*, ainsi que celle d'*An. mascarensis* à *P. falciparum*. Cette réalisation a permis un transfert de savoir-faire aux équipes locales de l'IPM qui sont à présent aptes à assurer le fonctionnement et la continuité de la plateforme. Cette dernière a aussi permis d'étudier les niveaux de portage asymptomatique de *Plasmodium* chez des enfants durant les saisons de transmission du paludisme de 2016, 2017 et 2018, ainsi que d'initier un projet d'analyse transcriptomique des interactions *An. gambiae*-*P. vivax*.

Cependant, quelques difficultés, de logistique surtout, ont été rencontrées, dont : les allers-retours hebdomadaires entre Andriba et Antananarivo (très fatigants à cause du trajet sinueux, surtout pour des personnes qui supportent mal les longs trajets en voiture) ; le fonctionnement sous groupe électrogène pendant près de deux mois en 2016 (congélateur/réfrigérateur hors-service, bruits rendant nerveux) ; l'absence d'intimité due au fait que nous partagions tous une même pièce (hommes comme femmes). Je tiens à préciser que cela n'est pas une plainte – au contraire, c'était une très belle aventure ! Pour améliorer les conditions de vie sur site, il serait bien d'installer des locaux « définitifs » où les membres d'équipe pourront y loger en toute intimité. Je pense aussi que cela réduirait la fréquence des allers-retours Andriba-Antananarivo.

Pouvoir à présent réaliser des infections expérimentales des anophèles par *Plasmodium* à Madagascar, ouvre d'autres possibilités pour l'étude de leur compétence vectorielle, et donc un approfondissement des connaissances sur la transmission du paludisme dans le pays. En effet, de la même manière que la biologie moléculaire est aujourd'hui un outil presque incontournable dans la plupart des domaines de recherche, les infections expérimentales deviennent de plus en plus indispensables pour l'étude de la compétence vectorielle peu importe l'agent pathogène mis en cause (parasite, bactérie ou virus). Je peux donc affirmer que Madagascar a rejoint la course, en faisant partie maintenant des pays d'Afrique qui disposent des systèmes pour réaliser – avec routine pour certains – des infections expérimentales pour étudier la compétence vectorielle des anophèles vecteurs de paludisme, à l'instar du Cameroun, du Sénégal et du Burkina Faso (Nguyen *et al.*, 2017 ; Ndo *et al.*, 2016 ; Tchioffo *et al.*, 2016a ; Gouagna *et al.*, 2014 ; Tchioffo *et al.*, 2013 ; Boissière *et al.*, 2012 ; Ndiath *et al.*, 2011). Ces études sont importantes pour une meilleure compréhension de la contribution effective de chaque vecteur à la transmission de *Plasmodium* et pour contribuer au développement de stratégies alternatives pour interrompre la transmission du paludisme. La plateforme ouvre également la perspective d'étudier le niveau d'immunité bloquant la transmission du paludisme dans les populations humaines des zones de forte endémie, en relation avec leurs origines diverses. De telles études peuvent avoir des retombées importantes sur les stratégies d'intervention pour réduire efficacement la transmission du paludisme, voire son éradication (Gonçalvez *et Hunziker*, 2016 ; Nunes *et al.*, 2014 ; Kaslow, 1993).

### **Compétence vectorielle des anophèles à la transmission de *P. falciparum* et de *P. vivax* à Madagascar : cas d'*An. arabiensis* et d'*An. mascarensis***

Les résultats de nos travaux sur les infections expérimentales montrent que les souches sauvages d'*An. arabiensis* de Madagascar sont susceptibles aussi bien à *P. falciparum* qu'à *P. vivax* ; avec des prévalences d'infection similaires à celles des études réalisées en Afrique continentale (Nguyen *et al.*, 2017 ; Abduselam *et al.*, 2016 ; Ndiath *et al.*, 2011). La compétence vectorielle d'*An. arabiensis* F0 à transmettre *P. falciparum* et *P. vivax*, a été confirmée durant une étude épidémiologique que nous avons menée dans deux villages voisins (à Andriba) où nous avons observé la circulation de ces deux espèces plasmodiales dans la population humaine, ainsi que celle de *P. malariae* (Goupeyou-Youmsi *et al.*, 2018c). En effet, les résultats d'analyse par PCR en temps réel de la faune anophélienne résiduelle du village d'Ambohitromby, ont montré une circulation de *P. falciparum* et de *P. vivax* dans la population des vecteurs, avec *An. arabiensis* comme étant le vecteur contribuant le plus à la transmission des deux espèces plasmodiales. Par contre dans le village de Miarinarivo, les analyses ont montré une absence de la circulation de *P. vivax* dans la faune résiduelle, *An. coustani* étant le vecteur contribuant le plus à la transmission du paludisme dû à *P. falciparum* – aucun *An. arabiensis* n'a été trouvé infecté dans ce village. Nous avons aussi montré qu'*An. arabiensis* de colonie s'avère plus réceptif à *P. vivax* que la souche sauvage, avec un taux moyen de prévalence d'infection et une charge oocystique plus élevés. D'autre part, les résultats d'infection expérimentale ont montré une similarité de la susceptibilité à *P. falciparum* entre les souches sauvages *An. arabiensis* et *An. mascarensis*.

Cependant, des études complémentaires seraient nécessaires pour apporter plus d'informations sur la compétence vectorielle des anophèles malgaches à transmettre le *Plasmodium*, principalement *P. vivax*.

- Premièrement, la compétence vectorielle est, par définition, l'aptitude d'un vecteur à permettre le développement d'un pathogène, de son ingestion dans un repas sanguin à sa maturation dans ses glandes salivaires, lui permettant alors de transmettre le pathogène à l'hôte vertébré. Or, nous n'avons pas vérifié la présence de sporozoïtes chez les moustiques que nous avons infectés expérimentalement. Cela se fait soit par dissection des glandes salivaires du moustique et détection des sporozoïtes par microscopie (Beier *et*

*al.*, 1988), soit par détection de la protéine CSP par analyses ELISA (Beier *et al.*, 1988 ; Wirtz *et al.*, 1987 ; Wirtz *et al.*, 1985) et PCR (Bass *et al.*, 2008 ; Snounou *et al.*, 1993). Les deux dernières techniques sont les plus utilisées de nos jours. Il serait donc important d'étudier la compétence vectorielle des anophèles vecteurs de paludisme à Madagascar, en prenant en compte la détection des sporozoïtes comme c'est cas dans des études réalisées antérieurement (Vallejo *et al.*, 2016 ; Zollner *et al.*, 2006).

- Deuxièmement, Bien que ce soit une première dans le pays d'avoir démontré la susceptibilité d'*An. arabiensis* (F0 et de colonie) à *P. vivax* et à *P. falciparum*, ainsi que celle d'*An. mascarensis* F1 à *P. falciparum*, une étude de la cinétique de développement de *P. vivax* chez les anophèles malgaches est fortement recommandée. En effet, aucune étude du développement sporogonique de *P. vivax* n'a été effectuée dans le contexte africain, les deux études portant sur ce sujet ont été réalisées en Thaïlande (Zollner *et al.*, 2006) et en Inde (Balabaskaran Nina *et al.*, 2017). En outre, les publications de ces dernières années ont bouleversé le dogme du paludisme à *P. vivax* chez les individus d'origine africaine – dont les malagasy<sup>11</sup> – dépourvus de l'antigène Duffy, récepteur pour l'entrée du parasite dans les hématies (Gunalan *et al.*, 2018 ; Niangaly *et al.*, 2017 ; Russo *et al.*, 2017 ; Zimmerman, 2017 ; Poirier *et al.*, 2016 ; Howes *et al.*, 2015 ; Frucho *et al.*, 2014 ; Woldearegai *et al.*, 2013 ; Menard *et al.*, 2010 ; Mercereau-Puijalon et Menard, 2010). Il serait donc intéressant de déterminer le rôle du portage de l'antigène Duffy dans l'infectivité de *P. vivax* pour les anophèles malgaches.
- Troisièmement, à l'appui de la revue sur *An. mascarensis*, renforçant l'hypothèse que cette espèce est un complexe d'espèces cryptiques, l'analyse de la compétence vectorielle de populations issues de différentes régions de Madagascar est maintenant envisageable. Avec les avancées technologiques disponibles de nos jours, il nous est possible d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse par la biologie moléculaire. En effet, comme perspective, l'équipe prévoit de faire d'une part un séquençage des gènes classiquement utilisés pour différencier les espèces, comme les gènes « Internal transcribed spacer » ou ITS (Beebe

---

<sup>11</sup> Je préfère utiliser le mot « malagasy » - parlant de la langue française - pour désigner les habitants de Madagascar. En effet, bon nombre de malagasy avec qui j'ai collaboré, de quelque manière que ce soit, n'ont pas apprécié d'être désignés par le mot « malgache », que je garde pour qualifier les animaux ou les objets. Quelques explications via le lien suivant : <http://randriamialy.mondoblog.org/2017/08/21/malagasy-ou-malgache-vous-ne-pouvez-pas-forcer-les-gens-a-choisir/> (Page web consultée le 29/08/2018).

et Saul, 1995) et les gènes Cytochrome oxydase I ou COI (Folmer *et al.*, 1994 ; Simon *et al.*, 1994 ; Beard *et al.*, 1993). D'autre part, un séquençage du génome entier d'*An. mascarensis* car aucune donnée n'est connue. Une telle étude contribuerait également à l'orientation des stratégies de lutte antivectorielle vers une meilleure efficacité.

### **Différente contribution des vecteurs à la transmission du paludisme dans deux villages voisins dans la commune rurale d'Andriba**

Lors d'une étude préliminaire réalisée en 2016 dans la commune rurale d'Andriba, nous avons observé que la prévalence du paludisme dans la population humaine était différente entre deux villages voisins distants de seulement un kilomètre et demi, Ambohitromby et Miarinarivo. En effet, il existe à Madagascar, une hétérogénéité du paludisme, même dans des régions très proches (Fontenille, 1992). Elle est surtout liée aux différents domaines biogéographiques (Mouchet *et al.*, 2004, 1993 ; Mouchet et Blanchy, 1995). Afin de déchiffrer les bases de cette différence, nous avons conduit une étude pluridisciplinaire incluant entomologie, parasitologie et immunologie. Malgré le fait que la prévalence du paludisme humain était similaire entre les deux villages – confirmation faite par les marqueurs sérologiques – et bien qu'*An. funestus* était l'espèce la plus endophile et endophage dans les deux villages, nos résultats ont montré que *An. arabiensis* contribue le plus à la transmission de *P. falciparum* et de *P. vivax* à Ambohitromby et que *An. coustani* contribue le plus à la transmission de *P. falciparum* à Miarinarivo ; *P. vivax* n'ayant pas été détecté dans la faune anophélienne du deuxième village. Il est à noter que c'est la première fois que la contribution majeure d'*An. coustani* a été montrée dans le village de Miarinarivo à Andriba. Résultats qui apportent plus d'arguments aux études antérieures qui ont montré la probable implication d'*An. coustani* à la transmission du paludisme à Madagascar (Nepomichene *et al.*, 2015).

Principales activités des populations à Andriba – et comme dans la plupart des communes sur les Hauts Plateaux malgaches –, les rizières constituent aussi les principaux gîtes larvaires des anophèles à Madagascar (Robert *et al.*, 2002 ; Laventure *et al.*, 1996 ; Marrama *et al.*, 1995 ; Ravoniharimelina *et al.*, 1992). La différente contribution des vecteurs entre les deux villages est surtout en rapport avec l'abondance des vecteurs qui est liée à un

changement de l'environnement écologique souligné dans des études réalisées précédemment dans le Sud-Est de Madagascar (Zohdy *et al.*, 2016) et au Burkina Faso (Soma *et al.*, 2018). Sont importantes, d'une part les différentes phases de croissance du riz (Ravoniharimelina *et al.*, 1992) et d'autre part à la disposition des maisons et leur distance par rapport aux gîtes larvaires (Endo et Eltahir, 2016). En effet, *An. arabiensis* (préférant les gîtes ensoleillés et à végétation basse) est plus abondant à Ambohitromby, alors qu'à Miarinarivo c'est *An. coustani* (préférant les gîtes ombragés par une végétation dressée) le plus abondant. Ces résultats suggèrent que la population d'Ambohitromby a commencé tardivement les activités rizicoles, comparé à celles de Miarinarivo qui auraient commencé bien avant. Avec les caractères exophiles d'*An. arabiensis* et d'*An. coustani*, espèces d'anophèles contribuant le plus à la transmission du paludisme dans le site d'étude, les mesures adéquates à recommander pour réduire la transmission du paludisme dans ces deux villages, seraient de faire des campagnes systématiques d'aspersions d'insecticides dans les abris extérieurs et d'éliminer ou réduire les gîtes larvaires près des maisons. Bien évidemment, en combinant ces mesures à une utilisation des moustiquaires ; une utilisation des répulsifs cutanés n'est pas à exclure.

En 2016, Ambohitromby a montré une prévalence de paludisme humain significativement plus élevée que celle de Miarinarivo. En 2017, il n'y a pas eu de différence significative entre les deux villages mais la prévalence à Ambohitromby était toujours plus élevée que celle à Miarinarivo. En 2018, on a observé un inversement de situation, c'est Miarinarivo qui avait une prévalence de paludisme plus élevée cette-fois-ci, mais sans aucune différence significative entre les deux villages. Les questions que je me pose sont : qu'en sera-t-il en 2019 ? Miarinarivo finira-t-il par prendre le dessus ? Pour l'instant, ce changement des prévalences d'infection pourrait s'expliquer par un changement des habitudes des populations des deux villages. En effet, durant nos missions effectuées dans le cadre des infections expérimentales – précisément pendant dépistages actifs des porteurs de *Plasmodium* –, les populations ont été sensibilisées sur les mesures préventives du paludisme et il se semblerait qu'elles les ont mises en pratique. Cela se reflète surtout par une diminution globale des prévalences d'infection en 2017 et en 2018, comparées à celles de 2016. La tendance qui tend à s'inverser s'expliquerait par le fait que la population d'Ambohitromby appliquerait mieux ces mesures. En effet, des études antérieures ont montré que la participation de la

communauté est très importante pour des progrès significatifs dans la lutte contre le paludisme (Bamidele et al., 2012 ; Deressa et al., 2005 ; Rojas et al., 2001). Il est à noter que le niveau socio-économique de la population d'Ambohitromby semble légèrement être au dessus de celle de Miarinarivo –, visible notamment dans le type et l'organisation des maisons. En effet, d'après l'INSTAT (Institut national de la statistique (INSTAT) *et al.*, 2016), le statut socio-économique influence sur le mode d'approvisionnement en moustiquaires, les populations ayant des revenus plus élevés s'en procurent beaucoup plus dans les boutiques et marchés. Nous avons fait la même observation entre écoles publiques et écoles privées de la zone d'étude (cf. chapitre 3).

Les données issues de cette étude témoignent de la variabilité des dynamiques de la biologie des vecteurs et des comportements humains et qui peuvent être utilisées pour mieux décrire l'épidémiologie et la transmission du paludisme à Madagascar. Néanmoins, pour mieux déchiffrer les bases de la différence observée entre les deux villages, il serait bien de faire la même étude sur plusieurs années. Afin de voir si ce sont les changements dans l'environnement écologique qui en seraient la principale cause. En effet, il n'est pas à exclure qu'un phénomène de compétition entre les populations d'anophèles auraient pu jouer un rôle déterminant dans la transmission du paludisme dans les deux villages (Institute of Medicine, 1991); ajouté à cela la compétence vectorielle qui dépend des facteurs génétiques et physiologiques du vecteur.

### **Pour terminer...**

La population humaine de Madagascar, par des siècles de métissage, est très diverse. Ce qui lui confère une grande diversité du paludisme. Cela se manifeste d'une part par la présence dans le pays de quatre des cinq espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'homme. D'autre part, son caractère insulaire fait qu'il y a un fort niveau d'endémisme de la faune, aussi bien que de la flore. Ainsi, les anophèles vecteurs de paludisme à Madagascar présentent une particularité, comparés à ceux de l'Afrique continentale ; le comportement endophile/exophile d'une espèce vectrice n'étant toujours similaire à celui de cette même espèce en Afrique continentale. De manière générale, les données scientifiques

## Discussion générale et perspectives

obtenues dans un contexte donné ne sont pas toujours transposables dans un autre contexte. Ceci est encore plus vrai pour des pays insulaires comme Madagascar où il y a un fort niveau d'endémicité. Bref, Madagascar, par sa grande diversité et son caractère insulaire, offre l'occasion de relever de grands défis scientifiques. Alors, lancez-vous !

Pour finir, je tiens à saluer la bonne expertise entomologique du personnel de l'IPM, précisément concernant l'identification morphologique des moustiques. En effet, cette technique se perd peu à peu au profit de techniques biomoléculaires comme la PCR et le MALDI-TOF permettant aussi d'identifier les espèces. Cependant, ces dernières nécessitent d'avoir accès à un laboratoire bien équipé et donc, ne sont pas applicables sur le terrain.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Références bibliographiques

- Abduselam, N., Zeynudin, A., Berens-Riha, N., Seyoum, D., Pritsch, M., Tibebu, H., ... Yewhalaw, D. (2016). Similar trends of susceptibility in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles pharoensis* to *Plasmodium vivax* infection in Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1839-0
- Adak, T., Singh, O. P., Das, M. K., Wattal, S. et Nanda, N. (2005). Comparative susceptibility of three important malaria vectors *Anopheles stephensi*, *Anopheles fluviatilis*, and *Anopheles sundaicus* to *Plasmodium vivax*. *Journal of Parasitology*, 91(1), 79-82. doi:10.1645/GE-3514
- Akpogheneta, O. J., Duah, N. O., Tetteh, K. K. A., Dunyo, S., Lanar, D. E., Pinder, M. et Conway, D. J. (2008). Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infection and Immunity*, 76(4), 1748-1755. doi:10.1128/IAI.01333-07
- Al Nowais, S. (2017, 15 novembre). Malaria kills a child every two minutes - and experts fear it'll worsen without more action. Dans *The National*. <https://www.thenational.ae/uae/malaria-kills-a-child-every-two-minutes-and-experts-fear-it-ll-worsen-without-more-action-1.676014> Consulté le 30 juillet 2018
- Ambrosino, E., Dumoulin, C., Orlandi-Pradines, E., Remoue, F., Toure-Baldé, A., Tall, A., ... Rogier, C. (2010). A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malaria Journal*, 9(1), 317. doi:10.1186/1475-2875-9-317
- Amir, A., Russell, B., Liew, J. W. K., Moon, R. W., Fong, M. Y., Vythilingam, I., ... Lau, Y. L. (2016). Invasion characteristics of a *Plasmodium knowlesi* line newly isolated from a human. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep24623
- Antonio-Nkondjio, C., Sonhafouo-Chiana, N., Ngadjeu, C. S., Doumbe-Belisse, P., Talipouo, A., Djamouko-Djonkam, L., ... Wondji, C. S. (2017). Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors*, 10(472). doi:10.1186/s13071-017-2417-9
- Antonio-Nkondjio, C., Tene Fossog, B., Kopya, E., Poumachu, Y., Menze Djantio, B., Ndo, C., ... Wondji, C. S. (2015). Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malaria Journal*, 14(155). doi:10.1186/s12936-015-0675-6
- Armistead, J. S., Morlais, I., Mathias, D. K., Jardim, J. G., Joy, J., Fridman, A., ... Dinglasan, R. R. (2014). Antibodies to a single, conserved epitope in *Anopheles* APN1 inhibit universal transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *Infection and Immunity*, 82(2), 818-829. doi:10.1128/IAI.01222-13
- Awono-Ambene, H. P., Diawara, L. et Robert, V. (2001). Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1, 2), 32-34. doi:10.4269/ajtmh.2001.64.32
- Balabaskaran Nina, P., Mohanty, A. K., Ballav, S., Vernekar, S., Bhinge, S., D'souza, M., ... Rathod, P. K. (2017). Dynamics of *Plasmodium vivax* sporogony in wild *Anopheles*

## Références bibliographiques

- stephensi* in a malaria-endemic region of Western India. *Malaria Journal*, 16(1). doi:10.1186/s12936-017-1931-8
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Robert Shaw, W., Dabiré, R. K., ... Catteruccia, F. (2014). Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms4985
- Bamidele, J. O., Ntaji, M. I., Oladele, E. A., & Bamimore, O. K. (2012). Community Participation in Malaria Control in Olorunda Local Government Area, Osun State, Southwestern Nigeria. *African Journal of Infectious Diseases*, 6(2), 24-28.
- Barbazan, P., Baldet, T., Darriet, F., Escaffre, H., Haman Djoda, D. et Hougard, J.-M. (1998). Impact of treatments with *Bacillus sphaericus* on *Anopheles* populations and the transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of Cameroon. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(1), 33-39.
- Barnadas, C., Ratsimbaoa, A., Tichit, M., Bouchier, C., Jahevitra, M., Picot, S. et Ménard, D. (2008). *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in pvm-dr1 and pvcrt-o genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4233-4240. doi:10.1128/AAC.00578-08
- Barry, A. E. et Arnott, A. (2014). Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Frontiers in Immunology*, 5(359), 1-16. doi:10.3389/fimmu.2014.00359
- Bass, C., Nikou, D., Blagborough, A. M., Vontas, J., Sinden, R. E., Williamson, M. S. et Field, L. M. (2008). PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malaria Journal*, 7(1), 177. doi:10.1186/1475-2875-7-177
- Beard, C. B., Hamm, D. M. et Collins, F. H. (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2(2), 103-124. doi:10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x
- Beebe, N. W. et Saul, A. (1995). Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(5), 478-481. doi:10.4269/ajtmh.1995.53.478
- Beier, M. S., Schwartz, I. K., Beier, J. C., Perkins, P. V., Onyango, F., Koros, J. K., ... Brandling-Bennett, A. D. (1988). Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected *Anopheles* from western kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39(4), 323-327. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.323
- Bencimon, C., Belmonte, O., Randrianarivelojosia, M., Grosjean, P., Pfister, P. et Combe, P. (2006). Diagnostic du paludisme dans la ville d'Antananarivo : réflexion à partir des résultats obtenus à l'Institut Pasteur de Madagascar de 2001 à 2004. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 99(3), 198-199.
- Birkett, A. J. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. *Vaccine*, 34(26), 2915-2920. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.074

## Références bibliographiques

- Birkett, A. J., Moorthy, V. S., Loucq, C., Chitnis, C. E. et Kaslow, D. C. (2013). Malaria vaccine R&D in the Decade of Vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities. *Vaccine*, 31, B233-B243. doi:10.1016/j.vaccine.2013.02.040
- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., ... Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*, 8(5), 1-12. doi:10.1371/journal.ppat.1002742
- Bompard, A., Da, D. F., Yerbanga, R. S., Biswas, S., Kapulu, M., Bousema, T., ... Churcher, T. S. (2017). Evaluation of two lead malaria transmission blocking vaccine candidate antibodies in natural parasite-vector combinations. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-06130-1
- Boudin, C., Diop, A., Gaye, A., Gadiaga, L., Gouagna, C., Safeukui, I. et Bonnet, S. (2005). *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity in three areas with perennial or seasonal endemicity and different levels of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(6), 1090–1095.
- Bourgouin, C., Larget-Thiery, I. et de Barjac, H. (1984). Efficacy of dry powders from *Bacillus sphaericus*: RB 80, a potent reference preparation for biological titration. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44(2), 146-150. doi:10.1016/0022-2011(84)90005-3
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I. et Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12), 833-840. doi:10.1038/nrmicro3364
- Bousema, T., Churcher, T. S., Morlais, I. et Dinglasan, R. R. (2013). Can field-based mosquito feeding assays be used for evaluating transmission-blocking interventions? *Trends in Parasitology*, 29(2), 53-59. doi:10.1016/j.pt.2012.11.004
- Bousema, T., Dinglasan, R. R., Morlais, I., Gouagna, L. C., van Warmerdam, T., Awono-Ambene, P. H., ... Churcher, T. S. (2012). Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS ONE*, 7(8), 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0042821
- Bousema, T. et Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(2), 377–410. doi:10.1128/CMR.00051-10
- Bousema, T., Drakeley, C. J., Kihonda, J., Hendriks, J. C. M., Akim, N. I. J., Roeffen, W. et Sauerwein, R. W. (2007). A longitudinal study of immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunology*, 29(6), 309-317. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00948.x
- Bradley, J., Stone, W., Da, D. F., Morlais, I., Dicko, A., Cohuet, A., ... Bousema, T. (2018). Predicting the likelihood and intensity of mosquito infection from sex specific *Plasmodium falciparum* gametocyte density. *eLife*, 7(e34463). doi:10.7554/eLife.34463
- Brutus, L., Le Goff, G., Rasoloniaina, L. G., Rajaonarivelo, V., Raveloson, A. et Cot, M. (2001). Lutte contre le paludisme dans le moyen-ouest de Madagascar : comparaison

## Références bibliographiques

- de l'efficacité de la lambda-cyhalothrine et du DDT en aspersions intra-domiciliaires. I - Étude entomologique. *Parasite*, 8(4), 297-308. doi:10.1051/parasite/2001084297
- Camara, S., Koffi, A. A., Ahoua Alou, L. P., Koffi, K., Kabran, J.-P. K., Koné, A., ... Pennetier, C. (2018). Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (s.l.) from Côte d'Ivoire. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-017-2546-1
- Carnevale, P., Baudon, D., Molez, J.-F., Boudin, C., Robert, V. et Gazin, P. (1984a). Evaluation épidémiologique des paludismes. *Etudes Médicales*, 15, 107-115.
- Carnevale, P., Baudon, D., Molez, J.-F. et Guiguemde, T. R. (1984b). Aspects classiques et modernes des cycles de développement des plasmodiums humains. *Etudes Médicales*, 2, 61-78.
- Carnevale, P. et Robert, V. (2009). *Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. [Les anophèles]. IRD Éditions. doi:10.4000/books.irdeditions.10374
- Carson, R. (1962). *Silent spring* (A Crest Reprint éd.).
- Center for disease control and prevention (CDC). (2018, 17 avril). Malaria parasites. Dans [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html> Consulté le 16 juin 2018
- Center for disease control and prevention (CDC). (2018, 3 mai). *Malaria's impact worldwide*. [CDC]. [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html) Consulté le 30 juillet 2018
- Centre national des ressources textuelles et lexicales. (2012). *Définition de HOMME*. <http://www.cnrtl.fr/definition/academie9/homme> Consulté le 20 juillet 2018
- Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. et Guillet, P. (1999). Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(3), 230-234.
- Charlwood, J D, Pinto, J., Sousa, C. A., Madsen, H. et Ferreira, C. (2002). The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from São Tomé Island. *Journal of Vector Ecology*, 27(2), 178-183.
- Charlwood, J Derek, Pinto, J., Sousa, C. A., Ferreira, C., Petrarca, V. et Rosario, V. do E. (2003). « A mate or a meal » – Pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Malaria Journal*, 2(9). doi:10.1186/1475-2875-2-9
- Churcher, T. S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A. L. et Basáñez, M.-G. (2013). Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *eLife*, 2(e00626). doi:10.7554/eLife.00626
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M. et Dimopoulos, G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6031), 855-858. doi:10.1126/science.1201618

## Références bibliographiques

- Cirimotich, C. M., Ramirez, J. L. et Dimopoulos, G. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell host & microbe*, 10(4), 307-310. doi:10.1016/j.chom.2011.09.006
- Clements, A. N. (1992). *Biology of mosquitoes : development nutrition and reproduction*. [Biology of Mosquitoes]. Springer Netherlands.
- Clements, A. N. (1999). *The biology of mosquitoes : sensory reception and behaviour*. [The Biology of Mosquitoes]. (s. l.):Chapman & Hall.
- Climate-Data.org. (2018a). *Climat Andriba*. <https://fr.climate-data.org/location/472281/>  
Consulté le 12 juin 2018
- Climate-Data.org. (2018b). *Climat Ankazobe*. <https://fr.climate-data.org/location/30218/>  
Consulté le 12 juin 2018
- Climate-Data.org. (2018c). *Climat Antanimbary*. <https://fr.climate-data.org/location/632581/>  
Consulté le 12 juin 2018
- Coalson, J. E., Walldorf, J. A., Cohee, L. M., Ismail, M. D., Mathanga, D., Cordy, R. J., ... Wilson, M. L. (2016). High prevalence of *Plasmodium falciparum* gametocyte infections in school-age children using molecular detection: patterns and predictors of risk from a cross-sectional study in southern Malawi. *Malaria Journal*, 15(527). doi:10.1186/s12936-016-1587-9
- Coatney, G., Collins, W., Warren, M. et Contacos, P. (1971). *The primate malarias*. Washington, D.C. 20402:U.S. Government Printing Office.
- Coelho, C. H., Doritchamou, J. Y. A., Zaidi, I. et Duffy, P. E. (2017). Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *npj Vaccines*, 2(1). doi:10.1038/s41541-017-0035-3
- Coetzee, M et Fontenille, D. (2004). Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 599-605. doi:10.1016/j.ibmb.2004.03.012
- Coetzee, Maureen, Hunt, R. H., Wilkerson, R., Torre, A. D., Coulibaly, M. B. et Besansky, N. J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619(3), 246-274. doi:10.11646/zootaxa.3619.3.2
- Collins, W. E. et Jeffery, G. M. (2007). *Plasmodium malariae* : parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 579-592. doi:10.1128/CMR.00027-07
- Cook, J., Reid, H., Iavro, J., Kuwahata, M., Taleo, G., Clements, A., ... Drakeley, C. (2010). Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malaria Journal*, 9(169). doi:10.1186/1475-2875-9-169
- Corran, P., Coleman, P., Riley, E. et Drakeley, C. (2007). Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends in Parasitology*, 23(12), 575-582. doi:10.1016/j.pt.2007.08.023
- Cox-Singh, J. (2018). *Plasmodium knowlesi* : experimental model, zoonotic pathogen and golden opportunity? *Parasitology*, 145(1), 1-5. doi:10.1017/S0031182017001858

## Références bibliographiques

- Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., ... Krishna, S. (2010). Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings : a case report. *Malaria Journal*, 9(10), 1-7. doi:10.1186/1475-2875-9-10
- Coz, J., Davidson, G., Chauvet, G. et Hamon, J. (1968). La résistance des anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cahiers ORSTOM Série Entomologie médicale*, 6(3-4), 207-210.
- Crompton, P. D., Kayala, M. A., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Weiss, G. E., ... Pierce, S. K. (2010). A prospective analysis of the ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6958-6963. doi:10.1073/pnas.1001323107
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., ... Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480(7378), 534-537. doi:10.1038/nature10606
- Dambach, P., Louis, V. R., Kaiser, A., Ouedraogo, S., Sié, A., Sauerborn, R. et Becker, N. (2014). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, 7(371), 1-8. doi:10.1186/1756-3305-7-371
- David, J.-P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P. M., ... Ranson, H. (2005). The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4080-4084. doi:10.1073/pnas.0409348102
- Delécluse, A., Bourgoïn, C., Klier, A. et Rapoport, G. (1988). Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *MGG Molecular & General Genetics*, 214(1), 42-47. doi:10.1007/BF00340177
- Dennison, N. J., Saraiva, R. G., Cirimotich, C. M., Mlambo, G., Mongodin, E. F. et Dimopoulos, G. (2016). Functional genomic analyses of Enterobacter, *Anopheles* and *Plasmodium* reciprocal interactions that impact vector competence. *Malaria Journal*, 15(425), 1-15. doi:10.1186/s12936-016-1468-2
- Deressa, W., Olana, D., & Chibsa, S. (2005). Community participation in malaria epidemic control in highland areas of southern Oromia, Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Development*, 19(1), 3-10-10. <https://doi.org/10.4314/ejhd.v19i1.9964>
- Diabate, A., Dabiré, R. K., Kengne, P., Brengues, C., Baldet, T., Ouari, A., ... Lehmann, T. (2006). Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *Population and Community Ecology*, 480-483.
- Dicko, A., Roh, M. E., Diawara, H., Mahamar, A., Soumare, H. M., Lanke, K., ... Bousema, T. (2018). Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali : a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(6), 627-639. doi:10.1016/S1473-3099(18)30044-6

## Références bibliographiques

- Dinko, B., Ayivor, R., Tagboto, S., Tampuori, J., Adzaku, F., Binka, F. N. et Awandare, G. A. (2016). Comparison of malaria diagnostic methods in four hospitals in the Volta region of Ghana, *7*(5), 7.
- Djègbè, I., Agossa, F. R., Jones, C. M., Poupardin, R., Cornelie, S., Akogbéto, M., ... Corbel, V. (2014). Molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. *Parasites & Vectors*, *7*(1), 409. doi:10.1186/1756-3305-7-409
- Djouaka, R., Irving, H., Tukur, Z. et Wondji, C. S. (2011). Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLoS ONE*, *6*(11). doi:10.1371/journal.pone.0027760
- Dobaño, C., Quelhas, D., Quintó, L., Puyol, L., Serra-Casas, E., Mayor, A., ... Menéndez, C. (2012). Age-dependent IgG subclass responses to *Plasmodium falciparum* EBA-175 are differentially associated with incidence of malaria in Mozambican children. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(2), 157-166. doi:10.1128/CVI.05523-11
- Doctor, S. M., Liu, Y., Whitesell, A., Thwai, K. L., Taylor, S. M., Janko, M., ... Meshnick, S. R. (2016). Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: Comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *85*(1), 16–18. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.004
- Doodoo, D., Aikins, A., Asamoah Kusi, K., Lamptey, H., Remarque, E., Milligan, P., ... Theisen, M. (2008). Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malaria Journal*, *7*(1), 142. doi:10.1186/1475-2875-7-142
- Douce, S. (2018). Des moustiques OGM contre le paludisme : le projet qui fait débat au Burkina. *Le Monde.fr*. [https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/06/29/des-moustiques-ogm-contre-le-paludisme-le-projet-qui-fait-debat-au-burkina\\_5323380\\_3212.html](https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/06/29/des-moustiques-ogm-contre-le-paludisme-le-projet-qui-fait-debat-au-burkina_5323380_3212.html) Consulté le 11 juillet 2018
- Douglas, A. D., Williams, A. R., Illingworth, J. J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A. L., ... Draper, S. J. (2011). The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nature Communications*, *2*(1). doi:10.1038/ncomms1615
- Drakeley, C. et Cook, J. (2009). Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. [Chapter 5 Potential Contribution of Sero-Epidemiological Analysis for Monitoring Malaria Control and Elimination]. Dans *Advances in Parasitology*. , *69* (p. 299-352). Elsevier. 69 vol. doi:10.1016/S0065-308X(09)69005-9
- Drakeley, C. J., Bousema, J. T., Akim, N. I. J., Teelen, K., Roeffen, W., Lensen, A. H., ... Sauerwein, R. W. (2006). Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunology*, *28*(5), 185-190. doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00818.x
- Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W. et Targett, G. A. T. (2006). The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends in Parasitology*, *22*(9), 424-430. doi:10.1016/j.pt.2006.07.001

## Références bibliographiques

- Drakeley, C. J., Corran, P. H., Coleman, P. G., Tongren, J. E., McDonald, S. L. R., Carneiro, I., ... Riley, E. M. (2005). Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5108-5113. doi:10.1073/pnas.0408725102
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., ... Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe*, 24(1), 43-56. doi:10.1016/j.chom.2018.06.008
- Duchemin, J.-B., Tsy, J.-M. L. P., Rabarison, P., Roux, J., Coluzzi, M. et Costantini, C. (2001). Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(1), 50-57. doi:10.1046/j.1365-2915.2001.00276.x
- Endo, N. et Eltahir, E. A. B. (2016 décembre). Environmental determinants of malaria transmission in African villages. *Malaria Journal*, 15(1). doi:10.1186/s12936-016-1633-7
- Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P., ... Simard, F. (2006). First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), 795-797.
- Etang, J., Manga, L., Chandre, F., Guillet, P., Fondjo, E., Mimpfoundi, R., ... Fontenille, D. (2003). Insecticide Susceptibility Status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera : Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), 491-497. doi:10.1603/0022-2585-40.4.491
- Farrance, C. E., Rhee, A., Jones, R. M., Musiyuchuk, K., Shamloul, M., Sharma, S., ... Yusibov, V. (2011). A Plant-Produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of *Plasmodium falciparum*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1351-1357. doi:10.1128/CVI.05105-11
- Faruk, J. A. (2016). Blood transfusion malaria: A literature review. *Annals of Nigerian Medicine*, 10(2), 49-57. doi:10.4103/0331-3131.206210
- Feng, H., Gupta, B., Wang, M., Zheng, W., Zheng, L., Zhu, X., ... Cui, L. (2015). Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidate Pvs48/45 in *Plasmodium vivax* populations in China. *Parasites & Vectors*, 8(1). doi:10.1186/s13071-015-1232-4
- Fillinger, U., Knols, B. G. J. et Becker, N. (2003). Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, 8(1), 37-47. doi:10.1046/j.1365-3156.2003.00979.x
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. et Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Fontenille, D., Rakotoarivony, I., Rajaonarivelo, E. et Lepers, J. P. (1988). [Study of Culicidae in Firaisam-Pokontany of Ambohimanjaka in the environs of Tananarive: results of a longitudinal study, in particular on the vectorial transmission of malaria]. *Archives De l'Institut Pasteur De Madagascar*, 54(1), 231-242.

## Références bibliographiques

- Fontenille, Didier. (1992). Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar. *Mémoires de la Société royale belge d'Entomologie*, 35, 129–132.
- Fontenille, Didier. (2009). *Qu'est ce qu'un insecte vecteur de maladies ? Quel risque entomologique dans la région ?* Actes du colloque Maladies vectorielles et moustiques vecteurs : actualités et prévention sur le littoral méditerranéen. Journée d'information, CRDP, allée de la Citadelle, Montpellier Centre.
- Fontenille, Didier et Campbell, G. H. (1992). Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1), 28–30. doi:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.28>
- Fontenille, Didier, Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait Robin, R., Setbon, M., Tirel, B. et Yébakima, A. (dir.). (2013). Quelle est la contribution de l'évaluation des risques vectoriels à l'évaluation du risque épidémique? Dans *La lutte antivectorielle en France* (p. 501-564). Marseille:IRD Éditions.
- Fontenille, Didier, Lepers, J. P., Coluzzi, M., Campbell, G. H., Rakotoarivony, I. et Coulanges, P. (1992, 1 mars). Malaria Transmission and Vector Biology on Sainte Marie Island, Madagascar. *Journal of Medical Entomology*, 29(2), 197-202. doi:10.1093/jmedent/29.2.197
- Fouda, G. G., Leke, R. F. G., Long, C., Druilhe, P., Zhou, A., Taylor, D. W. et Johnson, A. H. (2006). Multiplex assay for simultaneous measurement of antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(12), 1307-1313. doi:10.1128/CVI.00183-06
- Fru-Cho, J., Bumah, V. V., Safeukui, I., Nkuo-Akenji, T., Titanji, V. P. et Haldar, K. (2014). Molecular typing reveals substantial *Plasmodium vivax* infection in asymptomatic adults in a rural area of Cameroon. *Malaria Journal*, 13(170). doi:10.1186/1475-2875-13-170
- Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E. et James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), E6736-E6743. doi:10.1073/pnas.1521077112
- Garrett-Jones, C. (1964). The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin of the World Health Organization*, 30(2), 241-261.
- Gatti, S., Gramegna, M., Bisoffi, Z., Raglio, A., Gulletta, M., Klersy, C., ... Gispi Study Group. (2007). A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101(3), 195-204. doi:10.1179/136485907X156997
- Gaye, O., Laughlin, G. M., Diouf, M. et Diallo, S. (1998). Etude comparative de cinq méthodes de diagnostic biologique du paludisme: la goutte epaisse, la methode QBC, la sonde à ADN, la PCR et le ParaSight F test. *Médecine d'Afrique Noire*, 45(4), 244-248.

## Références bibliographiques

- Godfray, H. C. J., Lindsay, S. W., Welkhoff, P. A., Savadogo, M., Touré, Y. T., Greenwood, B., ... Singh, J. A. (2018). Pathway to deployment of gene drive mosquitoes as a potential biocontrol tool for elimination of malaria in sub-saharan africa: recommendations of a scientific working group †. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(6\_Suppl), 1-49. doi:10.4269/ajtmh.18-0083
- Gomes, F. M., Hixson, B. L., Tyner, M. D. W., Ramirez, J. L., Canepa, G. E., Alves e Silva, T. L., ... Barillas-Mury, C. (2017). Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae s.l.* mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), 12566-12571. doi:10.1073/pnas.1716181114
- Gonçalves, D. et Hunziker, P. (2016). Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria Journal*, 15(95). doi:10.1186/s12936-016-1163-3
- Gouagna, L. C., Yao, F., Yameogo, B., Dabiré, R. K. et Ouédraogo, J.-B. (2014). Comparison of field-based xenodiagnosis and direct membrane feeding assays for evaluating host infectiousness to malaria vector *Anopheles gambiae*. *Acta Tropica*, 130, 131-139. doi:10.1016/j.actatropica.2013.10.022
- Goupeyou-Youmsi J. M., J. J. Nepomichene T. N., Tchioffo Tsapi M., Boyer S., Girod R., Randrianarivojosia M., Vigan-Womas I., Ndiath O. and Bourgoïn C (2018a). Establishment of the first experimental field site in Madagascar for studying *Anopheles* competency to transmit *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. En préparation.
- Goupeyou-Youmsi J. M., Tantely L. and Bourgoïn C. (2018b). *Anopheles mascarensis*, an endemic malaria vector of Madagascar: a species in evolution or a complex of sibling species? *Malaria Journal*. Soumission en cours.
- Goupeyou-Youmsi J. M., Rakotondranaivo T., Andriamiarimanana M. R., Rasoloharimanana T., Puchot N., Rakotoarison R. L., Rakotomalala E., Girod R., Bourgoïn C., Ndiath O. and Vigan-Womas I. (2018c). Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar? *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Soumission en cours.
- Gray, J. C., Corran, P. H., Mangia, E., Gaunt, M. W., Li, Q., Tetteh, K. K. A., ... Crisanti, A. (2007). Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clinical Chemistry*, 53(7), 1244-1253. doi:10.1373/clinchem.2006.081695
- Grjebine, A. (1966). *Insectes diptères Culicidae Anophelinae*. (22). Centre IRD de Bondy. Paris:ORSTOM.
- Groupe de travail « Saisine Moustiques modifiés ». (2017). *Rapport préparatoire à la recommandation du CEES Saisine du 12 octobre 2015 sur l'utilisation de moustiques modifiés par les biotechnologies pour la lutte antivectorielle*. [Rapport préparatoire à la recommandation du CEES Saisine du 12 octobre 2015] (p. 219). Haut Conseil des Biotechnologies.

## Références bibliographiques

- Gunalan, K., Niangaly, A., Thera, M. A., Doumbo, O. K. et Miller, L. H. (2018). *Plasmodium vivax* infections of Duffy-negative erythrocytes: historically undetected or a recent adaptation? *Trends in Parasitology*, 34(5), 420-429. doi:10.1016/j.pt.2018.02.006
- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., ... Nolan, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34(1), 78-83. doi:10.1038/nbt.3439
- Harbach, R. E. (2013, 24 juillet, 24 juillet). The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. Dans S. Manguin (dir.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. InTech. doi:10.5772/54695
- Harbach, R. E. (2018). Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> Consulté le 17 juin 2018
- Harris, I., Sharrock, W. W., Bain, L. M., Gray, K.-A., Bobogare, A., Boaz, L., ... Cheng, Q. (2010). A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malaria Journal*, 9(254). doi:10.1186/1475-2875-9-254
- Haubruge, É. et Amichot, M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2(3), 161–174.
- Hester, J., Chan, E. R., Menard, D., Mercereau-Puijalon, O., Barnwell, J., Zimmerman, P. A. et Serre, D. (2013). De novo assembly of a field isolate genome reveals novel *Plasmodium vivax* erythrocyte invasion genes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(12), 1-11. doi:10.1371/journal.pntd.0002569
- Hillyer, J. F., Barreau, C. et Vernick, K. D. (2007). Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *International Journal for Parasitology*, 37(6), 673-681. doi:10.1016/j.ijpara.2006.12.007
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K. et Hay, S. I. (2016a). Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6 Suppl), 15-34. doi:10.4269/ajtmh.16-0141
- Howes, R. E., Mioramalala, S. A., Ramiranirina, B., Franchard, T., Rakotorahalahy, A. J., Bisanzio, D., ... Ratsimbao, A. (2016b). Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar : operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malaria Journal*, 15, 1-18. doi:10.1186/s12936-016-1556-3
- Howes, R. E., Reiner Jr., R. C., Battle, K. E., Longbottom, J., Mappin, B., Ordanovich, D., ... Hay, S. I. (2015). *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004222. doi:10.1371/journal.pntd.0004222
- Hughes, G. L., Rivero, A. et Rasgon, J. L. (2014). *Wolbachia* can enhance *Plasmodium* Infection in mosquitoes: Implications for malaria control? *PLoS Pathogens*, 10(9), 1-4. doi:10.1371/journal.ppat.1004182

## Références bibliographiques

- Ibrahim, S. S., Amvongo-Adja, N., Wondji, M. J., Irving, H., Riveron, J. M. et Wondji, C. S. (2018). Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* is exacerbated by overexpression and overactivity of the P450 CYP6AA1 across Africa. *Genes*, 9(3). doi:10.3390/genes9030140
- Ihantamalala, F. A., Rakotoarimanana, F. M. J., Ramiadantsoa, T., Rakotondramanga, J. M., Pennober, G., Rakotomanana, F., ... Wesolowski, A. (2018). Spatial and temporal dynamics of malaria in Madagascar. *Malaria Journal*, 17(58). doi:10.1186/s12936-018-2206-8
- Institut national de la statistique (INSTAT), Programme national de lutte contre le paludisme, Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et ICF International. (2016). *Madagascar : Enquête sur les indicateurs du paludisme 2016*. [kest]. Calverton, MD, USA:INSTAT, PNLP, IPM et ICF International.
- Institute of Medicine. (1991). Chapter: 7. Vector Biology, Ecology, and Control. Dans *Malaria: Obstacles and Opportunities*. Washington, D.C.:National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/1812>
- Isaacs, A. T., Jasinskiene, N., Tretiakov, M., Thiery, I., Zettor, A., Bourgooin, C. et James, A. A. (2012). Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), E1922-E1930. doi:10.1073/pnas.1207738109
- Jean Jose Nepomichene, T. N. (2017). *Biologie d'Anopheles coustani (Diptera : Culicidae) et implications dans la transmission du Plasmodium et du Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift à Madagascar*. (PhD Thesis). Université d'Antananarivo.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. et Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Joncour, G. (1956). La lutte contre le paludisme à Madagascar. *Bulletin of the World Health Organization*, 15(3-5), 711-723.
- Kang, S. Y., Battle, K. E., Gibson, H. S., Ratsimbaoa, A., Randrianarivehojosa, M., Ramboarina, S., ... Howes, R. E. (2018). Spatio-temporal mapping of Madagascar's malaria indicator survey results to assess *Plasmodium falciparum* endemicity trends between 2011 and 2016. *BMC medicine*, 16(71). doi:10.1186/s12916-018-1060-4
- Kasap, H. (1990). Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(2), 111-117. doi:10.4269/ajtmh.1990.42.111
- Kasap, M., Kasap, H., Demirhan, O. et Alptekjn, D. (1987). Development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles superpictus* under experimental conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), 241-245. doi:10.4269/ajtmh.1987.37.241
- Kaslow, D. C. (1993). Transmission-blocking immunity against malaria and other vector-borne diseases. *Current Opinion in Immunology*, 5(4), 557-565. doi:10.1016/0952-7915(93)90037-S

## Références bibliographiques

- Kent, R. J. et Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 336–342.
- Kerkhof, K., Canier, L., Kim, S., Heng, S., Sochantha, T., Sovannaroth, S., ... Durnez, L. (2015). Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in Southeast Asian pre-elimination areas. *Malaria Journal*, 14(1). doi:10.1186/s12936-015-0868-z
- Kesteman, T., Randrianarivelosia, M., Mattern, C., Raboanary, E., Pourette, D., Girond, F., ... Rogier, C. (2014). Nationwide evaluation of malaria infections, morbidity, mortality, and coverage of malaria control interventions in Madagascar. *Malaria Journal*, 13(1), 1-19. doi:10.1186/1475-2875-13-465
- Klein, T. A., Lima, J. B. P., Tada, M. S. et Miller, R. (1991). Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(4), 463-470. doi:10.4269/ajtmh.1991.45.463
- Konan, K. G., Koné, A. B., Konan, Y. L., Fofana, D., Konan, K. L., Diallo, A., ... Doannio, J. M. C. (2011). Résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes et au DDT à Tiassalékro, village de riziculture irriguée en zone sud forestière de Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 104(4), 303-306. doi:10.1007/s13149-011-0176-y
- Kramer, V. L., Gracia, R. et Colwell, A. E. (1987). An evaluation of the mosquitofish, *Gambusia affinis*, and the inland silverside, *Menidia beryllina*, as mosquito control agents in California wild rice fields. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(4), 626-632.
- Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., ... Bourgoïn, C. (2007). Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*, 75(4), 1635-1642. doi:10.1128/IAI.00864-06
- Lavazec, Catherine et Bourgoïn, C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes and Infection*, 10(8), 845-849. doi:10.1016/j.micinf.2008.05.004
- Laventure, S., Mouchey, J., Blanchy, S., Marrama, L., Rabarison, P., Andrianaivolambo, L., ... Roux, J. (1996). Le riz source de vie et de mort sur les plateaux de madagascar. *Cahiers Santé*, 6(2), 79–86.
- Le Goff, G., Randimby, F. M., Rajaonarivelo, V., Laganier, R., Léong Pock Tsy, J. M., Ceianu, C. S., ... Robert, V. (2003). *Anopheles mascarensis* de Meillon 1947, vecteur de paludisme dans le Moyen-Ouest de Madagascar ? *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 69(1-2), 57–62.
- Leach, A., Vekemans, J., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Cahill, C., Owusu-Agyei, S., ... the Clinical Trials Partnership Committee. (2011). Design of a phase III multicenter trial to evaluate the efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine in children across

## Références bibliographiques

- diverse transmission settings in Africa. *Malaria Journal*, 10(224), 1-12. doi:10.1186/1475-2875-10-224
- Lee, S.-M., Wu, C.-K., Plieskatt, J. L., Miura, K., Hickey, J. M. et King, C. R. (2017). N-Terminal Pfs230 domain produced in Baculovirus as a biological active Transmission-Blocking Vaccine candidate. *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(10). doi:10.1128/CVI.00140-17
- Léong Pock Tsy, J.-M., Duchemin, J.-B., Marrama, L., Rabarison, P., Goff, G. L., Rajaonarivelo, V. et Robert, V. (2003). Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*, 1-7.
- Lusingu, J. P., Gesase, S., Msham, S., Francis, F., Lemnge, M., Seth, M., ... Druilhe, P. (2009). Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12–24 months. *Malaria Journal*, 8(1), 163. doi:10.1186/1475-2875-8-163
- Macias, V. M., Ohm, J. R. et Rasgon, J. L. (2017). Gene drive for mosquito control : where did it come from and where are we headed? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9). doi:10.3390/ijerph14091006
- Malaria Vaccine Initiative. (2016). Fact sheet : RTS,S malaria vaccine candidate.
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., ... Saul, A. (2005). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, 23(24), 3131-3138. doi:10.1016/j.vaccine.2004.12.019
- Manoukis, N. C., Diabate, A., Abdoulaye, A., Diallo, M., Dao, A., Yaro, A. S., ... Lehmann, T. (2009). Structure and dynamics of male swarms of *Anopheles gambiae*. *Journal of medical entomology*, 46(2), 227-235.
- Marrama, L., Laventure, S., Rabarison, P. et Roux, J. (1999). *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947): vecteur principal du paludisme dans la région de Fort-Dauphin (Sud-est de Madagascar). *Entomologie Médicale*, 2018, 5–7.
- Marrama, Laurence, Rajaonarivelo, E., Laventure, S. et Rabarison, P. (1995). [*Anopheles funestus* and rice agriculture in the Madagascar highlands]. *Cahiers Santé*, 5, 415–419.
- Mathias, D. K., Plieskatt, J. L., Armistead, J. S., Bethony, J. M., Abdul-Majid, K. B., McMillan, A., ... Dinglasan, R. R. (2012). Expression, immunogenicity, histopathology, and potency of a mosquito-based malaria transmission-blocking recombinant vaccine. *Infection and Immunity*, 80(4), 1606-1614. doi:10.1128/IAI.06212-11
- Mathias, Derrick K., Jardim, J. G., Parish, L. A., Armistead, J. S., Trinh, H. V., Khumpitak, C., ... Dinglasan, R. R. (2014). Differential roles of an *Anopheline* midgut GPI-anchored protein in mediating *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* ookinete invasion. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 28, 635-647. doi:10.1016/j.meegid.2014.05.025

## Références bibliographiques

- McKenzie, F. E., Jeffery, G. M. et Collins, W. E. (2002). *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. *The Journal of parasitology*, 88(3), 521-535.
- Menard, Didier, Chan, E. R., Benedet, C., Ratsimbaoa, A., Kim, S., Chim, P., ... Zimmerman, P. A. (2013). Whole genome sequencing of field isolates reveals a common duplication of the Duffy binding protein gene in Malagasy *Plasmodium vivax* strains. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(11), e2489. doi:10.1371/journal.pntd.0002489
- Menard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbaoa, A., ... Zimmerman, P. A. (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5967-5971. doi:10.1073/pnas.0912496107
- Meraldi, V., Nebié, I., Tiono, A. B., Diallo, D., Sanogo, E., Theisen, M., ... Sirima, B. S. (2004). Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection. *Parasite Immunology*, 26(6-7), 265-272. doi:10.1111/j.0141-9838.2004.00705.x
- Mercereau-Puijalon, O. et Ménard, D. (2010). *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: A paradigm revisited. *Transfusion Clinique et Biologique*, 17(3), 176-183. doi:10.1016/j.tracli.2010.06.005
- Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F. et McGinniss, M. H. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *The New England journal of medicine*, 295(6), 302-304. doi:10.1056/NEJM197608052950602
- Miller, L. H., Mason, S. J., Dvorak, J. A., McGinniss, M. H. et Rothman, I. K. (1975). Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*, 189(4202), 561-563. doi:10.1126/science.1145213
- Mogeni, P., Williams, T. N., Omedo, I., Kimani, D., Ngoi, J. M., Mwacharo, J., ... Bejon, P. (2017). Detecting malaria hotspots: a comparison of rapid diagnostic test, microscopy, and polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(9), 1091-1098. doi:10.1093/infdis/jix321
- Mohanty, A. K., Nina, P. B., Ballav, S., Vernekar, S., Parkar, S., D'souza, M., ... Kumar, A. (2018). Susceptibility of wild and colonized *Anopheles stephensi* to *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*, 17(225). doi:10.1186/s12936-018-2343-0
- Moncunill, G., Mayor, A., Bardají, A., Puyol, L., Nhabomba, A., Barrios, D., ... Dobaño, C. (2013). Cytokine profiling in immigrants with clinical malaria after extended periods of interrupted exposure to *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 8(8). doi:10.1371/journal.pone.0073360
- Moran, J. S. et Bernard, K. W. (1989). The Spread of chloroquine-resistant malaria in Africa: Implications for tmoranravelers. *JAMA*, 262(2), 245-248. doi:10.1001/jama.1989.03430020087034
- Moreno, A. et Joyner, C. (2015). Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Current opinion in immunology*, 35, 98-106. doi:10.1016/j.coi.2015.06.008

## Références bibliographiques

- Moreno, M., Tong, C., Guzmán, M., Chuquiyaury, R., Llanos-Cuentas, A., Rodriguez, H., ... Vinetz, J. M. (2014). Infection of laboratory-colonized *Anopheles darlingi* mosquitoes by *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), 612-616. doi:10.4269/ajtmh.13-0708
- Morgan, J. C., Irving, H., Okedi, L. M., Steven, A. et Wondji, C. S. (2010). Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS ONE*, 5(7). doi:10.1371/journal.pone.0011872
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D. et Sircoulon, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*. (s. 1.):John Libbey Eurotext.
- Mouchet, J. et Blanchy, S. (1995). Particularités et stratification du paludisme à Madagascar, 386-388.
- Mouchet, J., Blanchy, S., Rakotonjanabelo, A., Ranaivoson, G., Rajaonarivelo, E., Laventure, S., ... Aknouche, F. (1993). Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*, 60(1-2), 50-59
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L. et del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(9), 555-566. doi:10.1016/S1473-3099(09)70177-X
- Nations unies « Subdivisions de Madagascar ». (2018). *Statistiques sur Madagascar*. <http://mg.one.un.org/content/unct/madagascar/fr/home/a-propos-de-madagascar/statistiques-sur-madagascar.html> Consulté le 30 juin 2018.
- Ndiath, Mamadou Ousmane, Eiglmeier, K., Olé Sangba, M. L., Holm, I., Kazanji, M. et Vernick, K. D. (2016). Composition and genetics of malaria vector populations in the Central African Republic. *Malaria Journal*, 15(387). doi:10.1186/s12936-016-1431-2
- Ndiath, Mamadou Ousmane, Cailleau, A., Orlandi-Pradines, E., Bessell, P., Pagès, F., Trape, J.-F. et Rogier, C. (2015). Emerging knock-down resistance in *Anopheles arabiensis* populations of Dakar, Senegal: first evidence of a high prevalence of kdr-e mutation in West African urban area. *Malaria Journal*, 14(364). doi:10.1186/s12936-015-0898-6
- Ndiath, Mamadou O, Cohuet, A., Gaye, A., Konate, L., Mazonot, C., Faye, O., ... Trape, J.-F. (2011). Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal*, 10(269). doi:10.1186/1475-2875-10-269
- Ndo, C., Kopya, E., Menze-Djantio, B., Toto, J. C., Awono-Ambene, P., Lycett, G. et Wondji, C. S. (2016). High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays. *Parasites & Vectors*, 9(341). doi:10.1186/s13071-016-1626-y
- Nepomichene, T. N. J. J., Raharimalala, F. N., Andriamandimby, S. F., Ravalohery, J.-P., Failloux, A.-B., Heraud, J.-M. et Boyer, S. (2018). Vector competence of *Culex antennatus* and *Anopheles coustani* mosquitoes for Rift Valley fever virus in Madagascar. *Medical and Veterinary Entomology*, 32(2), 259-262. doi:10.1111/mve.12291

## Références bibliographiques

- Nepomichene, T. N., Andrianaivolambo, L., Boyer, S. et Bourgouin, C. (2017). Efficient method for establishing F1 progeny from wild populations of *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*, 16(21), 1-8. doi:10.1186/s12936-017-1681-7
- Nepomichene, Thierry N. J. J., Tata, E. et Boyer, S. (2015 décembre). Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malaria Journal*, 14(1), 1-8. doi:10.1186/s12936-015-1004-9
- Nguyen, P. L., Vantaux, A., Hien, D. F., Dabiré, K. R., Yameogo, B. K., Gouagna, L.-C., ... Lefèvre, T. (2017). No evidence for manipulation of *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* host preference by *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*, 7(9415). doi:10.1038/s41598-017-09821-x
- Niangaly, A., Gunalan, K., Plowe, C. V., Sá, J. M., Travassos, M. A., Thera, M. A., Laurens, M. B., ... Ogobara K. Doumbo. (2017). *Plasmodium vivax* Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 744-752. doi:10.4269/ajtmh.17-0254
- Nilsson, S. K., Childs, L. M., Buckee, C. et Marti, M. (2015). Targeting human transmission biology for malaria elimination. *PLOS Pathogens*, 11(6), 1-17. doi:10.1371/journal.ppat.1004871
- Ntumngia, F. B., Thomson-Luque, R., Torres, L. de M., Gunalan, K., Carvalho, L. H. et Adams, J. H. (2016). A novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into Duffy-positive reticulocytes. *mBio*, 7(4), 1-5. doi:10.1128/mBio.01261-16
- Nunes, J. K., Woods, C., Carter, T., Raphael, T., Morin, M. J., Diallo, D., ... Birkett, A. J. (2014). Development of a transmission-blocking malaria vaccine: Progress, challenges, and the path forward. *Vaccine*, 32(43), 5531-5539. doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.030
- Nwane, P., Etang, J., Chouaïbou, M., Toto, J. C., Koffi, A., Mimpfoundi, R. et Simard, F. (2013). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasites & Vectors*, 6(41). doi:10.1186/1756-3305-6-41
- Oeuvray, C., Theisen, M., Rogier, C., Trape, J.-F., Jepsen, S. et Druilhe, P. (2000). Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infection and Immunity*, 68(5), 2617-2620.
- Okell, L. C., Bousema, T., Griffin, J. T., Ouédraogo, A. L., Ghani, A. C. et Drakeley, C. J. (2012). Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communications*, 3(1). doi:10.1038/ncomms2241
- Olé Sangba, M. L., Sidick, A., Govoetchan, R., Dide-Agossou, C., Ossè, R. A., Akogbeto, M. et Ndiath, M. O. (2017). Evidence of multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* populations in Bangui, Central African Republic. *Parasites & Vectors*, 10(23). doi:10.1186/s13071-016-1965-8
- Ouédraogo, A. L., Guelbéogo, W. M., Cohuet, A., Morlais, I., King, J. G., Gonçalves, B. P., ... Bousema, T. (2013). A protocol for membrane feeding assays to determine the

## Références bibliographiques

- infectiousness of *P. falciparum* naturally infected individuals to *Anopheles gambiae*. *MalariaWorld Journal*, 1-4(16), 4.
- Owusu-Ofori, A. K., Parry, C. et Bates, I. (2010). Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic : A review of the literature from sub-saharan Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 51(10), 1192-1198. doi:10.1086/656806
- Pang, S.-C., Andolina, C., Malleret, B., Christensen, P. R., Lam-Phua, S.-G., Razak, M. A. B. A., ... Nosten, F. (2017). Singapore's *Anopheles sinensis* Form A is susceptible to *Plasmodium vivax* isolates from the western Thailand–Myanmar border. *Malaria Journal*, 16(465). doi:10.1186/s12936-017-2114-3
- Payne, D. (1987). Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, 3(8), 241-246. doi:10.1016/0169-4758(87)90147-5
- Perkins, S. L. et Austin, C. C. (2009). Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards : integrating morphology and molecules. *Journal of Parasitology*, 95(2), 424-433. doi:10.1645/GE-1750.1
- Perraut, R., Varela, M.-L., Loucoubar, C., Niass, O., Sidibé, A., Tall, A., ... Mercereau-Puijalon, O. (2017). Serological signatures of declining exposure following intensification of integrated malaria control in two rural Senegalese communities. *PLOS ONE*, 12(6). doi:10.1371/journal.pone.0179146
- Perraut, R., Varela, M.-L., Mbengue, B., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O. et Vigan-Womas, I. (2015). Standardization of a multiplex magnetic bead-based for simultaneous detection of igG to *Plasmodium* antigens. *Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases*, 4(2), 1–8. doi:10.4172/2329-9541.1000134
- Perraut, R., Marrama, L., Diouf, B., Sokhna, C., Tall, A., Nabeth, P., ... Mercereau-Puijalon, O. (2005). Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(2), 264-271. doi:10.1086/426398
- Perraut, R., Marrama, L., Diouf, B., Fontenille, D., Tall, A., Sokhna, C., ... Mercereau-Puijalon, O. (2003). Distinct surrogate markers for protection against *Plasmodium falciparum* infection and clinical malaria identified in a Senegalese community after radical drug cure. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(12), 1940-1950. doi:10.1086/379838
- Perry, A. S. (1960). Investigations on the mechanism of DDT resistance in certain anopheline mosquitos. *Bulletin of the World Health Organization*, 22(6), 743-756 /
- Poirier, P., Doderer-Lang, C., Atchade, P. S., Lemoine, J.-P., de l'Isle, M.-L. C., Abou-bacar, A., ... Candolfi, E. (2016). The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malaria Journal*, 15(1). doi:10.1186/s12936-016-1620-z
- Pothin, E., Ferguson, N. M., Drakeley, C. J. et Ghani, A. C. (2016). Estimating malaria transmission intensity from *Plasmodium falciparum* serological data using antibody density models. *Malaria Journal*, 15(79). doi:10.1186/s12936-016-1121-0

## Références bibliographiques

- Programme national de lutte contre le paludisme. (2016). *Plan de communication pour la lutte contre le paludisme 2013-2017*.
- Rabarijaona, L. P., Ariey, F., Matra, R., Cot, S., Raharimalala, A. L., Ranaivo, L. H., ... Randrianariveolosia, M. (2006). Low autochthonous urban malaria in Antananarivo (Madagascar). *Malaria Journal*, 5(27). doi:10.1186/1475-2875-5-27
- Raharimalala, F. N. (2011). *Rôle des moustiques Culicidae, de leurs communautés microbiennes, et des réservoirs vertébrés, dans la transmission d'arbovirus à Madagascar*. . Antananarivo: Université d'Antananarivo.
- Rakotoson, J.-D., Fornadel, C. M., Belemvire, A., Norris, L. C., George, K., Caranci, A., ... Dengela, D. (2017). Insecticide resistance status of three malaria vectors, *Anopheles gambiae* (s.l.), *An. funestus* and *An. mascarensis*, from the south, central and east coasts of Madagascar. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2336-9
- Ralisoa, O. B. (1996). Biogéographie du complexe *Anopheles gambiae* de Madagascar, vecteur de paludisme. Dans *Biogéographie de Madagascar = Biogeography of Madagascar* (Lourenço W.R. éd., p. 523-534). Paris:ORSTOM.
- Ramasamy, M. S., Kulasekera, R., Wanniarachchi, I. C., Srikrishnaraj, K. A. et Ramasamy, R. (1997). Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*, with the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 11(3), 290-296. doi:10.1111/j.1365-2915.1997.tb00409.x
- Ramasamy, R., Wanniarachchi, I. C., Alagaratnam Srikrishnaraj, K. et Ramasamy, M. S. (1997). Mosquito midgut glycoproteins and recognition sites for malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1361(1), 114-122. doi:10.1016/S0925-4439(97)00020-3
- Randrianariveolosia, M., Raharimalala, L., Jambou, R., Sahondra-Harisoa, J. L., Ranaivo, S., Rakotomanana, F., ... Ariey, F. (2002). La résistance de *Plasmodium falciparum* à Madagascar. Dans *Atlas évolutif du paludisme à Madagascar* (p. 27-29). Antananarivo:Institut Pasteur de Madagascar.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J. et Collins, F. H. (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9(5), 491-497. doi:10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x
- Ratovonjato, J., Randrianariveolosia, M., Rakotondrainibe, M. E., Raharimanga, V., Andrianaivolambo, L., Le Goff, G., ... Robert, V. (2014). Entomological and parasitological impacts of indoor residual spraying with DDT, alphacypermethrin and deltamethrin in the western foothill area of Madagascar. *Malaria Journal*, 13(1), 21. doi:10.1186/1475-2875-13-21
- Ravoniharimelina, B., Romi, R. et Sabatinelli, G. (1992). Etude longitudinale sur le gîtes larvaires d'*Anopheles gambiae* s.l. dans un canton de la province d' Antananarivo (Hautes terres centrale de Madagascar). *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 67(1), 26-30.
- Razafimbelo, L. (2018). Lutte contre le paludisme : Distribution de 13 millions de moustiquaires dans 106 districts – Midi Madagasikara. [Journal]. <http://www.midi->

## Références bibliographiques

- [madagasikara.mg/societe/2018/02/20/lutte-contre-le-paludisme-distribution-de-13-millions-de-moustiquaires-dans-106-districts/](http://madagasikara.mg/societe/2018/02/20/lutte-contre-le-paludisme-distribution-de-13-millions-de-moustiquaires-dans-106-districts/) Consulté le 14 juillet 2018
- Reisen, W. K. (1989). Estimation of vectorial capacity : introduction. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, 14(9), 39-40.
- Richards, J. S., Stanistic, D. I., Fowkes, F. J. I., Tavul, L., Dabod, E., Thompson, J. K., ... Beeson, J. G. (2010). Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clinical Infectious Diseases*, 51(8), e50-e60. doi:10.1086/656413
- Rios-Velásquez, C. M., Martins-Campos, K. M., Simões, R. C., Izzo, T., dos Santos, E. V., Pessoa, F. A., ... Pimenta, P. F. (2013). Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, 12, 460. doi:10.1186/1475-2875-12-460
- Robert, V., Goff, G. L., Ariey, F. et Duchemin, B. (2002). A possible alternative method for collecting mosquito larvae in rice fields. *Malaria Journal*, 1(4).
- Robert, V. (2001). *Les vecteurs*. <http://asmt.louis.free.fr/anopheles.html#ano-hom>. Consulté le 10 juin 2018.
- Rodhain, F. (2015). Le microbe, l'insecte, l'homme et les autres... : le monde des maladies à vecteurs. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 168(1), 5. doi:10.4267/2042/56539
- Rojas, W., Botero, S., & Garcia, H. I. (2001). An integrated malaria control program with community participation on the Pacific Coast of Colombia. *Cadernos de Saúde Pública*, 17(suppl), S103-S113. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700019>
- Romero, P. (1992). Malaria vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 4, 432-441.
- Romi, R., Ravoniharimelina, B., Ramiakajato, M. et Majori, G. (1993). Field trials of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* (strain 2362) formulations against *Anopheles arabiensis* in the central highlands of Madagascar. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(3), 325-329.
- Roussilhon, C., Oeuvray, C., Müller-Graf, C., Tall, A., Rogier, C., Trape, J.-F., ... Druilhe, P. (2007). Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to Merozoite Surface Protein 3. *PLoS Medicine*, 4(11), 1791-1803. doi:10.1371/journal.pmed.0040320
- RTS,S Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*, 386(9988), 31-45. doi:10.1016/S0140-6736(15)60721-8
- Rubert, A., Guillon-Grammatico, L., Chandénier, J., Dimier-Poisson, I. et Desoubeaux, G. (2016). Résistance aux insecticides chez le moustique anophèle : des obstacles en plus dans la lutte antipaludique. *Médecine et Santé Tropicales*, 26, 423-431. doi:10.1684/mst.2016.0634

## Références bibliographiques

- Rupp, H. R. (1996). Adverse assessments of *Gambusia affinis* : an alternate view for mosquito control practitioners. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(2), 155-166.
- Russo, G., Faggioni, G., Paganotti, G. M., Djeunang Dongho, G. B., Pomponi, A., De Santis, R., ... Lista, F. R. (2017). Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon. *Malaria Journal*, 16(1). doi:10.1186/s12936-017-1722-2
- Salas, M. L., Romero, J. F., Solarte, Y., Olano, V., Herrera, M. A. et Herrera, S. (1994). Development of sporogonic cycle of *Plasmodium vivax* in experimentally infected *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 89 Suppl 2, 115-119.
- Sauboin, C. J., Van Bellinghen, L.-A., Van De Velde, N. et Van Vlaenderen, I. (2015). Potential public health impact of RTS,S malaria candidate vaccine in sub-Saharan Africa: a modelling study. *Malaria Journal*, 14(1), 1-17. doi:10.1186/s12936-015-1046-z
- Sauerwein, R. W. et Bousema, T. (2015). Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development. *Vaccine*, 33(52), 7476-7482. doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.073
- Saul, A. (2007). Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria: *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(5), 476-481. doi:10.1097/QCO.0b013e3282a95e12
- Shaw, W. R., Marcenac, P., Childs, L. M., Buckee, C. O., Baldini, F., Sawadogo, S. P., ... Catteruccia, F. (2016). *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nature Communications*, 7(11772), 1-7. doi:10.1038/ncomms11772
- Sidhu, A. B. S., Verdier-Pinard, D. et Fidock, D. A. (2002). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5591), 210-213. doi:10.1126/science.1074045
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. et Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701. doi:10.1093/aesa/87.6.651
- Sinden, R. E. et Hartley, R. H. (1985). Identification of the meiotic division of malarial parasites. *The Journal of Protozoology*, 32(4), 742-744. doi:10.1111/j.1550-7408.1985.tb03113.x
- Sinden, Robert E. (2017). Developing transmission-blocking strategies for malaria control. *PLoS Pathogens*, 13(7). doi:10.1371/journal.ppat.1006336
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., ... Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5(1), 69. doi:10.1186/1756-3305-5-69

## Références bibliographiques

- Sirima, S. B., Cousens, S. et Druilhe, P. (2011). Protection against Malaria by MSP3 Candidate Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 365(11), 1062-1064. doi:10.1056/NEJMc1100670
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Xin Ping Zhu, Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., ... Brown, K. N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(2), 315-320. doi:10.1016/0166-6851(93)90077-B
- Soe, S., Theisen, M., Roussillon, C., Aye, K.-S. et Druilhe, P. (2004). Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-kilodalton cook. *Infection and Immunity*, 72(1), 247-252. doi:10.1128/IAI.72.1.247-252.2004
- Sokhna, C., Ndiath, M. O. et Rogier, C. (2013). The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(10), 902-907. doi:10.1111/1469-0691.12314
- Soma, D. D., Kassié, D., Sanou, S., Karama, F. B., Ouari, A., Mamai, W., ... Fournet, F. (2018). Uneven malaria transmission in geographically distinct districts of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, 11(296). doi:10.1186/s13071-018-2857-x
- Spillings, B. L., Brooke, B. D., Koekemoer, L. L., Chiphwanya, J., Coetzee, M. et Hunt, R. H. (2009). A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, a major malaria vector in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(3), 510-515. doi:10.4269/ajtmh.2009.81.510
- Stone, W. J. R., Campo, J. J., Ouédraogo, A. L., Meerstein-Kessel, L., Morlais, I., Da, D., ... Jore, M. M. (2018). Unravelling the immune signature of *Plasmodium falciparum* transmission-reducing immunity. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-017-02646-2
- Stone, W. J. R., Churcher, T. S., Graumans, W., van Gemert, G.-J., Vos, M. W., Lanke, K. H. W., ... Bousema, T. (2014). A scalable assessment of *Plasmodium falciparum* transmission in the Standard Membrane-Feeding Assay, using transgenic parasites expressing Green Fluorescent Protein–Luciferase. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(9), 1456-1463. doi:10.1093/infdis/jiu271
- Sturm, A., Amino, R., Sand, C. van de, Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., ... Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313(5791), 1287-1290. doi:10.1126/science.1129720
- Su, X. et Miller, L. H. (2015). The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China. Life sciences*, 58(11), 1175-1179. doi:10.1007/s11427-015-4948-7
- Subdivisions de Madagascar. (2018, 20 février). Dans *Wikipédia*. [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Subdivisions\\_de\\_Madagascar&oldid=145687614](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Subdivisions_de_Madagascar&oldid=145687614) Consulté le 30 juin 2018

## Références bibliographiques

- Tadesse, F. G., Slater, H. C., Chali, W., Teelen, K., Lanke, K., Belachew, M., ... Bousema, T. (2018). The relative contribution of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections to the infectious reservoir in a low-endemic setting in Ethiopia. *Clinical Infectious Diseases*, 66(12), 1883-1891. doi:10.1093/cid/cix1123
- Tantely, M. L., Le Goff, G., Boyer, S. et Fontenille, D. (2016). An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite*, 23(20), 1-42. doi:10.1051/parasite/2016018
- Tchioffo, M. T., Abate, L., Boissière, A., Nsango, S. E., Gimonneau, G., Berry, A., ... Morlais, I. (2016a). An epidemiologically successful Escherichia coli sequence type modulates *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito midgut. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 43, 22-30. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.002
- Tchioffo, M. T., Boissière, A., Abate, L., Nsango, S. E., Bayibéki, A. N., Awono-Ambéné, P. H., ... Morlais, I. (2016b). Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Frontiers in Microbiology*, 6(1500), 1-9. doi:10.3389/fmicb.2015.01500
- Tchioffo, M. T., Boissière, A., Churcher, T. S., Abate, L., Gimonneau, G., Nsango, S. E., ... Morlais, I. (2013). Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS ONE*, 8(12), 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0081663
- Theisen, M., Jore, M. M. et Sauerwein, R. (2017). Towards clinical development of a Pf s48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 16(4), 329-336. doi:10.1080/14760584.2017.1276833
- Thera, M. A., Doumbo, O. K., Coulibaly, D., Laurens, M. B., Kone, A. K., Guindo, A. B., ... Plowe, C. V. (2010). Safety and Immunogenicity of an AMA1 Malaria Vaccine in Malian Children: Results of a Phase 1 Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE*, 5(2). doi:10.1371/journal.pone.0009041
- Thomsen, E. K., Koimbu, G., Pulford, J., Jamea-Maiasa, S., Ura, Y., Keven, J. B., ... Reimer, L. J. (2017). Mosquito Behavior Change After Distribution of Bednets Results in Decreased Protection Against Malaria Exposure. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(5), 790-797. doi:10.1093/infdis/jiw615
- Uneke, C. J. (2011). Congenital malaria : an overview. *Tanzania Journal of Health Research*, 13(3), 1-18. doi:10.4314/thrb.v13i3.67615
- United nations, Department of economic and social affairs, population division. (2017). *World Population Prospects: The 2017 Revision, custom data acquired via website*. <https://esa.un.org/unpd/wpp/DataQuery/> Consulté le 30 juillet 2018
- Vallejo, A. F., Rubiano, K., Amado, A., Krystosik, A. R., Herrera, S. et Arévalo-Herrera, M. (2016). Optimization of a Membrane Feeding Assay for *Plasmodium vivax* Infection in *Anopheles albimanus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), 1-14. doi:10.1371/journal.pntd.0004807

## Références bibliographiques

- Verra, F., Angheben, A., Martello, E., Giorli, G., Perandin, F. et Bisoffi, Z. (2018). A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malaria Journal*, 17(36), 1-14. doi:10.1186/s12936-018-2181-0
- Vigan-Womas, I., Lokossou, A., Guillotte, M., Juillerat, A., Bentley, G., Garcia, A., ... Migot-Nabias, F. (2010). The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malaria Journal*, 9(1), 267. doi:10.1186/1475-2875-9-267
- Walker, T. et Moreira, L. A. (2011). Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(suppl 1), 212-217. doi:10.1590/S0074-02762011000900026
- Walton, W. E. (2007). Larvivorous fish including *Gambusia*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 184-220. doi:10.2987/8756-971X(2007)23[184:LFIG]2.0.CO;2
- Wampfler, R., Mwingira, F., Javati, S., Robinson, L., Betuela, I., Siba, P., ... Felger, I. (2013). Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes. *PLoS ONE*, 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0076316
- Wanjala, C. L., Mbugi, J. P., Ototo, E., Gesuge, M., Afrane, Y. A., Atieli, H. E., ... Yan, G. (2015). Pyrethroid and DDT resistance and organophosphate susceptibility among *Anopheles* spp. mosquitoes, Western Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), 2178-2181. doi:10.3201/eid2112.150814
- Wellems, T. E. et Plowe, C. V. (2001). Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 770-776.
- White, M. T., Griffin, J. T., Akpogheneta, O., Conway, D. J., Koram, K. A., Riley, E. M. et Ghani, A. C. (2014). Dynamics of the antibody response to *Plasmodium falciparum* infection in african children. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(7), 1115-1122. doi:10.1093/infdis/jiu219
- WHO. (2018a). First malaria vaccine in Africa: A potential new tool for child health and improved malaria control. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272456/WHO-CDS-GMP-2018.05-eng.pdf?ua=1> Consulté le 20 juin 2018
- WHO. (2018b). *WHO | Overview of malaria treatment*. <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/> Consulté le 28 juin 2018.
- WHO. (2017). *World malaria report 2017*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- WHO. (2012). *WHO evidence review group: the safety and effectiveness of single dose primaquine as a P. falciparum gametocytocide*. Malaria Policy Advisory Committee Meeting, Session 5. Bangkok, Thailand:World Health Organization.
- WHO. (2014). *Module de formation à la lutte contre le paludisme : Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle. Guide du participant*. . Geneva:World Health Organization. ISBN 978 92 4 250581 8

## Références bibliographiques

- WHO. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria. Third Edition*. Geneva:World Health Organization. ISBN 978 92 4 154912 7
- Wijesundera, M. D., Peiris, J. S., Ariyaratne, Y. G., Verdini, A. S., Pessi, A. et Del Giudice, G. (1990). Antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites following a malarial outbreak in a non-endemic area of Sri Lanka. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), 35-39.
- Williams, J. et Pinto, J. (2012). *Manuel de formation à l'entomologie du paludisme. A l'intention des techniciens en entomologie et lutte anti-vectorielle (Niveau de base)*. RTI International. 2 vol.
- Williamson, K. C. (2003). Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunology*, 25(7), 351-359. doi:10.1046/j.1365-3024.2003.00643.x
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O. et Kaslow, D. C. (1995). Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75(1), 33-42. doi:10.1016/0166-6851(95)02507-3
- Wirtz, R. A., Zavala, F., Charoenvit, Y., Campbell, G. H., Burkot, T. R., Schneider, I., ... Andre, R. G. (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organization*, 65(1), 39-45.
- Wirtz, R., Burkot, T. R., Andre, R. G., Rosenberg, R., Collins, W. E. et Roberts, D. R. (1985). Identification of *Plasmodium Vivax* Sporozoites in Mosquitoes using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6), 1048-1054. doi:10.4269/ajtmh.1985.34.1048
- Woldearegai, T. G., Kremsner, P. G., Kun, J. F. J. et Mordmüller, B. (2013). *Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(5), 328-331. doi:10.1093/trstmh/trt016
- Wondji, C. S., Coleman, M., Kleinschmidt, I., Mzilahowa, T., Irving, H., Ndula, M., ... Hemingway, J. (2012). Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19063-19070. doi:10.1073/pnas.1217229109
- Wondji, C. S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N. F., Collins, F. H., Hunt, R. H., ... Ranson, H. (2009). Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 19, 452-459. doi:10.1101/gr.087916.108
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., ... Durbin, A. P. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE*, 3(7). doi:10.1371/journal.pone.0002636
- Yaro, J.-B. B. (2008). *Quel est l'intérêt de connaître les faciès épidémiologiques du paludi...* Actes du colloque 6e édition du Cours international « Atelier Paludisme ». Santé & Médecine, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo.

## Références bibliographiques

- Zahar, A. R., Control, W. H. O. D. of V. B. and et Programme, W. H. O. M. A. (1985). Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria. Part I: The WHO African region & the Southern WHO eastern mediterranean region. Section III: Vector bionomics, malaria epidemiology and control by geographycal areas, *VBC/85.3-MAP/85.3*, 244.
- Zhu, G., Xia, H., Zhou, H., Li, J., Lu, F., Liu, Y., ... Sattabongkot, J. (2013). Susceptibility of *Anopheles sinensis* to *Plasmodium vivax* in malarial outbreak areas of central China. *Parasites & Vectors*, 6(1), 176. doi:10.1186/1756-3305-6-176
- Zimmerman, P. A. (2017). *Plasmodium vivax* infection in Duffy-negative people in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 636-638. doi:10.4269/ajtmh.17-0461.
- Zohdy, S., Derfus, K., Headrick, E. G., Andrianjafy, M. T., Wright, P. C. et Gillespie, T. R. (2016). Small-scale land-use variability affects *Anopheles* spp. distribution and concomitant *Plasmodium* infection in humans and mosquito vectors in southeastern Madagascar. *Malaria Journal*, 15(114). doi:10.1186/s12936-016-1164-2
- Zollner, G. E., Ponsa, N., Garman, G. W., Poudel, S., Bell, J. A., Sattabongkot, J., ... Vaughan, J. A. (2006). Population dynamics of sporogony for *Plasmodium vivax* parasites from western Thailand developing within three species of colonized *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*, 5(68). doi:10.1186/1475-2875-5-68.



## Annexe 1

Accord N° 122-MSANP/CE-2015 du Comité d'éthique de Madagascar

REPOBLIKAN'I MADAGASIKARA  
Fitiavana-Tanindrazana-Fandrosoana

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE

COMITE D'ETHIQUE

N° 122-MSANP/CE

### AUTORISATION

Après consultation et avis favorable du Comité d'Ethique auprès du Ministère de la Santé Publique, Dr Ousmane NDIATH, chef du Projet G4-Entomologie Institut Pasteur de Madagascar est autorisé à effectuer la recherche intitulée : « **Mesure de la transmission des Plasmodium humains (falciparum, vivax et ovale) de l'homme aux moustiques** », Protocole version du 27 Octobre 2015.

Antananarivo, le 17 NOV 2015

LE MINISTRE  
DE LA SANTE PUBLIQUE  
PAR DELEGATION  
LE SECRETAIRE GENERAL

*Dr. Danoela RANDRIANTSIMANIRY*  
*Medecin de Santé Publique*

## Annexe 2

Accords N°141-MSANP/CE-2014 Comité d'éthique de Madagascar

REPOBLIKAN'I MADAGASIKARA  
Fitiavana-Tanindrazana-Fandrosoana  
-----

MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
-----

COMITE D'ETHIQUE  
-----

N° 141 - MSANP/CE

### AUTORISATION

Après consultation et avis favorable du Comité d'Ethique auprès du Ministère de la Santé Publique, Docteur Inès VIGAN-WOMAS est autorisée à effectuer la recherche intitulée : «**Le paludisme à Plasmodium vivax à Madagascar : caractérisation phénotypique, fonctionnelle et immunologique des nouvelles voies d'invasion des globules rouge Duffy-négatifs**».

Antananarivo, le 10 DEC 2014

Le Ministre de la Santé Publique

  
Dr KOLO Roger

## Annexe 3

### Consentement éclairé : document d'information, version française

<p style="text-align: center;"><b>Formulaire de consentement éclairé</b> <b>Document d'information au niveau des centres de santé et de la communauté</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Mesure de la transmission des <i>Plasmodium</i> humains (<i>P. falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> et <i>P. ovale</i>) de l'homme aux moustiques</b></p> <p><b>1. OBJECTIF DE LA RECHERCHE</b> L'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) avec les Instituts Pasteur Associés vont réaliser une étude sur le paludisme. Nous souhaitons connaître la compétence vectorielle des principaux vecteurs du paludisme de la région. Nos résultats vont servir à la communauté scientifique et au Ministère de la Santé pour améliorer la lutte contre le paludisme à Madagascar.</p> <p><b>2. QU'ALLONS-NOUS FAIRE?</b> Nous allons demander aux patients consultants au niveau du CSB et aux villageois plus particulièrement les élèves de participer à cette étude s'ils sont intéressés. Si vous acceptez de participer, nous allons vous poser quelques questions pendant environ 10 minutes. Nous allons également prendre votre température. Nous allons réaliser le test de goutte épaisse (GE) du paludisme. Si le GE est positif, nous allons vous traiter gratuitement tel qu'il est recommandé par le Ministère de la Santé. Cependant si vous avez la forme infectante (c'est-à-dire les gamétocytes), nous vous demandons de faire le prélèvement sanguin.</p> <p><b>3. PRELEVEMENT SANGUIN</b> Si vous êtes d'accord, nous allons vous faire un prélèvement veineux entre 5 et 10 ml. Votre nom ne sera pas marqué sur les prélèvements. Ces prélèvements ne seront pas vendus mais serviront à gorger les moustiques devant vous.</p> <p><b>4. BENEFICE DE LA PARTICIPATION A L'ETUDE</b> En cas de GE positifs, vous serez pris en charge et traités gratuitement. Les résultats de cette étude nous permettront d'améliorer la lutte contre le paludisme à Madagascar.</p> <p><b>5. RISQUE LORS DE LA PARTICIPATION A L'ETUDE</b> Des ecchymoses ou une faible douleur peuvent apparaître au niveau du point de prélèvement. Il y a également une probabilité faible qu'une infection se développe au niveau du point de la piqure. Nous allons tout mettre en œuvre afin d'éviter ces infections.</p> <p><b>6. CONFIDENTIALITE</b> Votre identité et les réponses aux questions que nous allons vous donner resteront confidentielles. Un encodage unique vous sera décerné, qui apparaîtra sur notre base de données. Ces codes seront également marqués sur vos prélèvements. Seules les équipes de recherche auront accès à notre base de données. Votre nom ne sera pas utilisé quand nous ferons nos analyses et n'apparaîtra pas dans nos rapports.</p> <p><b>7. DROIT D'ACCEPTER, DE REFUSER DE PARTICIPER OU DE SE RETIRER DE L'ETUDE</b> Vous êtes entièrement libre de participer à l'étude. Si vous choisissez de ne pas participer à l'étude, il n'y aura pas de conséquences négatives. Si vous changez d'avis, vous êtes également libre de vous retirer de la participation à cette étude à tout moment.</p>	<p><b>8. COUT ET COMPENSATION POUR LA PARTICIPATION A L'ETUDE</b> Aucun coût ne vous sera demandé pour participer à cette étude. Nous vous assurons que vous recevrez le traitement adéquat contre le paludisme selon la Politique Nationale en vigueur à Madagascar si vous avez le paludisme.</p> <p><b>9. CONTACT SI VOUS AVEZ DES QUESTIONS</b> Prenez le temps nécessaire pour lire ce document d'information. Si vous avez des questions concernant cette étude, ou si ultérieurement vous pensez que cette étude vous a porté préjudice, vous pouvez nous interroger ou entrer en contact avec le Dr. Ousmane NDIATH qui est basé à l'Institut Pasteur de Madagascar à Antananarivo Tel : 020 22 412 74, Fax : 020 22 415 34.</p> <p>Ce protocole a été revu par le Comité d'Ethique du Ministère de la Santé de Madagascar. Ce comité veille à ce que les sujets participant à cette étude n'aient pas de préjudices. Tout au long de l'étude, nous appliquerons et respectons les recommandations éthiques nationales et internationales relatives à la recherche sur « l'humain ». Si vous avez des questions sur vos droits en tant que sujet participant à cette étude, vous pouvez entrer en contact avec les membres de ce comité d'éthique au Tel : 020 22 365 22.</p> <p>Je soussigné(e), Dr. _____ m'engage à faire respecter les termes de cette autorisation parentale et atteste pleinement que le(s) titulaire(s) de l'autorité parentale a/ont exprimé pour cette recherche sa/leur non opposition.</p> <p>Fait à _____ Signature : _____</p> <p>Date : _____</p> <p>Votre signature ou votre empreinte digitale ci-dessous signifie que vous avez accepté volontairement de participer à ce projet de recherche.</p> <p>.....</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;"><b>Présente étude: Les informations ci-dessus m'ont bien été expliquées et j'accepte de participer à cette étude.</b> J'ai bien compris que je suis (ou que mon enfant est) libre de participer ou de dire "NON" à cette étude et cela ne m'impactera aucunement. J'accepte aussi qu'une goutte épaisse du paludisme et que des prélèvements sanguins soient effectués pour les infections artificielles sur le terrain.</td> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Si vous acceptez de participer à l'étude, entourez le "OUI", sinon, entourez le "NON".</td> </tr> <tr> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">OUI</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: center;">NON</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 20%;"><b>Enfant</b></td> <td colspan="3"><b>Nom/Prénom:</b></td> </tr> <tr> <td><b>Parent / tuteur qui signe le consentement</b></td> <td><b>Nom/Prénom:</b></td> <td><b>Signature (ou empreinte digitale) :</b></td> <td><b>Date:</b></td> </tr> </table>	<b>Présente étude: Les informations ci-dessus m'ont bien été expliquées et j'accepte de participer à cette étude.</b> J'ai bien compris que je suis (ou que mon enfant est) libre de participer ou de dire "NON" à cette étude et cela ne m'impactera aucunement. J'accepte aussi qu'une goutte épaisse du paludisme et que des prélèvements sanguins soient effectués pour les infections artificielles sur le terrain.		Si vous acceptez de participer à l'étude, entourez le "OUI", sinon, entourez le "NON".			OUI		NON	<b>Enfant</b>	<b>Nom/Prénom:</b>			<b>Parent / tuteur qui signe le consentement</b>	<b>Nom/Prénom:</b>	<b>Signature (ou empreinte digitale) :</b>	<b>Date:</b>
<b>Présente étude: Les informations ci-dessus m'ont bien été expliquées et j'accepte de participer à cette étude.</b> J'ai bien compris que je suis (ou que mon enfant est) libre de participer ou de dire "NON" à cette étude et cela ne m'impactera aucunement. J'accepte aussi qu'une goutte épaisse du paludisme et que des prélèvements sanguins soient effectués pour les infections artificielles sur le terrain.		Si vous acceptez de participer à l'étude, entourez le "OUI", sinon, entourez le "NON".															
	OUI		NON														
<b>Enfant</b>	<b>Nom/Prénom:</b>																
<b>Parent / tuteur qui signe le consentement</b>	<b>Nom/Prénom:</b>	<b>Signature (ou empreinte digitale) :</b>	<b>Date:</b>														

## Consentement éclairé : document d'information, version malgache

### Taratasy fanekena mazava Tahirin-kevitra ho fampahafantarana eny anivon'ny tobim-pahasalamana

**Fandrefesana ny fifindran'ny otrik'aretina mahatonga tazomoka avy amin'ny olona mankany amin'ny moka.**

**1. TANJON NY FIKAROHANA**

Ny « Institut Pasteur de Madagascar » na « IPM » miaraka amin'ireo « Instituts Pasteurs » mpiara-miasa aminy dia hanatanteraka fikarohana momba ny Tazomoka. Ny Tanjona dia ny ahafantarana ny « competence vectorielle » na raha adika amin'ny fomba tsotra ny fahaiza-mamindran' ireo moka ny otrik'aretina mahatonga tazomoka eto amin'ity faritra ity. Ny vokatr' ity fikarohana ity dia hampiasain' ireo seha-pikarohana samihafa sy ny Ministeran' ny fahasalamana mba hanatsarana ny ady amin'ny tazomoka eto Madagasikara.

**2. NY ZAVATRA HATAONAY**

Izahay dia hangataka fandraisana anjara amin'ity fikarohana ity avy amin'ireo marary manatona ny « CSB », ny mpoina ary indrindra ireo mpianatra raha ohatra ka mahaliana azy ireo izany. Raha manaiky ny handray anjara ianao dia hametraka fanontaniana vitsivitsy mandritra ny 10 minitra eo ho eo aminao izahay. Haka ny mari-pananao koa izahay ary avy eo dia hitsirika ny otrik'aretina mahatonga ny tazomoka ao anatin'ny ranao. Amin'ny ahalaalan'ny fangalana ra in-dray mitete eo amin'ny lohan'ny rantsantananao no anaovanay izany. Raha toa ka ahitana otrik'aretina mahatonga ny tazomoka ny ranao dia omenay fitsaboana maimaim-poana araka ny torolalana avy amin'ny Ministeran' ny fahasalamana ianao. Na izany aza, raha misy ny otrik'aretina mahatonga tazomoka mety mifindra any amin'ny moka ny ranao dia hangataka anao raha afaka maka ny ranao izahay.

**3. FANGALANA RA**

Raha manaiky ianao, dia haka ny ranao izahay ka eo amin'ny dimy (5) ka hatramin'ny folo (10) mililitatra eo no alainay. Ny anaranao dia tsy hisoratra eo amin' ny "tube" izay misy ny ra avy nalaina taminao. Ny ra nalaina taminao dia tsy ho amidy fa omena ireo moka ary hatao eo imasonao izany.

**4. TOMBONY AZO AMIN'NY FANDRAISANA ANJARA AMIN'ITY FIKAROHANA ITY**

Raha hita fa voan'ny tazomoka ianao dia hahazo fitsaboana maimaim-poana amin'izany. Ny vokatra azo avy amin'ity fikarohana ity dia ahafahantsika manatsara ny ady amin'ny tazomoka eto Madagasikara.

**5. VOKA-DRATSY METY HO AZO AMIN'NY FANDRAISANA ANJARA AMIN'ITY FIKAROHANA ITY**

Mety hisy fanaintainana kely mety hitranga eo amin'ilay faritra hangalana ra. Mety hisy koa "infection" kely hiforona eo amin'ilay faritra hangalana ra. Izahay dia hampiasa ny fomba rehetra mba hisorohana izany.

**6. TSIAMBARATELO**

Ny mombanao sy ny valim-panontaniana nomenao anay dia hijanona ho tsiambaratelo. Hisy solon' anarana tokana omena anao, solon' anarana izay ho hita ao amin'ny firaketana an-tsoratra ny vokatra azonay. Io solon' anarana io koa dia ho hita eo amin'ny "tube" misy ny ra nalaina taminao. Ireo olona miasa amin'ity fikarohana ity ihany no afaka mijery ny firaketana an-tsoratra ny vokatra azo avy amin'ity fikarohana ity. Ny anaranao dia tsy hamplaisaina rehefa hanao ny famakafakana ny vokatra azo izahay ary tsy hiseho any amin'ny tatitra izay hataonay.

**7. ZO HANAIKY HANDRAY ANJARA, HANDA TSY HANDRAY ANJARA NA HIALA AMIN'NY FANDRAISANA ANJARA AMIN'ITY FIKAROHANA ITY**

Ianao dia manana fahalalhana tanteraka handray anjara amin'ity fikarohana ity. Raha toa ka misafidy ny tsy handray anjara amin'ity fikarohana ity ianao dia tsy ho hisy arakaraka izany. Raha toa ka mandritra ny fandraisanao anjara amin'ity fikarohana ity ianao no miova hevitra tsy handray anjara intsony dia malalaka tanteraka ianao hiala tsy handray anjara amin'ity fikarohana ity.

**8. SARANY SY TAMBINY AZO RAHA MANDRAY ANJARA AMIN'ITY FIKAROHANA ITY**

Tsy hisy sarany hotakina aminao raha toa ka mandray anjara amin'ity fikarohana ity ianao. Izahay dia manome toky anao fa hahazo fitsaboana amin'ny tazomoka mifandraika amin'ny politika nasionaly mihatra eto Madagasikara ianao raha toa ka voan'ny tazomoka.

**9. FIFANDRAISANA RAHA MISY FANONTANIANA**

Makà fotoana hamakiana tsara ireo rehatra voasoratra etsy ambony ireo. Raha ohatra ka misy ny fanontaniana momba ity fikarohana ity, na koa mieritreritra ianao fa niteraka voka-dratsy teo aminao ity fikarohana ity dia afaka manontany anay ianao na mifandray amin'ity olona manaraka ity : Dr Osmane Ndiath Institut Pasteur de Madagascar Antananarivo Tel : 020 22 412 74, Fax : 020 22 415 34.

Ity fomba fiasa ity dia nandalo teo anatrehan'ny komitin'ny "éthique"-n'ny Ministeran'ny Fahasalamana eto Madagasikara. Io komity io dia miahay mba tsy hiteraka voka-dratsy amin'ireo olona mpandray anjara ity fikarohana ity. Mandritra ity fikarohana ity, ireo tolo-kevitra nasionaly ary iraisam-pirenena momba ny "éthique" mifandraika amin'ny fikarohana mamplasa olona dia hohajaina ary ho hampiharina avokoa. Raha manana fanontaniana momba ny zo anananao ianao amin'ny maha-mpandray anjara anao amin'ity fikarohana ity dia afaka miantso ireo mpikambana ao anatin'io komitin'ny "éthique" io amin'ity laharana ity Tel : 202 22 365 22.

Izaho, Dr \_\_\_\_\_ dia manaiky ny hampihatra ny fepetra voarakitra ato amin'ity fahazoan-dalana avy amin'ny ray aman-dreny ity ary manamafy tanteraka fa ny mpiantoka na ireo ray aman-dreny dia naneho na maneho tsy fanoherana amin'ity fikarohana ity.

Natao teto: \_\_\_\_\_ Sonia:  
Daty : \_\_\_\_\_

Ny Sonianao na ny lavotondro napetrakao etsy ambany dia manambara fa nanaiky handray anjara an-tsitrapo amin'ity asa fikarohana ity ianao.

Fikarohana : Ireo zavatra rehetra voalaza etsy ambony dia nohazavaina tsara tamiko ary manaiky ny handray anjara amin'ity fikarohana ity. Azoko tsara fa izaho (na ny zanako dia) malalaka ny handray anjara na handa tsy handray anjara tsy misy arakaraka amin'ity fikarohana ity. Manaiky koa fa hakana ra indray mitete hijerena ny otrik'aretina mahatonga ny tazomoka ary hakana ra (5 hatramin'ny 10 mililitatra) omena ireo moka izay atao eo imasoko.	Raha toa ka manaiky ny handray anjara amin'ny fanadihadiana ianao, dia asio boribory ny "ENY". Raha toa kosa tsy manaiky ny handray anjara ianao, dia asio boribory eo amin'ny "TSIA"												
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;"></td> <td style="width: 50%;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">ENY</td> <td style="text-align: center;">TSIA</td> </tr> </table>			ENY	TSIA								
ENY	TSIA												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;"><b>Zanaka</b></td> <td colspan="3"><b>Anarana/Fanampiny:</b></td> </tr> <tr> <td style="width: 25%;"><b>Ray aman-dreny na mpiantoka</b></td> <td style="width: 25%;"><b>Anarana/Fanampiny :</b></td> <td style="width: 25%;"><b>Sonia na lavo-tondro:</b></td> <td style="width: 25%;"><b>Daty:</b></td> </tr> <tr> <td style="height: 40px;"></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	<b>Zanaka</b>	<b>Anarana/Fanampiny:</b>			<b>Ray aman-dreny na mpiantoka</b>	<b>Anarana/Fanampiny :</b>	<b>Sonia na lavo-tondro:</b>	<b>Daty:</b>					
<b>Zanaka</b>	<b>Anarana/Fanampiny:</b>												
<b>Ray aman-dreny na mpiantoka</b>	<b>Anarana/Fanampiny :</b>	<b>Sonia na lavo-tondro:</b>	<b>Daty:</b>										



## Annexe 4

### Consentement pour prélèvement veineux. Versions française (page à gauche) et malgache (page à droite).

Formulaire de consentement éclairé pour le prélèvement veineux				Taratasy fanekena mazava momba ny fakana ra			
<b>Mesure de la transmission des Plasmodium humains (<i>P. falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> et ovale) de l'homme aux moustiques</b>				<b>Fandrefesana ny fifindran'ny otrik'aretina mahatonga tazomoka avy amin'ny olona mankany amin'ny moka.</b>			
<p>Je certifie que l'équipe d'enquête de l'Institut Pasteur de Madagascar m'a proposé (ou a proposé à mon enfant) de participer à une enquête de santé dont j'ai lu l'information ci-jointe ou dont la lecture m'a été faite. J'ai été informé(e) des objectifs de cette étude et de ses conditions de réalisation, ainsi que des bénéfices et inconvénients qu'elle comporte. En particulier, j'ai été informé que si la goutte épaisse confirme la forme infectante de <i>Plasmodium</i>, l'infirmier ou le technicien de laboratoire me prélèvera du sang veineux si j'accepte. J'ai donné librement mon consentement à ma participation (la participation de mon enfant) à cette étude sans préjudice d'aucune sorte. J'ai été informé que si je décide de ne pas participer, il n'y aura aucun changement dans les soins que je recevrai. J'ai obtenu la garantie que toutes les informations que je communiquerai resteront strictement confidentielles et qu'aucune information permettant de m'identifier ne sera divulguée à qui que ce soit en dehors de cette enquête. En conséquence, j'accepte de participer (ou j'accepte que mon enfant) participe à l'étude.</p> <p>Les échantillons seront conservés à l'IPM pendant 10 ans afin de faire des recherches sur le paludisme.</p>				<p>Izaho dia manamarina fa ny mpanao fanadihadiana avy ao amin'ny Institut Pasteur de Madagascar dia nanolo-kevitra ahy (na nanolo-kevitra ny zanako) mba handray anjara amin'ity fanadihadiana momban'ny fahasalamana ity ary novakiaiko na novakina tamiko ny taratasy fampahafantarana ny mombamomba ity fikarohana ity. Nampahafantarina ahy ny tanjon'ity fikarohanana ity, ireo fepetra hanatanterahana izany fikarohana izany ary ny tombony sy mety ho voka-dratsy ho azo raha mandray anjara amin'izany aho. Nampahafantarina ahy manokana fa raha toa ka ahitana otrik'aretina mahatonga tazomoka ilay ra in-drainy mitete nalaina tamiko dia hisy mpitsabo mpanampy na teknisiana iray haka ny rako eo amin'ny 5 hatramin'ny 10 mililitatra eo raha ohatra ka manaiky aho. An-tsitrapo no nanekeko handray anjara (namelako ny zanako handray anjara) amin'ity fikarohana ity ary tsy endrika faneriterena. Nampahafantarina ahy fa raha manapa-kevitra ny tsy handray anjara amin'ity fikarohana ity aho dia tsy hisy fiantraikany amin'izay fitsaboana tokony ho azoko izany. Nahazo toky aho fa ny momban'ny zavatra rehetra izay omeko eto dia hijanona ho tsiambaratelo tanteraka ary tsy hisy amin'ny mombamomba ahy hivoaka ivelan'ity fanadihadiana ity. Noho izany, Manaiky ny handray anjara (na manaiky ny hampandray anjara ny zanako) amin'ity fikarohana ity aho.]</p> <p>Ireo vokatra rehetra azo amin'ity fikarohana ity dia ho tehirizina any amin'ny Institut Pasteur de Madagascar mandritra ny folo taona ahafahana manao fikarohana momban'ny tazomoka.</p>			
<p><b>Présente étude: Les informations ci-dessus m'ont bien été expliquées et j'accepte de participer à cette étude.</b> J'ai bien compris que je suis (que mon enfant est) libre de participer ou de dire "NON" à cette étude et cela ne m'impactera aucunement. J'accepte d'effectuer un prélèvement sanguin pour les infections artificielles sur le terrain.</p>				<p>Si vous acceptez de participer à l'étude, entourez le "OUI", sinon, entourez le "NON".</p>			
				OUI			
				NON			
<b>Enfant</b>	<b>Nom/Prénom:</b>						
<b>Parent / tuteur qui signe le consentement</b>	<b>Nom/Prénom:</b>	<b>Signature (ou empreinte digitale):</b>	<b>Date:</b>				
<b>Coordonnées GPS</b>		<b>Antécédents</b>					
				<p><b>Fikarohana :</b> Ireo zavatra rehetra voalaza etsy ambony dia nohazavaina tsara tamiko ary manaiky ny handray anjara amin'ity fikarohana ity aho. Azoko tsara fa izaho (na ny zanako dia) dia afaka ny handray anjara na handa tsy handray anjara tsy misy arakara amin'ity fikarohana ity. Manaiky koa aho fa hakana ra in-drainy mitete hijerena ny otrik'aretina mahatonga ny tazomoka ary hakana ra (5 hatramin'ny 10 mililitatra) omena ireo moka izay atao eo imasoko.</p>			
				<p>Raha toa ka manaiky ny handray anjara amin'ny fanadihadiana ianao, dia asio boribory ny "ENY". Raha toa kosa tsy manaiky ny handray anjara ianao, dia asio boribory eo amin'ny "TSIA"</p>			
				ENY	TSIA		
<b>Zanaka</b>	<b>Anarana/Fanampiny:</b>						
<b>Ray aman-dreny na mpiantoka</b>	<b>Anarana/Fanampiny :</b>	<b>Sonia na lavo-tondro:</b>	<b>Daty:</b>				
<b>Coodonnées GPS</b>		<b>Zavanitranga teo aloha</b>					



### Articles en cours de soumission

Goupeyou-Youmsi J. M., Rakotondranaivo T., Andriamiarimanana M. R., Rasoloharimanana T., Puchot N., Rakotoarison R. L., Rakotomalala E., Girod R., Bourgouin C., Ndiath O. and Vigan-Womas I. (2018). **Similar human malaria prevalence but different contribution of malaria vectors in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar?** *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

Goupeyou-Youmsi J. M., Tantely L. and Bourgouin C. (2018). ***Anopheles mascarensis*, an endemic malaria vector of Madagascar: a species in evolution or a complex of sibling species?** *Malaria Journal*.

### Articles en préparation

Goupeyou-Youmsi J. M., J. J. Nepomichene T. N., Tchioffo Tsapi M., Boyer S., Girod R., Randrianarivejosia M., Vigan-Womas I., Ndiath O. and Bourgouin C. **Establishment of the first experimental field site in Madagascar for studying *Anopheles* competency to transmit *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*.**

Goupeyou-Youmsi J. M., Tchioffo Tsapi M., Puchot Nicolas, Ndiath O. and Bourgouin Catherine. **Susceptibility of wild and colony populations of *Anopheles arabiensis* in the northwest of Madagascar.**

### Communications

Goupeyou-Youmsi J.M., Rakotondranaivo T., Andriamiarimanana M. R., Rasoloharimanana T., Puchot N., Rakotoarison R. L., Rakotomalala E., Girod R., Bourgouin C., Ndiath O. and Vigan-Womas I. **Epidemiology of malaria transmission in two neighbouring villages in the rural commune of Andriba, Madagascar.** Journées Boris Ephrussi, Ecole doctorale Complexité du Vivant. 14-15/06/2018. Paris, France. Présentation orale.

Goupeyou-Youmsi J.M., Jean Jose Nepomichene T.N., Tchioffo Tsapi M., Boyer S., Girod R., Randrianarivejosia M., Vigan-Womas I., Ndiath O\*, Bourgouin C\*. **The first experimental field site in Madagascar for studying *Anopheles* competency to transmit *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*.** Keystone Symposia. 10-14/09/2017, Durban, Afrique du Sud. Poster.

## Résumé

Le paludisme demeure un problème de santé majeur en Afrique subsaharienne. Le nombre limité d'antipaludiques, l'apparition de résistances et l'absence d'un vaccin efficace, font de la lutte antivectorielle (LAV) la principale stratégie préventive de cette maladie. Les méthodes actuelles de LAV visant à limiter ou à interrompre le développement du parasite chez le moustique vecteur, il est donc nécessaire d'améliorer notre compréhension des interactions entre le vecteur *Anopheles*, son environnement et le parasite *Plasmodium*. A Madagascar, *Anopheles gambiae* s.l. et *Anopheles funestus* sont les vecteurs majeurs de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax*. *Anopheles mascarensis*, espèce endémique, peut également être un vecteur important. Dans ce contexte, l'objectif premier de ma thèse a été d'approfondir les connaissances sur *An. mascarensis* à travers une revue. Les données collectées plaident davantage qu'*An. mascarensis* est un complexe d'espèces et permettent de poser les bases pour une analyse moléculaire ciblée. En parallèle, j'ai contribué de façon majeure à la mise en place de la première plateforme expérimentale de Madagascar pour infecter des anophèles par *P. falciparum* et *P. vivax*, afin d'évaluer leur compétence vectorielle. Enfin, en associant entomologie et immuno-parasitologie, nous avons analysé la contribution des vecteurs à la transmission du paludisme dans deux villages adjacents. L'ensemble des travaux réalisés durant de ma thèse contribue à une meilleure connaissance de la diversité de la transmission du paludisme à Madagascar, notamment sur la contribution effective des différentes espèces vectrices. De plus, la mise en place de la plateforme expérimentale d'infection permettra l'analyse de la compétence des espèces et populations d'anophèles vecteurs.

Mots clés : *Anopheles*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, transmission du paludisme, compétence vectorielle, réponses anticorps, Madagascar.

### **Contribution of anopheles to the transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Madagascar. Establishment of an experimental platform for the study of their vectorial competence.**

## Abstract

Malaria remains a major health concern in sub-Saharan Africa. The limited number of antimalarial drugs, the emergence of resistances and the lack of an effective vaccine, make vector control the main preventive strategy for this disease. Current methods of vector control aim at limiting or interrupting parasite development in the vector mosquito. It is therefore necessary to improve our understanding on interactions between the *Anopheles* vector, its environment and the parasite *Plasmodium*. In Madagascar, *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* are the major vectors of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Anopheles mascarensis*, an endemic species, may also be an important vector. In this context, the main objective of my PhD was to deepen the knowledge on *An. mascarensis* through a review. The data collected indicate that *An. mascarensis* is a complex of sibling species. I could thus provide the foundation for targeted molecular analysis. In parallel, in order to evaluate their vector competence, I contributed in a major way to the establishment of the first experimental platform of Madagascar to infect anopheline mosquitoes by *P. falciparum* and *P. vivax*. Finally, combining entomology and immuno-parasitology, we analysed the contribution of vectors to malaria transmission in two neighbouring villages. All the work done during my PhD contributes to a better knowledge of the diversity of malaria transmission in Madagascar, especially on the effective contribution of the different vector species. In addition, the establishment of the experimental platform for infections will further allow the analysis of the competence of the species and populations of *Anopheles* vectors.

Keywords: *Anopheles*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, malaria transmission, vectorial competence, antibody responses, Madagascar.