



**HAL**  
open science

# Impact de l'utilisation des médicaments antipaludiques sur la transmission de Plasmodium sp.

Manon Villa

► **To cite this version:**

Manon Villa. Impact de l'utilisation des médicaments antipaludiques sur la transmission de Plasmodium sp.. Maladies infectieuses. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTG042 . tel-03209997

**HAL Id: tel-03209997**

**<https://theses.hal.science/tel-03209997>**

Submitted on 27 Apr 2021

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Evolution des systèmes infectieux

École doctorale GAIA

Unité de recherche MIVEGEC

## Impact de l'utilisation des médicaments antipaludiques sur la transmission de *Plasmodium sp.*

Présentée par Manon VILLA

Le 15 décembre 2020

Sous la direction de Ana RIVERO

Devant le jury composé de

M. Oliver KALTZ, Directeur de recherche, CNRS

M. Bruno FAIVRE, Pr. des Universités, Université de Bourgogne

Mme Mathilde GENDRIN, Chargée de recherche, Institut Pasteur de Guyane

Mme Alison DUNCAN, Chargée de recherche, CNRS

Mme Ana RIVERO, Directrice de recherche, CNRS

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Invitée

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER







# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Ana pour l'opportunité qu'elle m'a donnée de participer à ce projet et le temps qu'elle aura passé à m'aider. Il aura été enrichissant autant au niveau scientifique qu'humain.

Merci à Frédéric Simard pour m'avoir accueillie dans l'unité.

Merci à Christine Chevillon pour m'avoir accueillie dans l'équipe, pour m'avoir permis d'emprunter sa machine à café tous les midis et pour les discussions que nous avons eu à cette occasion.

Je remercie aussi Pierrick Labbe, Olivier Duron, Isabelle Morlais, Louis Lambrechts et Antoine Berry pour leur participation à mes comités de thèse et leurs conseils judicieux.

Merci à Pascal et Nathalie à l'animalerie pour avoir pris soin de tous mes canaris et m'avoir bien aidé à les surveiller lors des manips.

Je remercie Arnaud qui m'a formée et soutenue sur plein d'aspects techniques de ma thèse. Merci pour ta patience et tes explications claires, ainsi bien évidemment que ton aide avec tous ces échantillons à gérer, ces canaris, moustiques, étiquettes... Je ne peux plus compter les fois où les manips n'auraient pas été possible sans toi. Tu m'as notamment appris à faire des nuggets de moustiques colorés, ce qui m'a épargné plusieurs heures de boulot ! Enfin, merci pour ton humour et ta bonne humeur tout au long de ces heures de manip !

Merci à la team Bibiches. J'ai du mal à croire que ça fait maintenant 7 et 8 ans qu'on se connaît, et qu'on se soutien même à distance. Merci pour vos retours et vos nombreuses relectures de mon travail, nos discussions toujours sur des sujets très sérieux et enrichissants, les fous rires à chaque fois qu'on se voit et votre soutien indéfectible. J'inclue évidemment dans ce petit groupe Gui, Yoann et Ambre (mini-bibiche) qui sont plus que des pièces ajoutées mais bien des bibiches à part entières.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet à Montpellier, Toulouse ou sur le terrain. Le travail sur le terrain a été globalement une expérience formidable et enrichissante, avec de très belles rencontres que je garderais en mémoire. Je sais que j'oublie des gens car nous étions des équipes très nombreuses pour chaque échantillonnage et que je suis tête en l'air. Je m'en excuse. J'aimerais remercier : Serge, Fofana, Bienvenu, Bienvenue, Raymond, Edwige, Mathias, Fayama, Christelle, Brice et Amidou. Merci pour votre aide au travail d'abord, pour m'avoir aussi fait découvrir un peu le Burkina et le Cameroun.

Dans la team Montpellier, je suis obligée de remercier Marie qui est là depuis le début et qui sait à peu près tout de ma vie. Tu as été présente lors des moments difficiles que j'ai pu vivre pendant ces trois années et je suis très contente que nous ayons aussi pu collaborer sur des projets professionnels. Merci pour tout, les extractions, ton canapé, les cafés, l'initiation à la bière (sans elle ma thèse n'aurait pas été pareil ^^) et bon courage pour ta thèse.

Merci aussi à Flo pour tes conseils et la vision du futur que tu m'as donné en tant que thésard sénior. Ça m'a permis de me projeter et de faire exactement les mêmes erreurs, en pire probablement.

Merci à Ahmed, Quentin et Thomas qui ont fait parti de ces after-work bière si précieux pour décompresser après le travail.

Enfin je souhaite remercier une personne très chère à mon cœur, ma sœur. Les périodes difficiles que nous avons traversé ensemble n'ont fait que nous rapprocher, si cela était encore possible. Sans ton soutien j'aurais probablement perdu courage à plusieurs reprises, je t'aime fort.

Merci à ma famille et en particulier à mon père pour le soutien pendant ces 10 longues années à la fac et ton soutien face à mon futur incertain.

Pour finir, il y a eu de nombreuses personnes qui ont compté pour moi pendant ces 3 années que ce soit pour m'encourager, me donner des idées ou simplement me faire un peu prendre l'air : Boo (qui a apporté tellement de douceur à ces 3 années et de « shgrfhgimkh » à mes manuscrits), Daniel, Caroline, Fabian, Claude, Nina, Clément, Thomas, Murielle...

Je m'excuse pour tous ceux que j'aurais oublié au moment d'écrire ces lignes.

## Table des matières

Remerciements.....	5
Introduction.....	9
Les maladies infectieuses .....	9
Le paludisme ou malaria.....	9
Les modèles animaux : la malaria aviaire .....	11
Le cycle parasitaire .....	11
Traitements antipaludiques et évolution des résistances .....	13
Le vecteur et la lutte antivectorielle .....	20
Les « Transmission blocking strategies » .....	22
Impact de l'utilisation des antipaludiques sur la transmission de <i>Plasmodium</i> – Sujet de thèse (Fig. 1).....	23
Bibliographie :.....	31
Chapitre 1.....	45
The transmission-blocking effects of antimalarial drugs revisited: fitness costs and sporonticidal effects of artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine .....	45
Chapitre 2 – Effect of sulfadoxine-pyrimethamine ingestion on the mosquito's gut microbiome (and transcriptome).....	81
Abstract.....	82
Introduction .....	83
Material and Methods .....	85
Results .....	89
Discussion .....	93
Acknowledges.....	96
References.....	97
Chapitre 3 - Costs and benefits associated to artesunate-selected lines of <i>Plasmodium relictum</i> : a study on birds and mosquitoes.....	104
Chapitre 4 – Etude de la fréquence des allèles de résistance chez l'homme et chez le moustique : une étude de terrain au Cameroun et Burkina Faso .....	131
Résumé.....	132



Introduction .....	133
Matériel et méthodes.....	136
Résultats .....	140
Discussion .....	146
Remerciements .....	151
Annexe.....	152
Références.....	154
Discussion Générale.....	160
Coûts et bénéfices des stratégies médicamenteuses actuelles .....	162
Implications de ces résultats sur le terrain.....	166
Perspectives .....	168
Références.....	170

# Introduction

## Les maladies infectieuses

Les maladies infectieuses sont des interactions durables de type parasitisme. Un organisme, le pathogène, vit aux dépens d'un autre organisme, l'hôte. Ces maladies ont une grande influence sur les populations humaines et notre histoire est ponctuée de grandes épidémies ayant eu un fort impact sur la densité de populations humaines et le développement de nos sociétés. Une maladie infectieuse très connue est la peste, à l'origine de 3 épidémies majeures ayant causé des millions de morts, notamment en Europe au XIV<sup>ème</sup> siècle (Zietz and Dunkelberg, 2004). Une autre épidémie funestement connue est celle de la grippe espagnole survenue en 1918, qui tua 50 millions de personnes en une année (Johnson and Mueller, 2002). Plus récemment, le continent africain a dû faire face à une autre épidémie dévastatrice qui entraîné la mort de plus de 10 000 personnes : Ebola (WHO, 2016). Face à ces maladies infectieuses, les populations humaines ont développé des stratégies pour se préserver et limiter le nombre de mort. Tout d'abord, la lutte se fait en créant une barrière physique pour stopper la transmission. En effet, soit on identifie la source de la maladie (comme l'eau pour les maladies d'origines hydriques) soit on isole les personnes malades pour diminuer le contact avec le pathogène. Ensuite, parmi les nombreux moyens de luttés mis en place il y a eu le développement des médicaments. Pour chaque maladie des traitements de plus en plus efficaces ont été développés, au fur et à mesure de la progression des connaissances en biologie et chimie. Ces médicaments sont des molécules qui permettent de tuer le pathogène. Cependant, les pathogènes ont développé des moyens d'échapper aux stratégies de lutte, et de ce fait encore aujourd'hui, les maladies infectieuses représentent une des premières causes de morbidité et de mortalité dans le monde.

## Le paludisme ou malaria

Le paludisme est une maladie infectieuse vectorielle induite par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Ces parasites sont principalement connus pour leurs effets dévastateurs sur les populations humaines (environ 500 000 morts par an), mais des espèces plasmodiales infectent une grande diversité de vertébrés comme des mésanges, des pingouins, des margouillas (lézards), des rongeurs ou des singes (Fix et al., 1988; Martinsen et al., 2008). Les parasites du genre *Plasmodium* ont un cycle dixène, c'est-à-dire qu'ils nécessitent deux hôtes pour se reproduire : un vertébré et un vecteur, phlébotome ou culicidé.

Le paludisme n'est pas une maladie récente chez l'humain et elle a un fort impact sur les populations humaines probablement depuis la préhistoire (Molina-Cruz et al., 2016; Sallares et al., 2004). On retrouve des descriptions de symptômes classiques du paludisme dans des textes de la Grèce antique, l'Égypte ancienne ou encore la mythologie chinoise (Cox, 2010).

L'identification des facteurs de risques (notamment la proximité avec des marais) a aussi commencé dès la Grèce et la Rome antique, c'est ce qui a valu son nom à cette maladie : le paludisme (dérivé de *palus* en latin qui signifie « marais »). La lutte contre la maladie se fait à cette époque grâce à des pratiques agricoles ou sociales (Greenwood, 2009). Les premiers traitements spécifiques au paludisme sont découverts au XVII<sup>ème</sup> siècle avec la quinine, une molécule dans l'écorce de quinquina, un arbre d'Amérique du Sud (Cox, 2010). Au XIX<sup>ème</sup> siècle, les molécules actives sont extraites des plantes pour produire des médicaments faciles d'utilisation, et la quinine devient le traitement préconisé contre le paludisme (Bruce-Chwatt, 1988). Le développement des traitements ne signifie pas qu'on connaît l'agent pathogène ni son mode de transmission. Après la découverte des bactéries, il était communément admis qu'il fallait chercher une bactérie responsable du paludisme, transmise par l'air ou par l'eau. C'est pourquoi, Charles L. Laveran, un médecin militaire français, a dû convaincre les savants de l'époque pour faire reconnaître sa découverte en 1880 : un parasite unicellulaire est responsable de la maladie et non pas une bactérie. Cette découverte permet ensuite l'identification du cycle de vie et des différentes espèces plasmodiales infectant l'humain. Trois espèces sont décrites, ayant chacune leurs particularités : *Haemamoeba vivax* responsable des formes bénignes, *Laverania malariae* responsable des formes malignes et *Haemamoeba malariae* moins courante (Cox, 2010). Depuis, ces espèces ont été respectivement renommées *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* et trois autres espèces capables d'infecter l'homme ont été décrites, *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium knowlesi* (Knowles and Das Gupta, 1932; Singh et al., 2004) et *Plasmodium cynomolgi* (Ta et al., 2014). La compréhension du cycle de vie à l'intérieur du corps humain progresse mais on ignore toujours comment le parasite est transmis. Le rôle du moustique dans la transmission est évoqué dès le XVIII<sup>ème</sup> siècle par un physicien italien (Dobson, 1999), mais c'est seulement à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle que Ronald Ross démontre le rôle des moustiques dans la transmission des parasites en utilisant la malaria aviaire comme système expérimental (*P. relictum* – *Culex sp.*, voir ci-dessous ; Cox, 2010; Ross, 1905). Peu après, Grassi, Bignami et Bastianelly précisent que seuls les anophèles peuvent transmettre la malaria humaine (Capanna, 2006; Grassi et al., 1899).

Par la suite, la lutte contre la maladie va inclure des armes chimiques, comme les antipaludiques synthétiques ou les insecticides et répulsifs (Cox, 2010; Hemingway et al., 2016; Kitchen et al., 2006). Grâce à ces nouvelles armes, la lutte contre le paludisme a rencontré un grand succès et de nombreuses vies ont été sauvées. En 1955, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance le programme d'éradication du paludisme au niveau mondial (Global Malaria Eradication Programme), qui va malheureusement échouer mais qui permet tout de même d'éliminer la maladie de certaines régions du monde et de diminuer la mortalité associée (Greenwood, 2009;

Henderson, 1998; Nájera et al., 2011). Le paludisme a par exemple été éradiquée en Europe dans les années 1960 (Dobson, 1999; Hay et al., 2004; Vale et al., 2009).

## Les modèles animaux : la malaria aviaire

Les modèles animaux ont toujours joué un rôle important dans notre compréhension du paludisme humain car ils permettent de faire des expériences qui sont impossibles lorsqu'on travaille chez l'homme. La **malaria aviaire** a été découverte à la même époque que le paludisme humain (Cox, 2010). C'est un modèle de laboratoire très important dans l'acquisition de connaissances sur le paludisme puisque c'est notamment celui qui a permis à R. Ross de démontrer le rôle des moustiques dans la transmission de la maladie (Ross, 1905). *P. relictum*, un parasite d'oiseaux passeriformes, a principalement servi à comprendre la **transmission du parasite**, tandis que *P. gallinaceum*, un parasite de volailles, a été très utilisé lors du développement des médicaments antipaludiques (Wu et al., 2015). Lors de l'émergence de **résistances** à des antipaludiques majeurs, le système aviaire a servi à réaliser des expérimentations, notamment de sélection expérimentale (Beaudoin et al., 1967; Bishop, 1962). Ces modèles ont été remplacés par le modèle murin après la découverte de *P. berghei*, en 1948 (Stephens et al., 2012). Ce modèle a l'avantage d'utiliser des souris de laboratoire dont on peut contrôler la variabilité inter-individuelle avec des élevages prévus spécialement pour les laboratoires. Plus récemment, l'acquisition de nouvelles connaissances telles que la grande diversité au sein des espèces plasmodiales aviaires et leur large répartition a suscité un regain d'intérêt pour la malaria aviaire. De plus, ce modèle a certains avantages en tant que modèle de laboratoire par rapport au modèle murin. On connaît le **vecteur naturel** des parasites aviaires, principalement *C. pipiens*, et il est facilement **élevable en laboratoire** contrairement au seul vecteur de la malaria murine connu, *Anopheles durenii* (Thurston, 1953). Le modèle aviaire nous permet aussi d'isoler régulièrement de nouveaux parasites depuis les populations naturelles grâce à son abondance (Ventim et al., 2012), tandis que les parasites du modèle murin ont été isolés depuis des populations sauvages entre les années 1950 et 1980 et sont depuis maintenus en laboratoire.

## Le cycle parasitaire

### Chez le vertébré

Lorsqu'un moustique femelle infecté se nourrit du sang d'un vertébré, des **sporozoïtes** sont injectés en même temps que la salive dans le sang de l'hôte. Les sporozoïtes migrent via la circulation sanguine, jusqu'au foie et infectent les cellules hépatiques (Shortt et al., 1951). Ils y effectuent une première multiplication asexuée, la **mérogonie exo-érythrocytaire**, et durant cette période l'infection n'est pas détectable dans le sang. Chez certaines espèces plasmodiales,

comme *P. vivax*, *P. ovale*, *P. cynomolgi* ou *P. relictum*, des parasites entrent en quiescence dans des cellules hépatiques avant d'effectuer la mérogonie. Ils forment des **hypnozoïtes** dont le métabolisme est ralenti (Cogswell, 1992; White and Imwong, 2012). Les hypnozoïtes peuvent sortir de dormance plusieurs années après l'infection. La mérogonie exo-érythrocytaire dure plusieurs jours (variable suivant les espèces plasmodiales) et se termine lorsque des mérozoïtes sont libérés dans le sang et infectent des globules rouges. Dans les érythrocytes, les parasites, sous forme de **trophozoïtes**, entament une phase trophique durant laquelle ils digèrent l'hémoglobine. Au cours de la digestion, les produits non utilisables et toxiques pour les parasites sont stockés sous forme de **d'hémozoïne**, le pigment caractéristique des *Plasmodiums*. Une seconde phase de multiplication asexuée a lieu dans les globules rouges, la **mérogonie érythrocytaire**. Durant cette phase, les parasites peuvent continuer les cycles de multiplication asexuée ou bien entrer dans le cycle de reproduction sexuée. Les stades sexués sont les **gamétocytes** mâles et femelles, qui sont transmis au vecteur lors du repas sanguin.

L'infection chez le vertébré comprend une **phase aigüe** et une **phase chronique**. La phase aigüe dure plusieurs jours et correspond à une forte charge parasitaire, qui entraîne un manque d'apport en oxygène aux tissus à cause de la lyse des globules rouges, de l'obstruction de vaisseaux sanguins et d'une acidose métabolique (Miller et al., 2002). Chez l'homme, l'apparition des symptômes peut prendre de 6 jours à plusieurs mois après la piqûre infectante et coïncide avec la multiplication asexuée ayant lieu dans les globules rouges. Ils incluent souvent de la fièvre, des frissons, une détresse respiratoire, des diarrhées et vomissements. Les cas les plus graves entraînent une anémie sévère, des problèmes aux reins, un coma et parfois la mort (White, 1996; White and Ho, 1992). La maladie est particulièrement dangereuse pour les femmes enceintes et les enfants en bas âges (Tuteja, 2007).

Durant la phase chronique les parasites sont moins nombreux, parfois difficilement détectables. Cette phase est longue, elle peut durer plusieurs semaines à plusieurs mois et peut être entrecoupée de phase de recrudescence à cause des stades dormants ou d'une augmentation de la multiplication asexuée dans les globules rouges. Il n'y a pas de symptômes durant cette phase.

### *Chez le vecteur, l'hôte définitif*

Lorsqu'un moustique femelle se nourrit sur un vertébré infecté, elle risque d'ingérer des gamétocytes dans le repas sanguin. C'est le début de la **sporogonie**, c'est-à-dire le développement du parasite dans le vecteur. Dans le tube digestif du moustique les gamétocytes forment rapidement des **gamètes** mâles et femelles. Ces gamètes fusionnent et forment un zygote mobile, **l'ookinète**, qui migre alors jusqu'à la paroi du tube digestif. Ce stade doit être rapide afin de ne pas être bloqué dans la membrane péritrophique formée autour du repas sanguin par le moustique. L'ookinète traverse la paroi du tube digestif et s'enkyste à l'extérieur, on l'appelle alors

un **oocyste**. Au sein de cet oocyste, de très nombreuses multiplications asexuées ont lieu jusqu'à la rupture de la paroi du kyste et la libération des **sporozoïtes**. Ceux-ci migrent à travers l'hémolymphe du moustique pour rejoindre les glandes salivaires. Lorsque le moustique prend un repas sanguin, il injecte de la salive notamment pour fluidifier le sang, et injecte donc en même temps les parasites présents dans les glandes salivaires.

### Traitements antipaludiques et évolution des résistances

Les traitements médicamenteux antipaludiques ont pour objectif premier de soigner les personnes malades mais vont aussi diminuer la transmission. Il existe 3 catégories de traitements antipaludiques selon le stade du parasite ciblé : les **schizonticides actifs dans le sang** qui tuent les stades asexués intra-érythrocytaires, les **schizonticides actifs dans les tissus** dont le foie et les **gamétocytocides** qui visent les stades sexués dans le sang et préviennent la transmission au moustique (Kumar et al., 2003; Schlitzer, 2007). Pour traiter les patients infectés par *P. falciparum* il est recommandé d'utiliser des traitements de la première catégorie (schizonticides dans le sang) tandis que pour ceux infectés par *P. vivax* et *P. ovale* il est nécessaire d'utiliser en plus des schizonticides actifs dans le foie pour empêcher les recrudescences dues aux stades dormants (WHO, 2015).

Des parasites résistants aux médicaments antipaludiques ont rapidement émergé suite à leur utilisation à grande échelle. Les traitements contre le paludisme ont été développés au fur et à mesure des besoins face à la résistance des parasites aux précédentes molécules et en fonction des moyens financiers alloués à la lutte contre le paludisme. En effet, à chaque découverte de parasites résistants aux thérapies en cours d'utilisation il devenait urgent de développer de nouveaux traitements.

### La quinine

Les premiers traitements contre le paludisme sont anciens, avant même que les causes de la maladie soient identifiées, et sont à base de plantes. Par exemple, en Chine le Qinghao est utilisé depuis plus de 2000 ans pour soigner des fièvres (Klayman, 1985). Le premier traitement qui se répand dans le monde entier est l'écorce de quinquina, découverte par les européens en Amérique du Sud au XVII<sup>ème</sup> siècle (Bruce-Chwatt, 1988). Il y a plusieurs hypothèses quant à l'origine de cette découverte. Certaines sources prétendent qu'elle était utilisée par les autochtones pour soigner les fièvres tandis que d'autres mettent en avant les colons européens, qui auraient découvert les propriétés curatives de l'écorce puis l'aurait ramené en Europe où le paludisme était un fléau (Sullivan, 2011). L'utilisation se fait d'abord par infusion de l'écorce dans l'eau, puis en 1820 Pelletier et Caventou mettent au point une technique plus efficace pour extraire le principe actif de la plante (Achan et al., 2011; Bruce-Chwatt, 1988; Kumar et al., 2003). La quinine est alors utilisée pour soigner le paludisme, mais aussi d'autres affections et parfois en tant que simple

analgésique. Ces processus nécessitent une très grande quantité d'écorces pour obtenir une faible quantité de traitement. Une course est alors lancée pour arriver à synthétiser la quinine (Woodward and Doering, 1945). Les alcaloïdes issus de l'écorce de quinquina, dont la quinine et la quinidine, sont une classe d'antipaludiques qui perturbe la digestion de l'hémoglobine par le parasite. Ils sont donc des schizonticides à action rapide sur les stades parasitaires sanguins. Ces traitements se sont montrés très efficaces, bien que les propriétés gamétocytocides de la quinine ne fonctionnent pas sur *P. falciparum*, et qu'ils ne soient pas efficaces pour empêcher les recrudescences chez *P. vivax* et *P. ovale* (Achan et al., 2011). La quinine a été un des traitements principaux du paludisme pendant plus de 300 ans et est encore utilisée aujourd'hui en association avec d'autres molécules telles que la doxycycline ou la clindamycine (WHO, 2015). Ces antibiotiques permettent d'augmenter l'efficacité de la quinine. Malgré les recommandations de l'OMS d'utiliser les ACTs (voir ci-dessous), la quinine est encore largement utilisée en monothérapie dans des pays africains, notamment à cause de son prix abordable et de son accessibilité, contrairement aux thérapies combinées (Achan et al., 2011).

### *Les dérivés de la quinine : les quinolines*

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, des chimistes tentent de synthétiser des médicaments antipaludiques pour augmenter la productivité.

Les 8-aminoquinolines, comme la pamaquine ou la primaquine, sont les premiers à être synthétisés (Singh and Singh, 2014). La pamaquine, un gamétocytocide produit en 1925, est le premier antipaludique synthétique (Vale et al., 2009). A cause de ses nombreux effets secondaires, cette molécule n'a pas été commercialisée mais elle représente le premier pas vers la synthèse de la primaquine en 1946 aux États-Unis (Singh and Singh, 2014). Ce 8-aminoquinoline gamétocytocide et schizonticide dans les tissus est utilisé à partir de 1952 et est encore aujourd'hui un traitement clef contre le paludisme (Vale et al., 2009). La primaquine ne peut pas être utilisée partout à cause des effets secondaires importants qu'elle peut avoir sur les femmes enceintes, les jeunes enfants et sur les personnes déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase, un phénotype courant en Afrique (White, 1996).

En parallèle du développement des 8-aminoquinolines, la compréhension de la structure de la quinine permet le développement des 4-aminoquinolines, comme la quinacrine, la **chloroquine** ou l'amodiaquine (O'Neill et al., 1998). En 1932, la quinacrine est commercialisée sous l'appellation Atabrine® et c'est cet antipaludique qui a permis le traitement des troupes armées des Alliés durant la deuxième guerre mondiale en l'absence d'accès à la quinine (Coatney, 1963). Cette molécule a de nombreux effets secondaires dont le jaunissement de la peau et des yeux et des troubles gastro-intestinaux (Miller et al., 1950). En 1934, des chimistes allemands mettent au point la chloroquine, alors appelée resochin, qui est jugée trop toxique pour être utilisée en médecine (Singh and Singh, 2014). Elle ne sera utilisée qu'après avoir été réévaluée à la fin de la



seconde guerre mondiale (Kitchen et al., 2006). Elle remplace la quinacrine car elle est plus efficace, moins chère et avec moins d'effets secondaires (Coatney, 1963; Foley and Tilley, 1998; Singh and Singh, 2014; White, 1996), ce qui en fait un traitement de choix dans le programme d'éradication du paludisme de l'OMS. La chloroquine perturbe la digestion de l'hémoglobine par le parasite en s'accumulant dans la vacuole digestive et en perturbant la détoxification de l'hème (Foley and Tilley, 1998).

Des parasites résistants à la chloroquine ont été recensés dès les années 50 en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud (Achan et al., 2011). La résistance à la chloroquine se propage et est répartie mondialement dans les années 1980. Elle est majoritairement liée à une mutation sur le gène *Pfcr1*, la plus courante étant K76T, qui modifie un transporteur, empêchant l'accumulation de la molécule et donc son action dans la vacuole digestive (Sanchez et al., 2005, 2004; Singh and Singh, 2014). D'autres mutations peuvent aussi entraîner une résistance à la chloroquine comme la mutation N86Y sur le gène *Pfmdr1* (« multi-drug resistance » ; Singh and Singh, 2014). Pour faire face à la résistance à la chloroquine d'autres molécules sont mises en avant, telles que l'**amodiaquine**. Elle ne permet pas en monothérapie de débarrasser totalement un patient des parasites résistants à la chloroquine, c'est pourquoi elle n'est utilisée qu'en thérapie combinée (Rieckmann, 1971). Cette molécule semble plus efficace que la chloroquine mais c'est une pro-drogue qui est métabolisée dans le corps humain en deux composés dont l'efficacité contre *Plasmodium* est réduite par rapport à la molécule d'origine (Churchill et al., 1986, 1985). De plus, utilisée en prophylaxie elle peut avoir de forts effets secondaires pouvant mener à la mort (Olliaro et al., 1996).

La méfloquine et l'halofantrine sont d'autres molécules antipaludiques développées par l'armée américaine suite à la guerre du Vietnam, durant laquelle elle a été confrontée à des parasites résistants à la chloroquine. Ce sont des molécules proches de la quinine dont l'utilisation pour le grand public commence dans les années 1980 (Croft, 2007). La méfloquine est un amino-alcool dérivé de la quinine qui a une longue demi-vie dans le sang et est plus efficace que la chloroquine (Kumar et al., 2003; Schmidt et al., 1978; Sweeney, 1981). Elle a été utilisée pour traiter les patients avec des parasites résistants aux autres thérapies et en prophylaxie (Kumar et al., 2003). Cette molécule a des effets neurotoxiques, notamment neuropsychiatriques graves pouvant mener au suicide (Croft, 2007). En plus de ces effets secondaires, la présence de parasites résistants répandus dans le monde, a entraîné l'arrêt de son utilisation en monothérapie (Foley and Tilley, 1998; Price et al., 2004). L'halofantrine quant à elle, bien que mieux tolérée que la méfloquine, peut provoquer une arythmie cardiaque souvent fatale (Nosten et al., 1993; Wesche et al., 2000). Cette molécule est de plus difficilement absorbée et il y a une résistance croisée entre la méfloquine et l'halofantrine (Cowman et al., 1994). Elle n'est donc plus utilisée actuellement.



### Les antifolates

Les **antifolates** (pyriméthamine, sulfadoxine, proguanil) sont une autre classe d'antipaludiques issus de synthèse à partir des connaissances en biologie cellulaire et en chimie, ils ne sont pas issus de plantes (Ridley, 2002). Leur découverte commence avec l'étude des anémies et de la compréhension du rôle de l'acide folique dans celles-ci dans les années 1930 et 1940 (Nzila, 2006). Des dérivés réduits du folate sont utilisés dans les réactions de transfert de carbone nécessaires à la biosynthèse des nucléotides et pour le métabolisme des acides aminés. Les antifolates ont d'abord été développés pour soigner les leucémies et ensuite pour lutter contre des pathogènes avec une réplication rapide tels que les bactéries et les parasites unicellulaires. Ils interfèrent avec des chaînes de réaction dans les stades asexués de *Plasmodium* inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'acides aminés (Aikawa and Beaudoin, 1968; Delves et al., 2012; Vincke, 1970).

Il existe deux classes d'antifolates utilisés pour traiter le paludisme : la classe I qui sont les inhibiteurs de la dihydropteroate synthase (DHPS) et la classe II qui sont les inhibiteurs de dihydrofolate reductase (DHFR). Contrairement aux humains, *P. falciparum* n'utilise que très peu les folates présents dans son environnement et il synthétise *de novo* la majorité des folates utilisés pour son métabolisme (Gregson and Plowe, 2005). L'inhibition de DHPS par les antifolates de classe I empêche la synthèse de folates par le parasite, tandis que l'inhibition de DHFR empêche le métabolisme des folates d'origine exogène ou endogène par le parasite. Les deux classes agissent donc en synergie.

Les sulfonamides et sulfones font partis de la classe I et sont des antagonistes de l'acide p-aminobenzoïque (PABA) qui est nécessaire pour la synthèse des vitamines chez le parasite (Richards, 1971). La **sulfadoxine** est aujourd'hui le principal antifolate de classe I. Elle a été décrite par Laing en 1964 comme étant une molécule à absorption rapide et action longue (>100h après absorption, Richards, 1971). Cependant, ces antifolates ont été peu utilisés en monothérapie à cause de leur faible efficacité et forte toxicité (Richards, 1971).

Le premier antifolate de classe II synthétisé est le proguanil, développé par un laboratoire anglais durant la seconde guerre mondiale. Le proguanil est une pro-drogue dont la forme active est le chlorocycloguanil qui inhibe le DHFR du parasite. Il a été utilisé en prophylaxie seul ou en curatif en association avec la quinine. Cependant, l'antifolate de classe II le plus utilisé est la **pyriméthamine**, connue sous le nom de Daraprim®. La pyriméthamine agit en interférant avec la conversion de l'acide folique en acide folinique et ainsi arrête la synthèse d'ADN par manque de thymidine (Richards, 1971). Cette molécule a été peu utilisée en monothérapie et est plus utilisée en association avec la sulfadoxine ou le sulfalène. La pyriméthamine a l'avantage d'avoir plus d'affinité avec le DHFR de *Plasmodium* que celui humain et est particulièrement intéressante grâce à ses effets **prophylactiques**.

La pyriméthamine et la sulfadoxine agissent en synergie ce qui augmente leur efficacité et réduit les risques d'émergence de résistance lorsqu'elles sont associées dans un traitement, le Fansidar® (Kumar et al., 2003; Ridley, 2002). La sulfadoxine bloque la synthèse de folate, principale source de ce composant pour le parasite, et la pyriméthamine empêche le métabolisme du folate d'origine exogène jusqu'à la mort du parasite. De plus, grâce à sa longue demi-vie dans le sang, la sulfadoxine tue les parasites résistants à la pyriméthamine avant que la concentration de celle-ci ne tombe en dessous de son seuil d'efficacité, réduisant ainsi la propagation de ces parasites résistants. La **sulfadoxine-pyriméthamine (SP)** est utilisée pour lutter contre les parasites résistants à la chloroquine et la quinine à partir des années 1960 mais est recommandée seulement en troisième ligne de traitement (d'abord la chloroquine, si c'est un échec alors quinine et enfin SP ; Bartelloni, 1967; Powell et al., 1967; Richards, 1971). Ce traitement ne nécessite qu'une seule dose mais agit plus doucement sur les parasites. SP est le traitement privilégié préventif des femmes enceintes (IPTp-SP) et des jeunes enfants (<5 ans) en Afrique subsaharienne (WHO, 2019). L'administration aux femmes enceintes permet de diminuer les effets délétères de la maladie en diminuant l'anémie, la charge parasitaire dans le sang et le placenta, et en empêchant une nouvelle infection (Peters et al., 2007; WHO, 2019). Ce programme montre une grande efficacité même dans les zones où il y a une forte prévalence de parasites résistants à la SP (Peters et al., 2007).

En effet, des parasites résistants à la SP ont rapidement émergé après le début de l'utilisation à grande échelle de ce traitement dans les années 1960 et se sont répandus à travers le monde (Nurse, 1981). Des mutations conférant une résistance à la pyriméthamine ont d'abord été identifiées sur le gène *dhfr* au codon 108 (S108N), puis au codon 51, 59 et enfin 164 (Peterson et al., 1988). Chacune des mutations sur *dhfr* confère un différent degré de résistance à la pyriméthamine et S108N semble être la première mutation à être apparue (Hopkins Sibley et al., 2001). L'accumulation de plusieurs mutations, telles que *dhfr* 51 et *dhfr* 59, confère une plus forte résistance qu'une mutation unique et peut aussi permettre de réduire les coûts métaboliques associés aux mutations (Brown et al., 2010). D'autres mutations à l'origine de la résistance aux sulfonamides ont été détectées dans les régions conservées de *dhps*, les plus courantes étant sur les codons 436 et 437 (Wang et al., 1997).

### *Les antibiotiques*

Certains des antipaludiques évoqués précédemment ont d'abord été développés comme antibiotiques, notamment les antifolates. Des **mécanismes communs entre bactéries et Plasmodiums** font que certains médicaments peuvent être efficaces autant contre le premier type de pathogène que le deuxième. Cette piste est donc explorée depuis le XX<sup>ème</sup> siècle pour trouver de nouveaux traitements antipaludiques. Certains antibiotiques servent à inhiber la synthèse de protéines bactériennes et se sont révélés efficaces pour inhiber la croissance de *Plasmodium* en

interférant avec l'expression des gènes de l'apicoplaste (les tétracyclines, Ridley, 2002). Ils empêchent la formation d'apicoplastes fonctionnels et leur action est retardée, le résultat ne se voit qu'environ 48h après le début du traitement (Dahl et al., 2006). L'apicoplaste est un organelle du parasite contenant son propre génome, procaryote-like (Waller and Mcfadden, 2005). Il fournit des chaînes métaboliques nécessaires à la synthèse des lipides, de l'hème et des isoprénoïdes, intervenant ainsi dans les stades sanguins et la différenciation en stades sexués (Waller and Mcfadden, 2005; Yeh and DeRisi, 2011).

Les tétracyclines dont la tétracycline, la doxycycline et la clindamycine sont des antibiotiques utilisés en combinaison avec la quinine pour traiter les infections à *P. falciparum* après l'apparition de parasites résistants aux autres traitements dont SP (Watt et al., 1992; White, 1996). Dès 1980, la résistance à SP a été suffisamment répandue pour qu'il soit nécessaire de trouver un autre traitement, notamment en Asie du Sud-Est, c'est pourquoi la quinine en association avec la tétracycline a été largement utilisée. L'émergence de résistance à ce traitement (quinine + tétracycline) semble avoir pris plus de temps que pour les autres traitements. Malheureusement, les parasites résistants à la quinine sont toujours moins sensibles à ce traitement, et seulement 68% des patients traités à la quinine + tétracycline en ambulatoire sont soignés (Suebsaeng et al., 1986).

A cause de leur efficacité lente, les antibiotiques ne sont utilisés qu'en thérapie combinée en curatif, mais certains, notamment la doxycycline, sont utilisés seuls en prophylaxie. La doxycycline est recommandée en prophylaxie pour les voyageurs se rendant dans des zones avec une résistance à la chloroquine et à la méfloquine à partir de 1994 (Ohrt et al., 1997). Son efficacité est équivalente à la méfloquine (99% contre 100% d'efficacité pour la méfloquine ; Ohrt et al., 1997).

### *L'atovaquone*

L'atovaquone est un hydroxynaphthoquinone qui inhibe la synthèse de pyrimidine en interférant avec le transport d'électron dans la mitochondrie de *Plasmodium* (Nzila, 2006; Ridley, 2002). Cette molécule a d'abord été développée pour traiter les patients porteurs du SIDA infectés par *Pneumocystis carinii* ou *Toxoplasma gondii* (Rieckmann et al., 1990). L'atovaquone est beaucoup plus efficace en combinaison avec d'autres molécules comme le proguanil (Looareesuwan et al., 1996). La synthèse d'atovaquone est compliquée ce qui rend ce médicament cher donc inutilisable dans les pays en développement, c'est pourquoi l'association de l'atovaquone avec le proguanil est principalement utilisée en prophylaxie pour les voyageurs sous le nom de Malarone® (Kain, 2003; Ridley, 2002). Ce traitement tue les stades parasites se développant dans le foie (schizonticide dans les tissus), a moins d'effets secondaires que la doxycycline et la méfloquine et peut être utilisé chez les enfants (Kain, 2003; Schlagenhauf et al., 2003). Dès la première année de son utilisation en 1996, des parasites résistants à l'atovaquone ont émergé. Cette résistance est liée à une unique mutation sur le gène codant pour le cytochrome

P450 2C19 (Looareesuwan et al., 1996; Talisuna et al., 2004). Malgré cela, l'utilisation de l'atovaquone reste utile puisqu'il a été montré que les parasites résistants à l'atovaquone sont incapables d'infecter les vecteurs (Goodman et al., 2016).

### *L'artémisinine et les « Artemisinin-derivatives Combination Therapies » (ACTs)*

En 1967, la Chine lance le projet 523 qui découvre les propriétés antipaludiques de l'*Artemisia annua*, une plante utilisée depuis des milliers d'années en médecine traditionnelle pour soigner la fièvre (White et al., 2015). Ce groupe d'étude identifie le principe actif de la plante, appelé qinghaosu ou artémisinine. C'est une pro-drogue pro-oxydante s'activant une fois dans le parasite au contact de l'hème issu de la dégradation de l'hémoglobine (Paul M. O'Neill et al., 2010). L'artémisinine a une action d'oxydation des protéines et **agit rapidement**, c'est d'ailleurs le plus rapide des antipaludéens connus (Robert et al., 2005). L'artémisinine et ses dérivés sont des **schizonticides et des gamétocytocides dans le sang** (Dutta et al., 1990, 1989). Grâce à la synthèse chimique, la dihydroartémisinine est produite puis l'arthéméther (lipophile) et l'artésunate (hydrophile) qui sont des dérivés stables de l'artémisinine. Ces molécules sont les traitements les plus efficaces à l'heure actuelle, autant contre les formes bénignes que contre les formes sévères du paludisme. Le premier essai important a lieu en 1991 et montre une grande efficacité pour traiter les adultes dans le Sud-Est asiatique mais pas de différence avec la quinine chez les enfants africains (White et al., 2015). La quinine reste donc le traitement privilégié. L'utilisation des dérivés d'artémisinine en monothérapie demande des traitements longs (entre 5 et 7 jours) tandis qu'en association avec une molécule à action plus lente un traitement pendant 3 jours suffit (Nosten et al., 1994). Ces **thérapies combinées à base de dérivés d'artémisinine (ACTs)** sont très efficaces et très bien tolérées (Nosten et al., 1994). Elles comprennent un dérivé d'artémisinine et un dérivé de la quinine, comme la méfloquine, l'amodiaquine, la luméfantine, la pipéraquine ou un antifolate comme la sulfadoxine-pyriméthamine (Burrows et al., 2014; Fairhurst, 2015). En 2001, l'OMS recommande l'utilisation de thérapies combinées plutôt que de monothérapies à base de dérivés d'artémisinine pour éviter l'émergence de résistance à l'artémisinine et ses dérivés mais c'est seulement en 2006 que les ACTs deviennent les traitements recommandés en première ligne (Fairhurst, 2015; White et al., 2015).

Malgré l'utilisation des ACTs, des parasites résistants à l'artémisinine et ses dérivés ont déjà été détectés dans le Sud-Est asiatique (Ashley et al., 2014; Dondorp et al., 2009; Enayati and Hemingway, 2010; Phyo et al., 2012; WHO, 2019) et au Rwanda, en Afrique (Uwimana et al. 2020). La résistance se traduit par une disparition plus lente des parasites dans le sang et par une sensibilité réduite des stades anneaux (trophozoïtes) de *P. falciparum* (Mok et al., 2015; Witkowski et al., 2013). Cette disparition plus lente des parasites augmente le nombre d'entre eux exposés à la molécule associée à l'artémisinine, favorisant ainsi l'émergence d'une résistance à cette deuxième molécule (Fairhurst, 2015). Les mutations associées à la résistance à

l'artémisinine se trouvent dans la région codant la protéine "kelch 13" (Straimer et al., 2014; Tun et al., 2015). Les protéines de la super famille des *kelch* ont des domaines en hélice portant de nombreux sites d'interaction avec d'autres protéines et auraient notamment un rôle dans la gestion du stress oxydatif (Straimer et al., 2014). Cependant, on ne connaît pas encore l'impact qu'ont ces mutations sur la physiologie du parasite. La propagation des mutations responsables des résistances aux ACTs dans des zones de forte transmission, comme l'Afrique Sub-Saharienne, entrainerait un problème majeur en santé publique.

**L'artésunate (AS)** est un dérivé d'artémisinine hydrosoluble. Il est utilisé en injection contre les formes sévères de paludisme ou dans les ACTs en association avec la SP, l'amodiaquine, la méfloquine ou la pyronaridine (WHO, 2019). L'AS est rapidement converti en sa forme active, la dihydroartémisinine, au contact du fer contenu dans le parasite, soit libre soit issu de la digestion de l'hémoglobine, et génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Les ROS augmentent le stress oxydatif dans le parasite ce qui cause des dommages aux protéines et aux phospholipides membranaires (Paul M. O'Neill et al., 2010). Par la voie orale chez l'humain, la concentration maximale dans le plasma est atteinte en 1 à 2 heures et de façon surprenante l'absorption par injection est plus lente et plus variable entre individu (Balint, 2001).

### Le vecteur et la lutte antivectorielle

Les moustiques sont des insectes ectothermes avec un stade larvaire aquatique et un stade adulte aérien. Chaque espèce plasmodiale ne peut être transmise que par quelques espèces de vecteurs. Par exemple, les parasites responsables du paludisme humain sont transmis par des *Anopheles sp.* et *P. falciparum* est majoritairement transmis par *An. gambiae s.l.* et *An. funestus s.l.* en Afrique sub-Saharienne (Sinka et al., 2012).

Toutes les espèces de moustiques ne vont pas être aptes au développement des *Plasmodium* et cette aptitude varie entre individus d'une même espèce, on parle de capacité et compétence vectorielle.

La capacité vectorielle représente la probabilité de transmission d'un vertébré à un autre via les moustiques et elle est liée aux risques de rencontre entre le parasite, le vecteur et le vertébré. Cette capacité dépend de la densité de population de vecteurs (fécondité des moustiques et abondance des gîtes larvaires), du taux de piqûres et de la préférence d'hôte, de la survie journalière des moustiques, de la période extrinsèque de développement du parasite (EIP) et enfin de la compétence vectorielle (Lefevre et al., 2018). C'est la faculté d'un moustique à pouvoir supporter l'infection et le développement du pathogène (Lefèvre et al., 2018). La compétence vectorielle dépend du couple vecteur-parasite et diffère non seulement entre espèces plasmodiales et vectrices mais aussi entre populations (Gutiérrez-López et al., 2020; Lefèvre et al., 2018). La compétence vectorielle est influencée par la génétique et par des variables

environnementales (Lefèvre et al., 2013). L'infection du moustique dépend notamment de son système immunitaire et donc son histoire immunitaire (pathogènes rencontrés précédemment) et de son microbiome qui est en partie lié à sa nourriture (Lefèvre et al., 2013). L'EIP, un autre composant de la capacité vectorielle, est la période nécessaire au parasite pour se développer dans le vecteur, à partir du repas infectant jusqu'à l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes (Lefèvre et al., 2018). Pour les espèces plasmodiales, l'EIP est longue par rapport à la durée de vie du vecteur et par exemple, *P. falciparum* a besoin d'entre 10 et 14 jours pour atteindre les glandes salivaires (Ohm et al., 2018). L'EIP est influencée par la température (Ohm et al., 2018), et les ressources du vecteur au stade larvaire (Barreaux et al., 2016) et à l'âge adulte (Hien et al., 2016).

Un vecteur du paludisme humain va donc être d'autant plus efficace qu'il est anthropophile, avec des gîtes larvaires compatibles avec les activités humaines et avec un système immunitaire permissif aux espèces plasmodiales infectant les humains. Les anophèles sont des moustiques avec une grande diversité de gîtes larvaires ; ils pondent dans des eaux stagnantes et relativement durables, telles que de grandes flaques ou des marais (Holstein and WHO, 1954). Le contact avec les humains s'est intensifié avec le développement de l'agriculture qui a augmenté le nombre de gîtes larvaires proches des habitations (Briët et al., 2003). La déforestation entraînant l'ouverture de zones propices à la stagnation des eaux, une augmentation des températures dans les zones déforestées, une diminution de la disponibilité en vertébrés mais en même temps une augmentation des contacts avec les humains a favorisé l'augmentation des cas de paludisme (Afrane et al., 2008; Vittor et al., 2006; Yasuoka and Levins, 2007). Cibler le vecteur pour diminuer l'incidence de la maladie a été la première stratégie utilisée par les populations humaines.

La lutte antivectorielle vise à diminuer l'incidence des maladies vectorielles en diminuant voire coupant la transmission via le vecteur. La plupart des méthodes de lutte antivectorielle ont pour but de diminuer la capacité vectorielle en influençant la densité de population de vecteurs ou les probabilités de contact entre ceux-ci et l'homme. Dans le cas du paludisme, des études de modélisation mathématique ont déterminé qu'il n'est pas nécessaire d'éradiquer le vecteur pour éradiquer la maladie. Une densité de vecteur inférieure à un certain seuil suffirait à couper la transmission (Smith et al., 2012).

Avant le XX<sup>ème</sup> siècle, la lutte antivectorielle consistait à changer les pratiques sociales et agricoles pour éviter la multiplication des gîtes larvaires et des contacts entre les vecteurs et les humains (Greenwood, 2009). Avec la découverte des insecticides dans les années 1940-1950, la lutte antivectorielle contre le paludisme prend une autre importance (Packard, 1997). Les plus connus sont les adulticides chimiques comme le pyrethrum ou le DDT (dichloro-diphényle-trichloro-éthane ; Raghavendra et al., 2011). L'utilisation des thérapies médicamenteuses associée avec l'utilisation d'insecticides dans les maisons (« Indoor Residual Spraying », IRS), tels



que le DDT, a permis une éradication partielle de la maladie, en Europe et Amérique du Nord (Nájera et al., 2011). Cependant, dès 1955, des moustiques résistants au DDT sont détectés (Hemingway et al., 2016; Wilke et al., 2018). La molécule est partiellement interdite à partir de 1972 à cause des moustiques résistants mais aussi des résidus qu'on retrouve dans les tissus gras et les organes vitaux chez l'humain (Raghavendra et al., 2011). De nouveaux insecticides ont été développés pour remplacer le DDT, et la recherche s'est notamment tournée vers des insecticides d'origine naturelle comme les toxines bactériennes (Sharma, 1990).

Une des stratégies les plus efficaces est l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (ITN), comme de la perméthrine (Snow et al., 1988; WHO, 2019). Elles ont permis de réduire de façon significative les cas de paludisme, l'incidence a été réduite de 62% dans certaines zones, et la mortalité associée (Lengeler, 2009). Les ITN ont des limites puisque suite à leur utilisation à grande échelle, les heures de piqûres des vecteurs ont changé passant de nocturnes à diurnes et la résistance aux insecticides diminue leur efficacité (Reddy et al., 2011; Russell et al., 2011; Thomsen et al., 2017).

### Les « Transmission blocking strategies »

À l'interface entre les deux approches précédentes il y a les « transmission blocking strategies » qui ont pour but de diminuer le  $R_0$  du paludisme, c'est-à-dire le nombre de cas secondaires générés par un malade dans une population entièrement susceptible d'être infectée. Il s'agit d'utiliser des molécules qui ne vont pas soigner le patient mais qui vont empêcher qu'il transmette le parasite à d'autres personnes. Il peut s'agir d'empêcher la transmission au moustique en stérilisant les gamétocytes (Beavogui et al., 2010), ou d'empêcher le développement de *Plasmodium* dans le moustique en visant les oocystes ou les sporozoïtes (Wu et al., 2015). Il y a plusieurs stratégies : les vaccins, l'utilisation de molécules antipaludiques réduisant la transmission vers le moustique ou l'utilisation de moustiques transgéniques (Sinden, 2017).

Les vaccins pour bloquer la transmission visent à faire développer des anticorps au vertébré qui seront ingérés par le moustique dans le repas sanguin. Ces anticorps vont inhiber ou même bloquer le développement du parasite dans le vecteur et ainsi diminuer ou bloquer la transmission du paludisme. La possibilité d'un tel mécanisme a été démontré pour la première fois en 1958 grâce au modèle de la malaria aviaire (Huff et al., 1958). L'injection répétitive de stades sanguins morts de *P. fallax* et *P. gallinaceum* suivie par une infection avec des parasites vivants, entraîne une diminution de la transmission au vecteur. Cet effet serait dû à des protéines, présentes sur les gamétocytes et retrouvées sur les premiers stades dans le vecteur, reconnues par le système immunitaire du vertébré et les anticorps générés seraient capables de viser les parasites dans le repas sanguin du moustique (Grotendorst et al., 1984). Il y a deux types de vaccins : les vaccins qui bloquent la transmission des parasites (TBA) et ceux qui diminuent la transmission (TRA). Les vaccins les plus

prometteurs actuellement sont ceux qui utilisent des protéines de surface recombinantes de *Plasmodium* (P230, P48/45, P25 et P28) ou des protéines du vecteur (AnAPN1 ; Wu et al., 2015). Cependant, ces vaccins sont compliqués à développer car leur efficacité est variable entre individus et est parfois insuffisante pour avoir un réel impact sur la transmission de la maladie.

En plus des vaccins, certains médicaments antipaludiques, développés pour soigner les malades ont en fait des propriétés réduisant la transmission vers le moustique (Sinden et al., 2012; Wadi et al., 2019). Ces propriétés peuvent être dues à 3 actions différentes non exclusives. Premièrement, le médicament peut tuer, arrêter la maturation, perturber le sex ratio ou réduire l'infectivité des gamétocytes. Deuxièmement, une molécule peut inhiber le développement du parasite en ciblant directement les stades du parasite dans le moustique ou en perturbant des métabolismes du moustiques indispensables à l'infection (Sinden et al., 2012). Enfin, des médicaments antipaludiques peuvent avoir des effets secondaires ayant un impact sur les traits d'histoire de vie du moustique important pour la transmission du paludisme, comme la longévité.

Enfin, la dernière piste importante pour bloquer la transmission est la création de moustiques génétiquement modifiés pour être incapables de transmettre le paludisme. L'objectif des moustiques génétiquement modifiés (GMMs) est double : 1) créer des moustiques résistants au parasite, en augmentant l'expression des mécanismes du système immunitaire par exemple , ou 2) modifier des traits d'histoire de vie du moustique afin de réduire la taille de population de vecteurs, notamment en relâchant des moustiques mâles stériles (review dans Christophides, 2005). Pour créer ces GMMs, des systèmes viraux de transduction, des éléments transposables ou des endosymbiotes sont utilisés (Shrivastava et al., 2019). L'introduction de transgènes via ces méthodes dans les moustiques peut avoir un coût sur leur valeur sélective ce qui freine la propagation des transgènes dans les populations de vecteurs, or sans invasion des populations naturelles par les GMMs, ces stratégies sont inefficaces. Bien que l'utilisation de GMMs soit une stratégie prometteuse, plus d'études sur l'impact écologique, l'efficacité et les coûts des GMMs sont nécessaires (Facchinelli et al., 2019; Wilke et al., 2018).

## Impact de l'utilisation des antipaludiques sur la transmission de *Plasmodium* – Sujet de thèse (Fig. 1)

Les médicaments antipaludiques ont joué un rôle essentiel dans le traitement du paludisme dans les zones endémiques, mais ils ont eu d'autres effets pouvant influencer la transmission du pathogène. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux bénéfices et coûts des stratégies médicamenteuses pour lutter contre le paludisme et plus précisément, à **l'évolution des résistances** aux médicaments et à **l'impact des antipaludiques sur le vecteur** ainsi que **sur les parasites se développant dans le vecteur**.

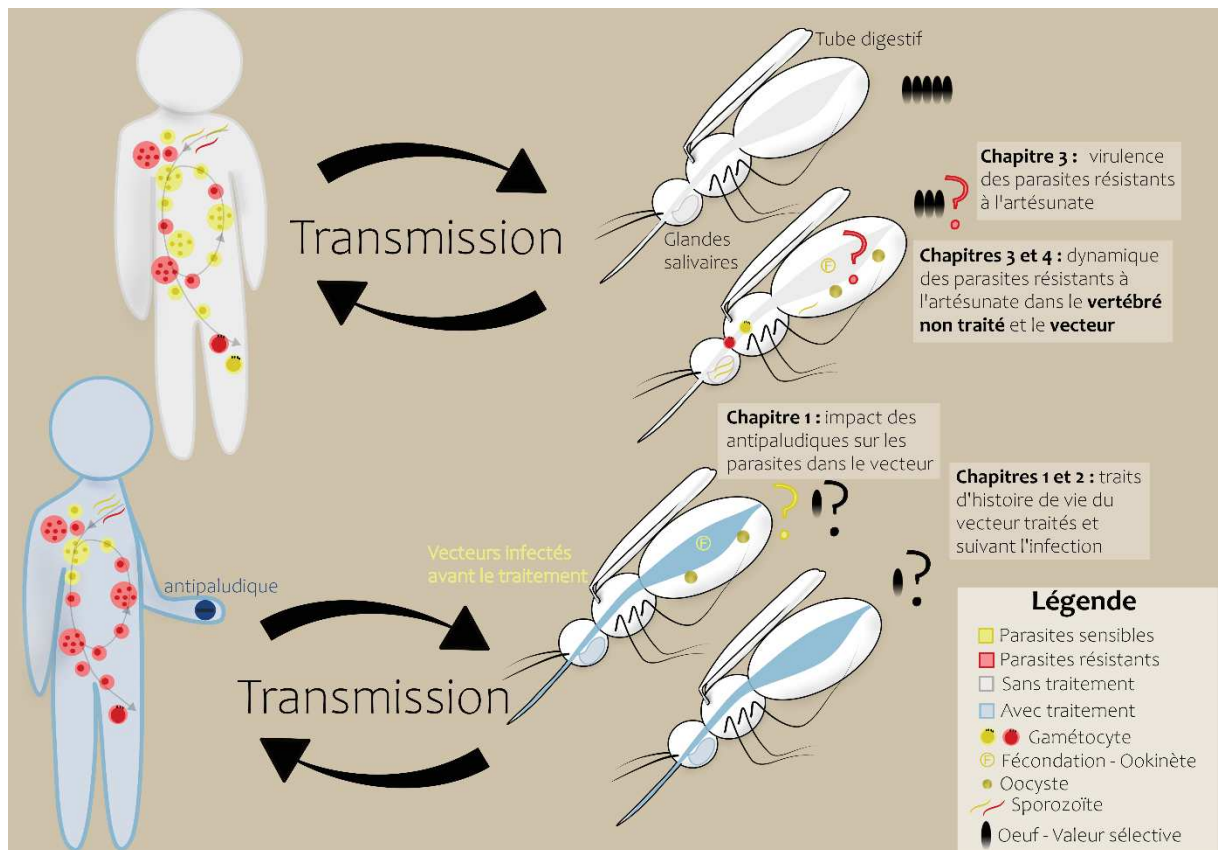


J'ai donc étudié la pression de sélection exercée par les antipaludiques qui entraîne l'émergence et la propagation de parasites résistants. Dans les hôtes traités, les bénéfices apportés par les mutations induisant une résistance aux médicaments sont évidents : augmentation de la survie face au traitement ; les coûts quant à eux sont moins connus. On ignore si le potentiel de transmission de ces parasites est équivalent à celui des parasites sensibles et, on ignore aussi si la pression de sélection favorisant l'émergence de parasites résistants est exercée uniquement dans les vertébrés traités ou aussi dans le vecteur. En effet, lorsqu'un moustique se nourrit sur un hôte traité, le repas sanguin va contenir la molécule curative, ciblant des chaînes métaboliques essentielles au parasite, qui sont susceptibles de s'exprimer aussi dans les stades parasitaires dans le vecteur.

Les médicaments antipaludiques sont aussi connus pour leurs forts effets secondaires chez l'humain, leurs effets n'étant donc pas restreint au parasite. Ces effets secondaires sont très peu étudiés chez le vecteur mais pourraient avoir une importance pour la transmission du paludisme, donc sur la prévalence de la maladie.

La thèse est structurée en 4 chapitres expérimentaux. Les Chapitres 1 et 2 étudient l'effet de l'artésunate (AS) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) sur la capacité et compétence vectorielle de moustiques. Les Chapitres 3 et 4 étudient les effets pléiotropiques des mutations associées à la résistance aux antipaludiques en lien avec la transmission du parasite.

Pour répondre à ces questions j'ai travaillé à la fois sur le terrain (*P. falciparum*) et sur un modèle expérimental, la malaria aviaire (*P. relictum*).

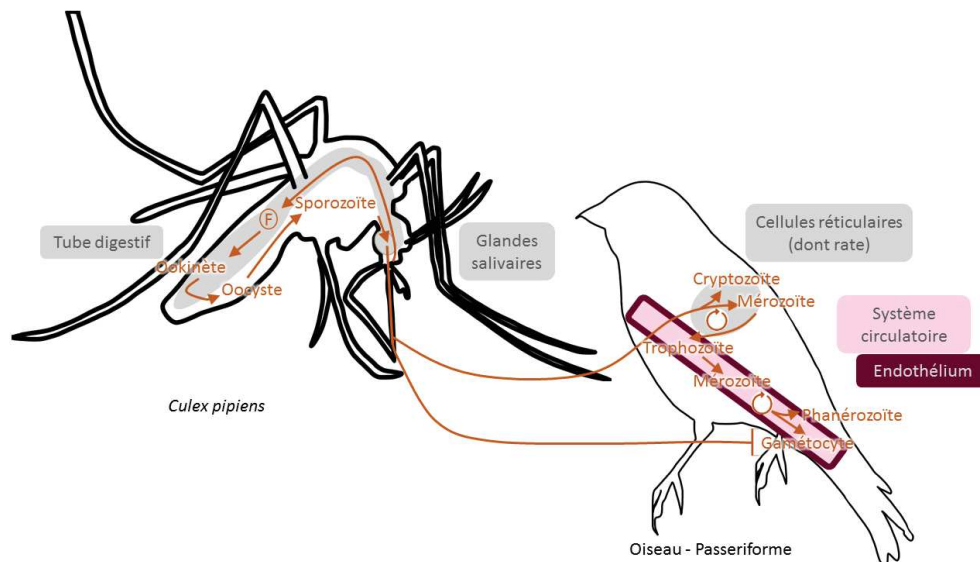


**Figure 1 :** Illustration des différents cas de figure étudiés durant ma thèse. Deux situations sont représentées pour l'humain : un homme non traité (situation initiale) et un homme traité (dans lequel s'effectue la sélection pour la résistance). Quatre situations sont représentées pour le vecteur, de haut en bas : vecteur non infecté nourri sur un humain non traité ; vecteur infecté nourri sur un humain non traité qui peut s'infecter avec des parasites sensibles (en jaune) ou résistant au traitement (en rouge) ; vecteur préalablement infecté par des parasites sensibles nourri sur un humain traité ; vecteur non infecté nourri sur un humain traité. Chaque point d'interrogation représente une question posée dans le chapitre mentionné dans l'encadré blanc à côté. Les couleurs correspondent au type de parasite auquel les questions se réfèrent (allèle sauvage : jaune, allèle résistant : rouge) et le noir se réfère à la valeur sélective du vecteur.

### *Modèle expérimental : la malaria aviaire*

*P. relictum*, est l'espèce de malaria aviaire la plus répandue en Europe. Ce parasite a été retrouvé dans une grande diversité d'oiseaux en Eurasie, Afrique et sur le continent Américain, la lignée SGS1 est présente particulièrement chez des Passeriformes (Fig. 2, Valkiunas, 2004). C'est la lignée la plus commune en Europe et, dans la région de Montpellier, en France, elle infecte jusqu'à 80% de certaines espèces d'oiseaux (données non publiées de R. Pigeault; Dimitrov et al., 2010; Ventim et al., 2012). Durant mon doctorat, j'ai utilisé une lignée de parasites SGS1 isolée en octobre 2016 sur des mésanges bleues, *Parus caeruleus*, à Montpellier. Elle a été maintenue en laboratoire par des passages successifs entre canaris sains, *Serinus canaria*, par injection intrapéritonéale avec un passage régulier par moustiques. *C. pipiens* est le principal vecteur en

Europe (*C. pipiens pipiens*) et en Amérique (*C. pipiens quinquefasciatus*) et la lignée Slab que j'ai utilisée pendant ma thèse est maintenue en laboratoire. L'utilisation du vecteur naturel permet de s'affranchir des difficultés rencontrées avec le modèle murin où les effets observés peuvent être biaisés par la nouveauté de l'association parasite-vecteur (association artificielle avec *An. stephensi*).



**Figure 2 :** Cycle de vie de *Plasmodium relictum*. Les stades et le parcours du parasite sont représentés en orange, les organes de l'hôte en gris et le système sanguin en rose.

## Chapitres 1 et 2 : impact des antipaludiques sur le vecteur

Le paludisme a été la cible d'une lutte intense décrite précédemment qui vise à diminuer la transmission de la maladie. La lutte a inclus le développement d'insecticides et répulsifs visant le vecteur soit en le tuant soit en le repoussant pour stopper la transmission. D'autre part, des vaccins sont en développement pour bloquer directement la transmission en cas de piqûre. Enfin, la lutte a aussi visé directement le parasite en réduisant le nombre de stades transmissibles aux vecteurs grâce aux médicaments antipaludiques. Or, les médicaments ciblent des chaînes métaboliques importantes pour le parasite qui pourraient aussi avoir un rôle crucial au moment de la fécondation, dans les oocystes ou dans les sporozoïtes, toutes ces étapes se déroulant dans le vecteur.

Certaines études se sont intéressées à l'effet qu'ont les antipaludéens sur ces différentes étapes et stades de développement parasite pour estimer leur potentiel pour bloquer la transmission (Butcher, 1997; Delves et al., 2012; Shute and Maryion, 1954; Terzian, 1970; Terzian et al., 1949; Wadi et al., 2019). Actuellement, la majorité des études se concentrent sur les effets gamétocytocides des médicaments (Delves et al., 2018; Ruecker et al., 2014). En effet, les gamétocytes sont particulièrement intéressants pour bloquer la transmission puisqu'à ce stade il y a un important goulot d'étranglement pour les parasites et qu'ils peuvent être ciblés directement

dans le sang humain. Dans la plupart des études l'inhibition des gamétocytes n'est que partielle, ne réussissant pas à bloquer la transmission (Churcher et al., 2013; Sanders et al., 2014) et risquant même de l'augmenter en réduisant les effets de l'infection sur les vecteurs. En effet, des moustiques avec une charge en oocystes plus faible pourraient survivre plus longtemps que ceux avec une charge parasitaire forte, et donc être des vecteurs plus compétents pour transmettre le paludisme (Sinden, 2010). Pour réduire ce risque, il a été proposé d'associer les gamétocytocides avec des sporonticides, c'est-à-dire des molécules qui ciblent les stades se développant dans le moustique (Blagborough et al., 2013; Paaijmans and Fernández-Busquets, 2014; Sinden, 2010). Cependant, les effets sporonticides des antipaludiques actuels sont très peu connus, car dans les protocoles les plus utilisés, le médicament est administré dans le repas sanguin infectant. Ce protocole ne permet pas de discriminer les effets gamétocytocides des effets sporonticides (Delves et al., 2018; Wadi et al., 2018). L'objectif des chapitres 1 et 2 est de mesurer les effets de médicaments antipaludiques sur la transmission de la maladie en s'intéressant spécifiquement à leurs effets sur les stades parasitaires dans le vecteur mais aussi sur le vecteur lui-même. Ces expériences ont été réalisées en utilisant la malaria aviaire comme modèle expérimental (le parasite *P. relictum*, l'hôte vertébré *Serinus canaria*, et le vecteur *Culex pipiens*).

Dans le **Chapitre 1**, j'ai choisi de m'intéresser à deux antipaludiques avec une importance majeure dans la lutte contre la maladie actuellement : l'artésunate (AS) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP). Les effets gamétocytocides de ces deux molécules ont été précédemment étudiés (résumé dans Butcher, 1997; Wadi et al., 2019). AS a des effets cytocides contre les gamétocytes matures et immatures *in vitro* (Chotivanich et al., 2006; Peatey et al., 2012). Les résultats concernant SP sont beaucoup moins clairs. Certaines études ne montrent pas d'effet de SP sur les gamétocytes (Miguel-Blanco et al., 2015; Plouffe et al., 2016), alors que d'autres montrent une inhibition de la formation des gamétocytes mâles dans les hôtes traités avec SP (Delves et al., 2012, 2013). Une autre étude de Buckling et al. en 1999 montre que la pyriméthamine seule provoque une augmentation de la production de gamétocytes, potentiellement comme une réponse du parasite au stress infligé par le médicament. Dans ce chapitre, j'ai cherché à établir si la présence d'AS ou de SP dans un repas sanguin pris par des moustiques préalablement infectés, pouvait arrêter ou diminuer le développement des oocystes et/ou des sporozoïtes ; mais aussi à déterminer l'effet de ces médicaments sur les traits d'histoire de vie du vecteur en lien avec la transmission du paludisme (fécondité, longévité et taille du repas sanguin). Ce chapitre cherchait à répondre aux questions suivantes : 1.1) l'artésunate et la sulfadoxine-pyriméthamine ont-ils un impact sur les stades parasitaires dans le vecteur ? 1.2) ces deux antipaludiques ont-ils des effets sur les traits d'histoire de vie du moustique en lien avec la transmission de *Plasmodium* ? Ce chapitre a été accepté dans le journal International Journal for Parasitology.

Dans le **Chapitre 2**, j'ai essayé de comprendre les résultats surprenants obtenus dans le chapitre 1 lorsque des moustiques se nourrissent sur un hôte traité avec SP. En effet, le Chapitre 1 a montré que l'ingestion de SP dans un repas sanguin par un moustique préalablement infecté par *P. relictum* diminue fortement la prévalence et la charge en sporozoïtes. Les effets du médicament sur l'infection du moustique par *Plasmodium sp.* pourraient être dus à une modification chez le vecteur ou le parasite. Dans ce chapitre, j'explore les potentiels effets sur le vecteur via une étude sur le microbiome bactérien et le transcriptome du tube digestif du vecteur lorsqu'il prend un repas sanguin contenant de la SP. Il a été montré que les antibiotiques contenus dans le repas sanguins ont un effet sur le microbiome des moustiques et que ces bactéries interagissent avec *Plasmodium* (Gendrin et al., 2015). L'étude de transcriptomique permet d'identifier les différences d'expression de gènes en lien avec l'infection, par exemple ceux impliqués dans l'immunité lorsque le repas sanguin contient de la SP. Ce chapitre cherchait à répondre aux questions suivantes : 2.1) SP a-t-il un effet sur le microbiome du tube digestif du vecteur ? 2.2) SP a-t-il un effet sur l'expression des gènes du vecteur dans son tube digestif, en particulier sur des gènes liés à l'infection par *Plasmodium* ?

### *Chapitres 3 et 4 : effets pléiotropiques de la résistance aux antipaludiques*

Dans la deuxième partie de ma thèse, je m'intéresse aux conséquences de l'évolution de résistances sur la transmission de *Plasmodium*. L'évolution de la résistance aux médicaments représente, non seulement un problème majeur en santé publique et animale, mais aussi l'un des exemples les mieux documentés d'évolution en temps réel (Andersson and Hughes, 2010; Andersson and Levin, 1999; Davies and Davies, 2010; Laxminarayan et al., 2013). Les résistances sont causées par des mutations réduisant l'efficacité du médicament, soit en modifiant la cible du médicament, soit en empêchant la rencontre entre la molécule curative et sa cible (Longley and Johnston, 2005). Une fois apparues, ces mutations se répandent rapidement car elles augmentent de façon significative la valeur sélective du pathogène en présence du médicament.

*P. falciparum* est une espèce particulièrement virulente pour l'homme, elle est donc une cible privilégiée lors du développement de nouvelles molécules antipaludiques. Au sein de cette espèce, il existe des génotypes résistants pour chacun des médicaments utilisés actuellement et des génotypes qui sont multi-résistants, c'est-à-dire résistants à plusieurs molécules antipaludiques (WHO, 2019). Ces résistances émergent dans des zones où les médicaments sont utilisés fréquemment et se répandent ensuite rapidement à d'autres zones géographiques. Par exemple, les résistances à la chloroquine, à la pyriméthamine et à la méfloquine ont émergé dans le Sud-Est asiatique et se sont rapidement répandues jusqu'en Afrique (Hamilton and Stevens, 2017). Les ACTs étant les thérapies les plus efficaces actuellement, la propagation des mutations responsables des résistances aux ACTs dans des zones de forte transmission entrainerait un

problème majeur en santé publique. Il est donc essentiel de comprendre les pressions de sélections ayant un rôle dans l'évolution et la propagation de la résistance aux antipaludéens.

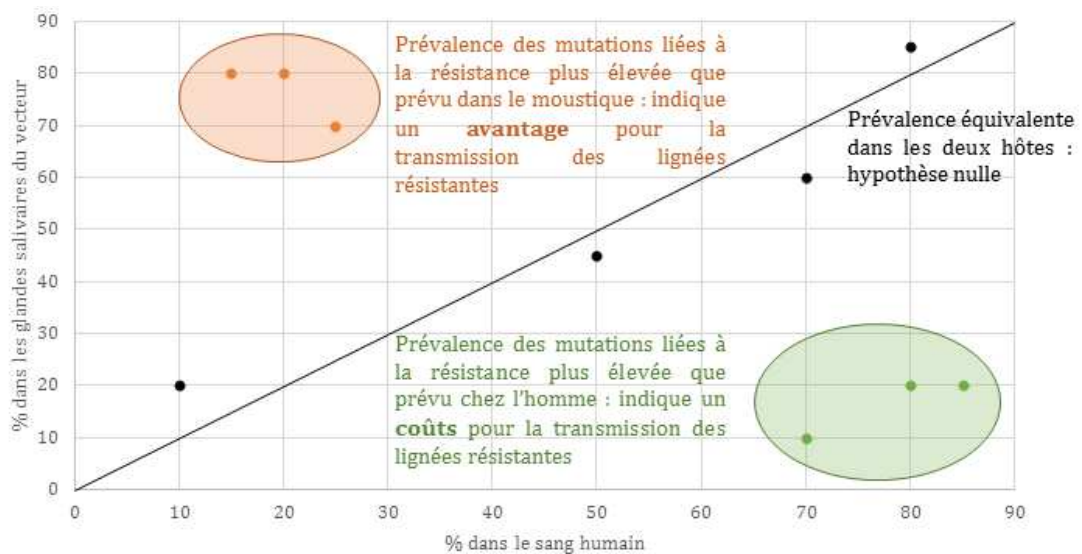
La propagation des génotypes résistants aux médicaments est liée à des facteurs que nous contrôlons, comme l'utilisation de différentes thérapies, mais aussi à des facteurs sur lesquels nous n'avons pas de contrôle, comme les coûts biologiques associés à une mutation sur une fonction essentielle au parasite (Andersson and Levin, 1999; Hastings and Donnelly, 2005). Dans le cas du paludisme, les médicaments ciblent des voies métaboliques nécessaires à sa survie (détoxification de l'hématine, synthèse d'ADN et d'acides aminés, activités mitochondriales, régulation du stress oxydatif ; Paul M O'Neill et al., 2010; "Vidal," 2017). La persistance et la propagation de parasites résistants dépend de l'équilibre entre les bénéfices apportés et les coûts associés à ce trait adaptatif. Si les premiers sont évidents et facilement quantifiables (augmentation de la survie du parasite en présence de médicaments), les coûts liés aux mutations en absence de molécules curatives sont encore largement méconnus. Dans le cas du paludisme, ces coûts pourraient être forts puisque, chez les hommes en absence du médicament ou lorsque son utilisation est plus fragmentaire dans le temps, la prévalence des allèles de résistance diminue rapidement (Laufer and Plowe, 2004; Ord et al., 2007). Les coûts s'exprimant en absence de médicaments, ils peuvent se révéler non seulement dans l'hôte vertébré, mais aussi chez le vecteur. Dans le premier, les coûts associés à la résistance ont été étudiés avec une approche expérimentale notamment avec le modèle des rongeurs (De Roode et al., 2004; Huijben et al., 2010; Wargo et al., 2007), tandis que dans le vecteur ils restent aujourd'hui largement inexplorés. Le but des Chapitres 3 et 4 a été de quantifier les coûts associés à la résistance aux antipaludéens chez l'hôte vertébré, mais aussi chez l'hôte invertébré. Dans le **Chapitre 3**, j'ai cherché à caractériser le **développement intra-hôte et la virulence**, de parasites résistants à l'AS en utilisant un modèle de laboratoire, la malaria aviaire. J'ai suivi le cycle et la virulence de parasites sélectionnés expérimentalement dans notre laboratoire à la fois dans les oiseaux mais aussi dans le vecteur naturel de cette lignée de parasites. Ce chapitre cherchait à répondre aux questions suivantes : 3.1) Peut-on faire évoluer la résistance à l'artésunate dans un *Plasmodium* non-humain ? 3.2) Est-ce que le phénotype de résistance à l'artésunate observé chez l'homme (un retard dans le parasite clearance) est le même pour la malaria aviaire ? 3.3) Est-ce que la résistante comporte des coûts chez l'hôte vertébré ? 3.4) Est-ce que la résistance comporte des couts chez le vecteur ?

Dans le **Chapitre 4**, j'ai travaillé sur un modèle de terrain pour déterminer la fréquence des mutations associées à la résistance à des antipaludéens chez *P. falciparum* dans les deux compartiments hôtes, **l'homme et le moustique**. Une différence de fréquence de ces mutations entre ces compartiments peut indiquer la présence de coûts. En effet, théoriquement tous les parasites présents dans le sang du vertébré devraient se transmettre au vecteur. Mais les mutations liées à la résistance aux antipaludéens pourraient induire un coût sur la transmission



et la capacité d'invasion du vecteur comme cela a déjà été vu avec l'atovaquone (Fig. 3 ; Goodman et al., 2016). Ce chapitre cherchait à répondre aux questions suivantes : 4.1) y a-t-il une différence de prévalence des allèles de résistance entre l'homme et les vecteurs dans des zones de forte transmission ? 4.2) le suivi des allèles de résistance dans l'humain est-il suffisant pour prédire leur propagation ?

La thèse se finit par une discussion générale dans laquelle je discute des implications des résultats des 4 chapitres dans le choix des stratégies médicamenteuses pour lutter contre le paludisme et réduire les risques d'émergence et de propagation des parasites résistants.



**Figure 3 :** Différents résultats possibles de la comparaison de la prévalence d'une mutation liée à la résistance à un antipaludéen donné dans les échantillons de sang et les glandes salivaires des moustiques collectés sur un même site.

## Bibliographie :

- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., D'Alessandro, U., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* doi:10.1186/1475-2875-10-144
- Afrane, Y.A., Little, T.J., Lawson, B.W., Githeko, A.K., Yan, G., 2008. Deforestation and vectorial capacity of *Anopheles gambiae* giles mosquitoes in malaria transmission, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1533–1538. doi:10.3201/eid1410.070781
- Aikawa, M., Beaudoin, R.L., 1968. Studies on nuclear division of a malarial parasite under pyrimethamine treatment. *J. Cell Biol.* 39, 749–754. doi:10.1083/jcb.39.3.749
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271. doi:10.1038/nrmicro2319
- Andersson, D.I., Levin, B.R., 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 489–493. doi:10.1016/S1369-5274(99)00005-3
- Ashley, E.A., Dhorda, M., Fairhurst, R.M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J.M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C.M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runcharoen, R., Hien, T.T., Thuy-Nhien, N.T., Thanh, N. V., Phu, N.H., Htut, Y., Han, K.-T., Aye, K.H., Mokuolu, O.A., Olaosebikan, R.R., Folaranmi, O.O., Mayxay, M., Khanthavong, M., Hongvanthong, B., Newton, P.N., Onyamboko, M.A., Fanello, C.I., Tshefu, A.K., Mishra, N., Valecha, N., Phyo, A.P., Nosten, F., Yi, P., Tripura, R., Borrmann, S., Bashraheil, M., Peshu, J., Faiz, M.A., Ghose, A., Hossain, M.A., Samad, R., Rahman, M.R., Hasan, M.M., Islam, A., Miotto, O., Amato, R., Macinnis, B., Stalker, J., Kwiatkowski, D.P., Bozdech, Z., Jeeyapant, A., Cheah, P.Y., Sakulthaew, T., Chalk, J., Intharabut, B., Silamut, K., Lee, S.J., Vihokhern, B., Kunasol, C., Imwong, M., Tarning, J., Taylor, W.J., Yeung, S., Woodrow, C.J., Flegg, J.A., Das, D., Smith, J., Venkatesan, M., Plowe, C. V., Stepniewska, K., Guerin, P.J., 2014. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med* 371, 411–23. doi:10.1056/NEJMoa1314981
- Balint, G.A., 2001. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol. Ther.* 90, 261–265. doi:10.1016/S0163-7258(01)00140-1
- Barreaux, A.M.G., Barreaux, P., Thievent, K., Koella, J.C., 2016. Larval environment influences vector competence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *MalariaWorld J.* 7.
- Bartelloni, P.J., 1967. Combined therapy for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infection. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 199, 173. doi:10.1001/jama.1967.03120030077013
- Beaudoin, R.L., Strome, C.P.A., Huff, C.G., 1967. Persistence of pyrimethamine resistance in the exoerythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Exp. Parasitol.* 20, 156–159. doi:10.1016/0014-4894(67)90034-3
- Beavogui, A.H., Djimde, A.A., Gregson, A., Toure, A.M., Dao, A., Coulibaly, B., Ouologuem, D., Fofana,



- B., Sacko, A., Tekete, M., Kone, A., Niare, O., Wele, M., Plowe, C. V., Picot, S., Doumbo, O.K., 2010. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Mali. *Int. J. Parasitol.* 40, 1213–1220. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.010
- Bishop, A., 1962. An analysis of the development of resistance to proguanil and pyrimethamine in *Plasmodium gallinaceum*. *Parasitology* 52, 495–518. doi:10.1080/00034983.1947.11685333
- Blagborough, A.M., Churcher, T.S., Upton, L.M., Ghani, A.C., Gething, P.W., Sinden, R.E., 2013. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. *Nat. Commun.* 4, 1–7. doi:10.1038/ncomms2840
- Briët, O.J.T., Dossou-Yovo, J., Akodo, E., Van De Giesen, N., Teuscher, T.M., 2003. The relationship between *Anopheles gambiae* density and rice cultivation in the savannah zone and forest zone of Côte d'Ivoire. *Trop. Med. Int. Heal.* 8, 439–448. doi:10.1046/j.1365-3156.2003.01054.x
- Brown, K.M., Costanzo, M.S., Xu, W., Roy, S., Lozovsky, E.R., Hartl, D.L., 2010. Compensatory mutations restore fitness during the evolution of dihydrofolate reductase. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2682–2690. doi:10.1093/molbev/msq160
- Bruce-Chwatt, L.J., 1988. Three hundred and fifty years of the Peruvian fever bank. *Br. Med. J.* 296, 1486–1487.
- Buckling, A., Crooks, L., Read, A., 1999. *Plasmodium chabaudi*: effect of antimalarial drugs on gametocytogenesis. *Exp. Parasitol.* 93, 45–54. doi:10.1006/EXPR.1999.4429
- Burrows, J.N., Burlot, E., Campo, B., Cherbuin, S., Jeanneret, S., Leroy, D., Spangenberg, T., Waterson, D., Wells, T.N., Willis, P., 2014. Antimalarial drug discovery - the path towards eradication. *Parasitology* 141, 128–139. doi:10.1017/S0031182013000826
- Butcher, G., 1997. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int. J. Parasitol.* 27, 975–987.
- Capanna, E., 2006. Battista Grassi: a zoologist for malaria. *Contrib. to Sci.* 3, 187–195. doi:10.2436/cs.v0i0.340
- Chotivanich, K., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., Looareesuwan, S., Day, N.P.J., Coleman, R.E., White, N.J., 2006. Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1927–1930. doi:10.1128/AAC.01472-05
- Christophides, G.K., 2005. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell. Microbiol.* 7, 325–333. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00495.x
- Churcher, T.S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A.L., Basáñez, M.G., 2013. Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife* e00626. doi:10.7554/eLife.00626

- Churchill, F.C., Mount, D.L., Patchen, L.C., Björkman, A., 1986. Isolation, characterization and standardization of a major metabolite of amodiaquine by chromatographic and spectroscopic methods. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 377, 307–318. doi:10.1016/S0378-4347(00)80786-0
- Churchill, F.C., Patchen, L.C., C. Campbell, C., Schwartz, I.K., Nguyen-Dinh, P., Dickinson, C.M., 1985. Amodiaquine as a prodrug: importance of metabolite(s) in the antimalarial effect of amodiaquine in humans. *Life Sci.* 36, 53–62. doi:10.1016/0024-3205(85)90285-1
- Coatney, G.R., 1963. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 121–128.
- Cogswell, F.B., 1992. The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* doi:10.1128/CMR.5.1.26
- Cowman, A.F., Galatis, D., Thompson, J.K., 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 91, 1143–1147.
- Cox, F.E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors* 3, 5. doi:10.1186/1756-3305-3-5
- Croft, A.M., 2007. Developing safe antimalaria drugs: key lessons from mefloquine and halofantrine. *Int. J. Risk Saf. Med.* 19, 153–161.
- Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L., Rosenthal, P.J., 2006. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3124–3131. doi:10.1128/AAC.00394-06
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi:10.1128/membr.00016-10
- De Roode, J.C., Culleton, R., Bell, A.S., Read, A.F., 2004. Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar. J.* 3, 33. doi:10.1186/14752875333
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E.A., Sinden, R.E., Leroy, D., 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* 9. doi:10.1371/journal.pmed.1001169
- Delves, M.J., Miguel-Blanco, C., Matthews, H., Molina, I., Ruecker, A., Yahiya, S., Straschil, U., Abraham, M., León, M.L., Fischer, O.J., Rueda-Zubiaurre, A., Brandt, J.R., Cortés, Á., Barnard, A., Fuchter, M.J., Calderón, F., Winzeler, E.A., Sinden, R.E., Herreros, E., Gamo, F.J., Baum, J., 2018. A high throughput screen for next-generation leads targeting malaria parasite transmission. *Nat. Commun.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41467-018-05777-2
- Delves, M.J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M.J., Herreros, E.,

- Sinden, R.E., 2013. Male and Female *Plasmodium falciparum* Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3268–3274. doi:10.1128/AAC.00325-13
- Dimitrov, D., Zehtindjiev, P., Bensch, S., 2010. Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. *Acta Parasitol.* 55, 201–209. doi:10.2478/s11686-010-0029-z
- Dobson, M.J., 1999. The malariology centenary. *Parassitologia* 41, 21–32.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J.N., 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 361, 455–467. doi:10.1086/657120
- Dutta, G.P., Bajpai, R., Vishwakarma, R.A., 1989. Artemisinin (Qinghaosu) - A new gametocytocidal drug for malaria. *Chemotherapy* 35, 200–207.
- Dutta, G.P., Mohan, A., Tripathi, R., 1990. Study of the gametocytocidal/sporontocidal action of Qinghaosu (Artemisinin) by electron microscopy. *J. Parasitol.* 76, 849. doi:10.2307/3282804
- Enayati, A., Hemingway, J., 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 569–591. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085423
- Facchinelli, L., North, A.R., Collins, C.M., Menichelli, M., Persampieri, T., Bucci, A., Spaccapelo, R., Crisanti, A., Benedict, M.Q., 2019. Large-cage assessment of a transgenic sex-ratio distortion strain on populations of an African malaria vector. *Parasites and Vectors* 12, 70. doi:10.1186/s13071-019-3289-y
- Fairhurst, R.M., 2015. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis.* 28, 417–425. doi:10.1097/QCO.000000000000199.Understanding
- Fix, A.S., Waterhouse, C., Greiner, E.C., Stoskopf, M.K., 1988. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J. Wildl. Dis.* 24, 610–619. doi:10.7589/0090-3558-24.4.610
- Foley, M., Tilley, L., 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.* 79, 55–87. doi:10.1016/S0163-7258(98)00012-6
- Gendrin, M., Rodgers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouédraogo, J.B., Basáñez, M.G., Cohuet, A., Christophides, G.K., 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat. Commun.* 6, 1–7. doi:10.1038/ncomms6921
- Goodman, C.D., Siregar, J.E., Mollard, V., Vega-rodríguez, J., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Matsuzaki,

- M., Toyama, T., Sturm, A., Cozijnsen, A., Jacobs-lorena, M., Kita, K., Marzuki, S., Mcfadden, G.I., 2016. Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science* (80-. ). 352, 349–353. doi:10.5061/dryad.6kn23
- Grassi, B., Bignami, A., Bastjanelli, G., 1899. Medical zoology: further researches upon the cycle of human malaria in the body of the mosquito. *Ind. Med. Gaz.* 34, 104.
- Greenwood, B., 2009. Can malaria be eliminated? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103S, S2–S5. doi:10.1016/j.trstmh.2008.10.027
- Gregson, A., Plowe, C. V., 2005. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57, 117–145. doi:10.1124/pr.57.1.4
- Grotendorst, C.A., Kumar, N., Carter, R., Kaushal, D.C., 1984. A surface protein expressed during the transformation of zygotes of *Plasmodium gallinaceum* is a target of transmission-blocking antibodies. *Infect. Immun.* 45, 775–777. doi:10.1128/iai.45.3.775-777.1984
- Gutiérrez-López, R., Martínez-De La Puente, J., Gangoso, L., Soriguer, R., Figuerola, J., 2020. *Plasmodium* transmission differs between mosquito species and parasite lineages. *Parasitology* 147, 441–447. doi:10.1017/S0031182020000062
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., 2017. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. *Am. Trypanos. Chagas Dis.* 321–344. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00015-0
- Hastings, I.M., Donnelly, M.J., 2005. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist. Updat.* 8, 43–50. doi:10.1016/j.drug.2005.03.003
- Hay, S.I., Guerra, C.A., Tatem, A.J., Noor, A.M., Snow, R.W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(04)01043-6
- Hemingway, J., Ranson, H., Magill, A., Kolaczinski, J., Fornadel, C., Gimnig, J., Coetzee, M., Simard, F., Roch, D.K., Hinzoumbe, C.K., Pickett, J., Schellenberg, D., Gething, P., Hoppé, M., Hamon, N., 2016. Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet* 387, 1785–1788. doi:10.1016/S0140-6736(15)00417-1
- Henderson, D.A., 1998. Eradication: lessons from the past. *Bull. World Health Organ.* 76, 7–21.
- Hien, D.F. d. S., Dabiré, K.R., Roche, B., Diabaté, A., Yerbanga, R.S., Cohuet, A., Yameogo, B.K., Gouagna, L.C., Hopkins, R.J., Ouedraogo, G.A., Simard, F., Ouedraogo, J.B., Ignell, R., Lefevre, T., 2016. Plant-mediated effects on mosquito capacity to transmit human malaria. *PLoS Pathog.* 12. doi:10.1371/journal.ppat.1005773
- Holstein, M.H., WHO, 1954. *Biology of Anopheles gambiae. Research in French West Africa* . doi:10.1086/401366
- Hopkins Sibley, C., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., Plowe, C. V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., Nzila, A.M., 2001. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in

- Plasmodium falciparum*: what's next? *TRENDS Parasitol.* 17, 582–588.
- Huff, C.G., Marchbank, D.F., Shiroishi, T., 1958. Changes in infectiousness of malarial gametocytes. II. Analysis of the possible causative factors. *Exp. Parasitol.* 7, 399–417. doi:10.1016/0014-4894(58)90036-5
- Huijben, S., Nelson, W.A., Wargo, A.R., Sim, D.G., Drew, D.R., Read, A.F., 2010. Chemotherapy, within host ecology and the fitness of drug resistant malaria parasites. *Evolution (N. Y.)*. 64, 2952–2968. doi:10.1111/j.15585646.2010.01068.x
- Johnson, N.P., Mueller, J., 2002. “Spanish” influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.* 105–115.
- Kain, K.C., 2003. Current status and replies to frequently posed questions on atovaquone plus proguanil (Malarone®) for the prevention of malaria. *BioDrugs* 17, 23–28. doi:10.2165/00063030-200317001-00006
- Kitchen, L.W., Vaughn, D.W., Skillman, D.R., 2006. Role of US military research programs in the development of US food and drug administration–approved antimalarial drugs. *Clin. Infect. Dis.* 43, 67–71. doi:10.1086/504873
- Klayman, D.L., 1985. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science (80- )*. 228, 1049–1055.
- Knowles, R., Das Gupta, B.M., 1932. A study of monkey-malaria, and its experimental transmission to man. *Ind. Med. Gaz.* 67, 301.
- Kumar, A., Katiyar, S., Agarwal, A., Chauhan, P., 2003. Perspective in antimalarial chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 10, 1137–1150. doi:10.2174/0929867033457494
- Laufer, M.K., Plowe, C. V., 2004. Withdrawing antimalarial drugs: Impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist. Updat.* 7, 279–288. doi:10.1016/j.drug.2004.08.003
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions, *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- Lefèvre, T., Ohm, J., Dabiré, K.R., Cohuet, A., Choisy, M., Thomas, M.B., Cator, L., 2018. Transmission traits of malaria parasites within the mosquito: genetic variation, phenotypic plasticity, and consequences for control. *Evol. Appl.* 11, 456–469. doi:10.1111/eva.12571
- Lefèvre, T., Vantaux, A., Dabiré, K.R., Mouline, K., Cohuet, A., 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9, e1003365. doi:10.1371/journal.ppat.1003365
- Lengeler, C., 2009. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* doi:10.1002/14651858.cd000363.pub2

- Longley, D.B., Johnston, P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275–292. doi:10.1002/path.1706
- Looareesuwan, S., Viravan, C., Webster, H.K., Kyle, D.E., Hutchinson, D.B., Canfield, A.J., 1996. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 54, 62–66.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J., 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 261–273. doi:10.1016/j.ympev.2007.11.012
- Miguel-Blanco, C., Lelièvre, J., Delves, M.J., Bardera, A.I., Presa, J.L., López-Barragán, M.J., Ruecker, A., Marques, S., Sinden, R.E., Herreros, E., 2015. Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3298–3305. doi:10.1128/AAC.04684-14
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* doi:10.1038/415673a
- Miller, O.B., Herrmann, F., Rubin, J., 1950. The effects of mepacrine hydrochloride (Atabrine) upon the human skin. *J. Invest. Dermatol.* 15, 445–452. doi:10.1038/jid.1950.127
- Mok, S., Ashley, E.A., Ferreira, P.E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T.T., Htut, Y., Faiz, M.A., Onyamboko, M.A., Mayxay, M., Newton, P.N., Tripura, R., Woodrow, C.J., Miotto, O., Kwiatkowski, D.P., Nosten, F., Day, N.P.J., Preiser, P.R., White, N.J., Dondorp, A.M., Fairhurst, R.M., Bozdech, Z., 2015. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science* (80-. ). 347.
- Molina-Cruz, A., Zilversmit, M.M., Neafsey, D.E., Hartl, D.L., Barillas-Mury, C., 2016. Mosquito vectors and the globalization of *Plasmodium falciparum* malaria. *Annu. Rev. Genet.* 50, 447–465. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035211
- Nájera, J.A., González-Silva, M., Alonso, P.L., 2011. Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). *PLoS Med.* doi:10.1371/journal.pmed.1000412
- Nosten, F., Luxemburger, C., Ter Kuile, F.O., Woodrow, C., Pa Eh, J., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N.J., 1994. Treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination. *J. Infect. Dis.* 170, 971–977. doi:10.1093/infdis/170.4.971
- Nosten, F., ter Kuile, F.O., Luxemburger, C., Woodrow, C., Kyle, D.E., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N.J., 1993. Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine, *The Lancet.* doi:10.1016/0140-6736(93)92412-M



- Nurse, G.T., 1981. Fansidar-resistant falciparum malaria in Papua New Guinea. *Lancet*. doi:10.1177/105960118501000301
- Nzila, A., 2006. The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1043–1054. doi:10.1093/jac/dkl104
- O'Neill, Paul M., Barton, V.E., Ward, S.A., 2010. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules* 15, 1705–1721. doi:10.3390/molecules15031705
- O'Neill, Paul M., Barton, V.E., Ward, S.A., 2010. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules* 15, 1705–1721. doi:10.3390/molecules15031705
- O'Neill, P.M., Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A., Kevin Park, B., 1998. 4-Aminoquinolines - Past, present, and future: A chemical perspective. *Pharmacol. Ther.* 77, 29–58. doi:10.1016/S0163-7258(97)00084-3
- Ohm, J.R., Baldini, F., Barreaux, P., Lefevre, T., Lynch, P.A., Suh, E., Whitehead, S.A., Thomas, M.B., 2018. Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasites and Vectors*. doi:10.1186/s13071-018-2761-4
- Ohr, C., Richie, T.L., Widjaja, H., Shanks, G.D., Fitriadi, J., Fryauff, D.J., Handschin, J., Tang, D., Sandjaja, B., Tjitra, E., Hadiarso, L., Watt, G., Wignall, F.S., 1997. Mefloquine compared with doxycycline for the prophylaxis of malaria in Indonesian soldiers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 126, 963–972. doi:10.7326/0003-4819-126-12-199706150-00006
- Olliaro, P., Nevill, C., LeBras, J., Ringwald, P., Mussano, P., Garner, P., Brasseur, P., 1996. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet* 348, 1196–1201. doi:10.1016/S0140-6736(96)06217-4
- Ord, R., Alexander, N., Dunyo, S., Hallett, R., Jawara, M., Targett, G., Drakeley, C.J., Sutherland, C.J., 2007. Seasonal carriage of *pfprt* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J. Infect. Dis.* 196, 1613–1619. doi:10.1086/522154
- Paaijmans, K., Fernández-Busquets, X., 2014. Antimalarial drug delivery to the mosquito: an option worth exploring? *Futur. Microbiol* 9, 579–582. doi:10.2217/FMB.14.30
- Packard, R.M., 1997. Malaria dreams: postwar visions of health and development in the third world. *Med. Anthropol.* 17, 279–296. doi:10.1080/01459740.1997.9966141
- Peatey, C.L., Leroy, D., Gardiner, D.L., Trenholme, K.R., 2012. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malar. J.* 11, 34. doi:10.1186/1475-2875-11-34
- Peters, P.J., Thigpen, M.C., Parise, M.E., Newman, R.D., 2007. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf.* 30, 481–501. doi:10.2165/00002018-

200730060-00003

- Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E., 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria, Proc. Nati. Acad. Sci. USA.
- Phyo, A.P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E.A., Nair, S., McGready, R., Moo, C.L., Al-Saai, S., Dondorp, A.M., Lwin, K.M., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., White, N.J., Anderson, T.J.C., Nosten, F., 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study. Lancet 379, 1960–1966. doi:10.1016/S0140-6736(12)60484-X
- Plouffe, D.M., Wree, M., Du, A.Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S.L., Flannery, E.L., Kato, N., Tanaseichuk, O., Comer, E., Zhou, B., Kuhlen, K., Zhou, Y., Leroy, D., Schreiber, S.L., Scherer, C.A., Vinetz, J., Winzeler, E.A., 2016. High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. Cell Host Microbe 19, 114–126. doi:10.1016/j.chom.2015.12.001
- Powell, R.D., DeGowin, R.L., McNamara, J. V., 1967. Clinical experience with sulphadiazine and pyrimethamine in the treatment of persons experimentally infected with chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 61, 396–408. doi:10.1080/00034983.1967.11686505
- Price, R.N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S., 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet 364, 438–447.
- Raghavendra, K., Barik, T.K., Reddy, B.P.N., Sharma, P., Dash, A.P., 2011. Malaria vector control: from past to future. Parasitol. Res. 108, 757–779. doi:10.1007/s00436-010-2232-0
- Reddy, M.R., Overgaard, H.J., Abaga, S., Reddy, V.P., Caccone, A., Kiszewski, A.E., Slotman, M.A., 2011. Outdoor host seeking behaviour of Anopheles gambiae mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. Malar. J. 10, 1–10. doi:10.1186/1475-2875-10-184
- Richards, W.H.G., 1971. The combined action of pyrimidines and sulfonamides or sulfones in the chemotherapy of malaria and other protozoal infections. Adv. Pharmacol. 8, 121–147. doi:10.1016/S1054-3589(08)60595-5
- Ridley, R.G., 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. Nature. doi:10.1038/415686a
- Rieckmann, K.H., 1971. Determination of the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. JAMA J. Am. Med. Assoc. 217, 573–578. doi:10.1001/jama.217.5.573
- Rieckmann, K.H., Frances, S.P., Kotecka, B.M., Cooper, R.D., Shanks, G.D., Sweeney, A.W., Edstein, M.D., 1990. Army malaria institutes - its evolution and achievements thir ecade (2nd half): 1990-1995.



- Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C., Meunier, B., 2005. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *PNAS* 102, 13676–13680.
- Ross, R., 1905. *Researches on malaria*, John Bale, ed. London.
- Ruecker, A., Mathias, D.K., Straschil, U., Churcher, T.S., Dinglasan, R.R., Leroy, D., Sinden, R.E., Delves, M.J., 2014. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7292–7304. doi:10.1128/AAC.03666-14
- Russell, T.L., Govella, N.J., Azizi, S., Drakeley, C.J., Kachur, S.P., Killeen, G.F., 2011. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar. J.* 10, 80. doi:10.1186/1475-2875-10-80
- Sallares, R., Bouwman, A., Anderung, C., 2004. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med. Hist.* 48, 311–328. doi:10.1017/S0025727300007651
- Sanchez, C.P., McLean, J.E., Rohrbach, P., Fidock, D.A., Stein, W.D., Lanzer, M., 2005. Evidence for a pfCRT-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* 44, 9862–9870. doi:10.1021/bi050061f
- Sanchez, C.P., McLean, J.E., Stein, W., Lanzer, M., 2004. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 43, 16365–16373. doi:10.1021/bi048241x
- Sanders, N.G., Sullivan, D.J., Mlambo, G., Dimopoulos, G., Tripathi, A.K., 2014. Gametocytocidal screen identifies novel chemical classes with *Plasmodium falciparum* transmission blocking activity. *PLoS One* 9, e105817. doi:10.1371/journal.pone.0105817
- Schlagenhauf, P., Tschopp, A., Johnson, R., Nothdurft, H.D., Beck, B., Schwartz, E., Herold, M., Krebs, B., Veit, O., Allwinn, R., Steffen, R., 2003. Tolerability of malaria chemoprophylaxis in non-immune travellers to sub-Saharan Africa: multicentre, randomised, double blind, four arm study. *Br. Med. J.* 327, 1078–1081. doi:10.1136/bmj.327.7423.1078
- Schlitzer, M., 2007. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* 2, 944–986. doi:10.1002/cmdc.200600240
- Schmidt, L.H., Crosby, R., Rasco, J., Vaughan, D., 1978. Antimalarial activities of various 4-quinolinemethanols with special attention to WR-142,490 (mefloquine). *Antimicrob. Agents Chemother.* 13, 1011–1030. doi:10.1128/AAC.14.3.292
- Sharma, B.S., 1990. Vector-borne diseases, in: *Progress in Drug Research/Fortschritte Der Arzneimittelforschung/ Progrès Des Recherches Pharmaceutiques*. pp. 365–485.
- Shortt, H.E., Hamilton Fairley, N., Covell, G., Shute, P.G., Garnham, P.C.C., 1951. The pre-erythrocytic

- stage of *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 44, 405–419. doi:10.1042/etls20170099
- Shrivastava, A.K., Shrestha, L., Prakash, S., Mehta, R.K., 2019. Transgenic mosquitoes fight against malaria: a review. J. Univers. Coll. Med. Sci. 7, 59–65. doi:10.3126/jucms.v7i1.24695
- Shute, P.G., Maryion, M., 1954. The effect of pyrimethamine (Daraprim) on the gametocytes and oocysts of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Trans. R. Soc. Trop. Med. an Hyg. 48, 50–63.
- Sinden, R.E., 2017. Developing transmission-blocking strategies for malaria control. PLoS Pathog. 13, e1006336. doi:10.1371/journal.ppat.1006336
- Sinden, R.E., 2010. A biologist's perspective on malaria vaccine development. Hum. Vaccin. doi:10.4161/hv.6.1.9604
- Sinden, R.E., Carter, R., Drakeley, C., Leroy, D., 2012. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. Malar. J. 11, 1–11. doi:10.1186/1475-2875-11-70
- Singh, B., Sung, L.K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D.J., 2004. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet 363, 1017–1024. doi:10.1016/S0140-6736(04)15836-4
- Singh, S.K., Singh, S., 2014. A brief history of quinoline as antimalarial agents. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 25, 295–302.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. Parasites and Vectors 5, 1–11. doi:10.1186/1756-3305-5-69
- Smith, D.L., Battle, K.E., Hay, S.I., Barker, C.M., Scott, T.W., McKenzie, F.E., 2012. Ross, Macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens. PLoS Pathog. doi:10.1371/journal.ppat.1002588
- Snow, R.W., Lindsay, S.W., Hayes, R.J., Greenwood, B.M., 1988. Permethrin-treated bed nets (mosquito nets) prevent malaria in Gambian children. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 838–842.
- Stephens, J.W.W., 1922. A new malaria parasite of man. Ann. Trop. Med. Parasitol. 16, 383–388. doi:10.1080/00034983.1922.11684331
- Stephens, R., Culleton, R.L., Lamb, T.J., 2012. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. Trends Parasitol. 28, 73–82. doi:10.1016/j.pt.2011.10.006
- Straimer, J., Gnädig, N.F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A.P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Mercereau-Puijalon, O., Benoit-Vical, F., Fairhurst, R.M., Ménard, D., Fidock, D.A., 2014. K13-propeller mutations confer artemisinin

- resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* (80-. ). 2624, 428–431. doi:10.1126/science.1260867
- Suebsaeng, L., Wernsdorfer, W.H., Rooney, W., 1986. Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand, *Bulletin of the World Health Organization*.
- Sullivan, D.J., 2011. Cinchona alkaloids: quinine and quinidine, in: *Treatment and Prevention of Malaria. Milestones in Drug Therapy*. Basel, pp. 1–315. doi:10.1007/978-3-0346-0480-2
- Sweeney, T.R., 1981. The present status of malaria chemotherapy: mefloquine, a novel antimalarial. *Med. Res. Rev.* 1, 281–301. doi:10.1002/med.2610010304
- Ta, T.H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A.I., Ismail, N., Rubio, J.M., 2014. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar. J.* 13, 68. doi:10.1186/1475-2875-13-68
- Talisuna, A.O., Bloland, P., D'Alessandro, U., 2004. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* doi:10.1128/CMR.17.1.235-254.2004
- Terzian, L.A., 1970. A note on the effects of antimalarial drugs on the sporogonous cycle of *Plasmodium cynomolgi* in *Anopheles stephensi*. *Parasitology* 61, 191–194.
- Terzian, L.A., Stahler, N., Weathersby, A.B., 1949. The action of antimalarial drugs in mosquitoes infected with *Plasmodium gallinaceum*. *J. Infect. Dis.* 47–55.
- Thomsen, E.K., Koimbu, G., Mueller, I., Keven, J.B., Pulford, J., Reimer, L.J., Hetzel, M.W., Siba, P.M., Jamea-Maiasa, S., Ura, Y., 2017. Mosquito behavior change after distribution of bednets results in decreased protection against malaria exposure. *J. Infect. Dis.* 215, 790–797. doi:10.1093/INFDIS
- Thurston, J.P., 1953. *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitol.* 2, 311–332.
- Tun, K.M., Imwong, M., Lwin, K.M., Win, A.A., Hlaing, T.M., Hlaing, T., Lin, K., Kyaw, M.P., Plewes, K., Faiz, M.A., Dhorda, M., Cheah, P.Y., Pukrittayakamee, S., Ashley, E.A., Anderson, T.J.C., Nair, S., McDew-White, M., Flegg, J.A., Grist, E.P.M., Guerin, P., Maude, R.J., Smithuis, F., Dondorp, A.M., Day, N.P.J., Nosten, F., White, N.J., Woodrow, C.J., 2015. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect. Dis.* 15, 415–421. doi:10.1016/S1473-3099(15)70032-0
- Tuteja, R., 2007. Malaria - An overview. *FEBS J.* doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x
- Uwimana, A., E. Legrand, B. H. Stokes, J. L. M. Ndikumana, M. Warsame, N. Umulisa, D. Ngamije, T. Munyaneza, J. B. Mazarati, K. Munguti, P. Campagne, A. Criscuolo, F. Ariey, M. Murindahabi, P. Ringwald, D. A. Fidock, A. Mbituyumuremyi, and D. Menard. 2020. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* 1–7. *Nature Research*.
- Vale, N., Moreira, R., Gomes, P., 2009. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 937–953. doi:10.1016/j.ejmech.2008.08.011

- Valkiunas, G., 2004. Distribution, in: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. pp. 127–142.
- Ventim, R., Ramos, J.A., Osório, H., Lopes, R.J., Pérez-Tris, J., Mendes, L., 2012. Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitol. Res.* 111, 637–645. doi:10.1007/s00436-012-2880-3
- Vidal [WWW Document], 2017. URL <https://www.vidal.fr/>
- Vincke, I.H., 1970. The effects of pyrimethamine and sulphormethoxine on the pre-erythrocytic and sporogonous cycle of *Plasmodium berghei berghei*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* (1920). 50, 339–358.
- Vittor, A.Y., Gilman, R.H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T., Lozano, W.S., Pinedo-Cancino, V., Patz, J.A., 2006. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 3–11. doi:10.4269/ajtmh.2006.74.3
- Wadi, I., Anvikar, A.R., Nath, M., Pillai, C.R., Sinha, A., Valecha, N., 2018. Critical examination of approaches exploited to assess the effectiveness of transmission-blocking drugs for malaria. *Future Med. Chem.* 10, 2619–2639. doi:10.4155/fmc-2018-0169
- Wadi, I., Nath, M., Anvikar, A.R., Singh, P., Sinha, A., 2019. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Med. Chem.* 11, 3047–3088. doi:10.4155/fmc-2019-0225
- Waller, R.F., Mcfadden, G.I., 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of Apicomplexan parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 57–80.
- Wang, P., Read, M., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., 1997. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol. Microbiol.* 23, 979–986. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2821646.x
- Wargo, A.R., Huijben, S., De Roode, J.C., Shepherd, J., Read, A.F., 2007. Competitive release and facilitation of drugresistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *PNAS* 104, 19914–19919. doi:doi\_10.1073\_pnas.0707766104
- Watt, G., Loesuttivibool, L., Shanks, G.D., Boudreau, E.F., Brown, A.E., Pavanand, K., Webster, H.K., Wechgritaya, S., 1992. Quinine with tetracycline for the treatment of drug-resistant falciparum malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 108–111. doi:10.4269/ajtmh.1992.47.108
- Wesche, D.L., Schuster, B.G., Wang, W.X., Woosley, R.L., 2000. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 521–529. doi:10.1067/mcp.2000.106127
- White, N.J., 1996. The treatment of malaria. *N. Engl. J. Med.* 335, 801.
- White, N.J., Hien, T.T., Nosten, F.H., 2015. A Brief History of Qinghaosu. *Trends Parasitol.*

doi:10.1016/j.pt.2015.10.010

- White, N.J., Ho, M., 1992. The Pathophysiology of malaria. *Adv. Parasitol.* 31, 83–173.  
doi:10.1016/S0065-308X(08)60021-4
- White, N.J., Imwong, M., 2012. Relapse, in: Hay, S.I., Price, R., Baird, J.K. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 113–150. doi:10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5
- WHO, 2019. *World Malaria Report 2019*. Geneva.
- WHO, 2016. *Ebola situation report - June 2016*. World Heal. Organ. 1–2.
- WHO, 2015. *Guidelines for the treatment of malaria - third edition*. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01179.x
- Wilke, A.B.B., Beier, J.C., Benelli, G., 2018. Transgenic Mosquitoes – Fact or Fiction? *Trends Parasitol.* 34, 456–465. doi:10.1016/j.pt.2018.02.003
- Witkowski, B., Khim, N., Chim, P., Kim, S., Ke, S., Kloeung, N., Chy, S., Duong, S., Leang, R., Ringwald, P., Dondorp, A.M., Tripura, R., Benoit-Vical, F., Berry, A., Gorgette, O., Ariey, F., Barale, J.C., Mercereau-Puijalon, O., Menard, D., 2013. Reduced artemisinin susceptibility of plasmodium falciparum ring stages in western cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 914–923. doi:10.1128/AAC.01868-12
- Woodward, R.B., Doering, W.E., 1945. The total synthesis of quinine. *J. Am. Chem. Soc.* 67, 860–874.
- Wu, Y., Sinden, R.E., Churcher, T.S., Tsuboi, T., Yusibov, V., 2015. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product, Academic. ed, *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/bs.apar.2015.04.001
- Yasuoka, J., Levins, R., 2007. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 450–460. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.450
- Yeh, E., DeRisi, J.L., 2011. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* 9, 1001138. doi:10.1371/journal.pbio.1001138
- Zietz, B.P., Dunkelberg, H., 2004. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 165–178. doi:10.1078/1438-4639-00259

## Chapitre 1

# The transmission-blocking effects of antimalarial drugs revisited: fitness costs and sporonticidal effects of artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine

Accepté pour publication dans *International Journal for Parasitology*

**The transmission-blocking effects of antimalarial  
drugs revisited: fitness costs and sporontocidal  
effects of artesunate  
and sulfadoxine-pyrimethamine**

Villa M<sup>1\*</sup>, Buysse M<sup>1,2</sup>, Berthomieu A<sup>1,2</sup>, Rivero A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>MIVEGEC (CNRS – IRD – Université de Montpellier)

<sup>2</sup>CREES (Centre d'Écologie et Évolution de la Santé), Montpellier

911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier, France

\*Corresponding author (manon.villa@ird.fr)

Declaration of interests: none

Note: Supplementary data associated with this article



## Abstract

Assays used to evaluate the transmission-blocking activity of antimalarial drugs are largely focused on their potential to inhibit or reduce the infectivity of gametocytes, the blood stages of the parasite that are responsible for the onward transmission to the mosquito vector. For this purpose, the drug is administered concomitantly with the gametocyte-infected blood, and the results are evaluated as the % reduction in the number of oocysts in the mosquito midgut.

We report the results of a series of experiments that explore the transmission-blocking potential of two key antimalarial drugs, artesunate (AS) and sulfadoxine-pyrimethamine (SP), when administered to mosquitoes already infected from a previous blood meal. For this purpose, uninfected mosquitoes and mosquitoes carrying a 6-day old *Plasmodium relictum* infection (early oocyst stages) are allowed to feed either on a drug-treated or an untreated host in a fully factorial experiment. This protocol allows us to bypass the gametocyte stages and establish whether the drugs have a sporontocidal effect, i.e. whether they are able to arrest the ongoing development of oocysts and sporozoites, as would be the case when a mosquito takes a post-infection treated blood meal. In a separate experiment, we also explore whether a drug-treated blood meal impacts key life history traits of the mosquito relevant for transmission, and if this depends on their infection status.

Our results show that feeding on an AS- or SP-treated host has no epidemiologically relevant effects on the fitness of infected or uninfected mosquitoes. In contrast, when infected mosquitoes feed on an SP-treated host, we observe both a significant increase in the number of oocysts in the midgut, and a drastic decrease in both sporozoite prevalence (-30%) and burden (-80%) compared to the untreated controls. We discuss the potential mechanisms underlying these seemingly contradictory results and contend that, provided the results are translatable to human malaria, the potential epidemiological and evolutionary consequences of the current preventive use of SP in malaria-endemic countries could be substantial.

**Keywords:** transmission-blocking interventions, vaccines, antimalarial drugs, avian malaria

# 1. Introduction

Synthetic antimalarial drugs are the mainstay for the prevention and treatment of malaria throughout the world. Although the prime purpose for these antimalarials is to prevent or cure the infection of the patients, it has become rapidly obvious that they can also be used to reduce the prevalence of the disease in the population by reducing the onward transmission of the parasite by the vector (Sinden et al., 2012; Wadi et al., 2019). The transmission-blocking effect of antimalarial drugs can take place in three different, albeit non-exclusive, ways. Firstly, drugs may be able to kill, arrest the maturation, alter the sex ratio or reduce the infectivity of gametocytes, the sexual stages of the parasite that are present in the blood and are responsible for the transmission to the mosquito. Secondly, drugs may have a sporontocidal effect, i.e. they may be able to hinder the sporogonic cycle of the parasite within the mosquito. *Plasmodium* development inside the mosquito is complex and involves the fusion of male and female gametocytes to form a zygote, the passage of the mobile zygote through the midgut wall to form an 'oocyst' that grows, undergoing successive mitosis, ruptures and releases thousands of 'sporozoites' that migrate to the salivary glands. Antimalarial drugs, or their metabolites, can find their way to the mosquito midgut where they can block the parasite either directly, by being toxic to any of the above stages of the parasite, or indirectly, by disturbing the fine-tuned mosquito physiological pathways that are essential for parasite development (Sinden et al., 2012). Finally, just as some antimalarials have unwanted secondary effects in the host, so they may be able to adversely affect key life history traits of the mosquito essential for parasite transmission such as its longevity or host seeking behaviour.

To date, the majority of experimental studies have focused on the gametocytocidal effects of antimalarial drugs (Ruecker et al., 2014; Delves et al., 2018). Gametocytes are an attractive target for transmission-blocking interventions because they constitute an important bottleneck in the life cycle of the parasite and can be directly targeted due to their presence in the bloodstream of the host. While some of the available compounds may be able to achieve a 100% gametocyte inhibition, and thus completely block the transmission cycle, many of the compounds being tested result in a partial, if at times substantial, gametocyte reductions (Sanders et al., 2014). Partial reductions may, however, fail to accurately reflect the degree to which the mosquitoes become infected (Churcher et al., 2013; Sinden, 2017), and may even end up enhancing transmission due to higher mosquito survival rates associated with lower oocyst burdens (Sinden, 2010). It has therefore been argued that interventions that aim to target gametocytes should be combined with others that target the later stages of parasite development within the mosquito (Sinden, 2010; Blagborough et al., 2013; Paaijmans and Fernández-Busquets, 2014). Whether antimalarial drugs have an effect on oocyst or sporozoite development, however, is still largely unknown, as most protocols provide the drug with the infected

blood meal thereby conflating the effects on the gametocytes with the effects on the later stages (Delves et al., 2018; Wadi et al., 2018).

Current WHO advice for the treatment of malaria in endemic countries relies heavily on the use of two synthetic antimalarial drugs: artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine (WHO, 2019). Artesunate (henceforth AS), a potent and fast-acting artemisinin derivative, is used as a treatment for severe/complicated malaria, or in combination with longer-acting antimalarial drugs such as sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine or mefloquine for the treatment of children and adults with uncomplicated malaria (WHO, 2019). Sulfadoxine-pyrimethamine (henceforth SP), on the other hand, is recommended in areas with moderate to high malaria transmission for the intermittent preventive treatment (ITP) of pregnant women and infants (0-1 years) and, in areas of high seasonal transmission, for the seasonal malaria chemoprevention (SMC) of young children (<5 years of age, WHO, 2019). Each year, millions of people throughout the world get treated by one of these drugs (WHO, 2019). Sulfadoxine and pyrimethamine act synergistically to inhibit the activity of dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), respectively, thus inhibiting the folic acid metabolism of the parasite (Peterson et al., 1988). They are both long-lasting drugs, with plasma concentrations being found up to 42 days post treatment (Karunajeewa et al., 2009).

The gametocytocidal potential of both drugs has been the subject of numerous studies (review in Butcher, 1997; Wadi et al., 2019). AS has a demonstrated cytotoxic activity against mature and immature gametocytes *in vitro* (Chotivanich et al., 2006; Peatey et al., 2012). Evidence of the gametocytocidal effects of SP, on the other hand, is contradictory. Certain studies have found that SP has no gametocidal activity (Miguel-Blanco et al., 2015; Plouffe et al., 2016), others that SP inhibits male gametocyte formation (Delves et al., 2012, 2013) and yet others that pyrimethamine administration results in an increased gametocyte production, possibly as an adaptive response of the parasite to stressful conditions (Schneider et al., 2018).

Here, we report the results from a series of experiments that aim to investigate the transmission-blocking potential of AS and SP downstream from their putative cytotoxic effects on the gametocytes. For this purpose, we performed a series of factorial experiments feeding infected and uninfected mosquitoes either on drug-treated or control hosts. Experiments are carried out using the avian malaria parasite, *Plasmodium relictum* and its natural vector, the mosquito *Culex quinquefasciatus*, one of the few available systems in which these experiments are both technically and ethically possible. In order to bypass the gametocytocidal effects of the drug, the 'infected' mosquitoes were exposed to the drug while carrying a 6-day old infection from a previous blood meal (corresponding the early oocyst stages, Pigeault, 2015). Under our standard laboratory conditions, 5-6 days is the average length of the *Cx quinquefasciatus* gonotrophic cycle.

Avian malaria has played a key historical role in the study of human malaria, being a stimulus for the development of medical parasitology (Rivero and Gandon, 2018). It has played a particularly pivotal role in the screening and clinical testing of the first synthetic antimalarials (Hewitt, 1940; Coatney et al., 1953; Rivero and Gandon, 2018) and in the study of their potential use as transmission-blocking compounds (Ramakrishnan et al., 1963; Gerberg, 1971; Terzakis, 1971). Compared with rodent malaria, the avian malaria system has the added advantage of using the parasite's natural vector in the wild, the mosquito *Culex pipiens*, thereby sidestepping the issues associated with mosquito-parasite combinations without a common evolutionary history (Cohuet et al., 2006; Dong et al., 2006).

Our aims were to establish: 1) whether drugs administered to infected mosquitoes arrest the ongoing development of oocysts and/or sporozoites, and 2) whether the drugs have an effect on the fitness of infected and uninfected mosquitoes. Our results provide insights into the multiplicity of effects that a given drug may have in the different stages of the parasite's sporogonic cycle. We discuss the potential epidemiological and evolutionary consequences of using AS and SP to reduce transmission of *Plasmodium* in the field.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Mosquito and parasite protocols**

All experiments were carried out using a laboratory strain of *Culex pipiens quinquefasciatus* (SLAB strain). *Culex* mosquitoes are the most important natural vector of avian malaria in Europe and the Americas (Vézilier et al., 2010). The larvae in all the experiments were reared at a constant density per tray (n=300 larvae) following previously published laboratory protocols (Vézilier et al., 2010). Larval trays (n=22) were placed individually inside an "emergence cage" (40 cm x 28 cm x 31 cm) and emerged adults were allowed to feed *ad libitum* on a 10% glucose water solution. Rearing and experiments took place at our standard insectary conditions (24-26 °C, 60-80% RH, and 12:12 L:D photoperiod).

*Plasmodium relictum* (lineage SGS1) is the aetiological agent of the most prevalent form of avian malaria in Europe. The parasite lineage was isolated from blue tits (*Parus caeruleus*) collected in the Montpellier area in October 2016 and subsequently passaged to naïve canaries (*Serinus canaria*) by intraperitoneal injection. Since then, it has been maintained by carrying out regular passages between our stock canaries through intraperitoneal injections with the occasional passage through the mosquito.

### **2.2. Impact of antimalarials on Plasmodium-infected and uninfected mosquito traits**

The purpose of these experiments was to establish whether feeding from a sulfadoxine-pyrimethamine (SP) or an artesunate (AS) treated host can negatively influence mosquito traits such as longevity and fecundity. For this purpose, two separate experiments were set up (see Figure 1A).

### 2.2.1. Sulfadoxine-pyrimethamine experiment

To obtain infected and uninfected mosquitoes to use in the experiment, 200 female mosquitoes were placed in a cage containing either an infected (parasitemia: 1.21%, 2.01%, 4.43% and 4.57%) or an uninfected bird (n=4 and n=3 cages of infected and uninfected birds respectively). Infected birds were obtained by injecting them with 100µL of blood from our *P. relictum*-infected canary stock. Mosquito blood feeding took place 10 days after the injection, to coincide with the acute phase of the *Plasmodium* infection in the blood (Cornet et al., 2014; Pigeault et al., 2015). After the blood meal, which took place overnight, the bird was taken out of the cage, unfed mosquitoes were discarded and engorged mosquitoes were provided with a 10% sugar solution. Three days later, a tray with water was placed inside the cage to allow egg laying (and hence the completion of the mosquito's gonotrophic cycle). Seven days post blood meal (pbm) 20 mosquitoes were haphazardly chosen from each of the 4 cages having contained an infected bird, and were dissected under a binocular microscope to verify the existence of *Plasmodium* oocysts in their midgut using mercurochrome staining. These dissections confirmed that the large majority of the mosquitoes (91 %) had become infected. The average number of oocysts in mosquitoes sampled from each of the cages were  $214.76 \pm 46.76$ ,  $76.88 \pm 23.29$ ,  $40.05 \pm 9.61$  and  $12.07 \pm 2.75$ .

To explore the impact of SP on the fecundity and longevity of mosquitoes, infected and uninfected mosquitoes were allowed to take a second blood meal on either an SP-treated or a control bird (Figure 1). For this purpose, four days prior to the blood meal, 3 birds (henceforth SP-treated birds) had a daily subcutaneous injection of 30 µl of a sulfadoxine-pyrimethamine solution (Sigma S7821 and 46706, 320 mg/kg sulfadoxine, 16 mg/kg pyrimethamine solubilized in DMSO) while 3 additional (control) birds were injected with 30 µl of DMSO. The concentrations given to the birds were higher than the standard human dose (c.a. 30 mg/kg sulfadoxine, 1.5mg/kg pyrimethamine) to account for differences in metabolism (birds have a higher basal metabolic rate than humans) and mode of administration (oral in humans, peritoneal injection in birds). The red blood cell count of birds (number of red blood cells per ml of blood) was quantified immediately before the blood meal using flow cytometry (Beckman Coulter Counter, Series Z1). One hour after the last injection, 100 infected and 80 uninfected mosquitoes were placed in a cage containing either an SP-treated or a control bird. To allow the identification of the infected and uninfected mosquitoes, they were previously marked using a small amount (2.5 µg/female) of coloured fluorescent powder (RadGlo® JST) as a dust storm. Preliminary trials have shown that, at this concentration, the dust has no effect on mosquito traits (Vézilier et al., 2012). On day 1 pbm, the number of blood-fed mosquitoes in each

of the cages was counted and unfed females discarded. Cages containing infected and uninfected mosquitoes were alternated in the shelves and regularly rotated to ensure uniform environmental conditions.

To quantify haematin (a proxy for blood meal size) and fecundity, 80 females from each cage (40 infected and 40 uninfected) were haphazardly chosen and placed individually in numbered 30 ml *Drosophila* tubes, covered with a mesh ('haematin tubes'). Food was provided in the form of a paper strip soaked in a 10% glucose solution. Three days later (day 4 pbm), all mosquitoes were transferred to a new tube containing 7 mL of mineral water to allow the females to lay their eggs ('fecundity tube'). The amount of haematin excreted at the bottom of each tube was quantified as an estimate of the blood meal size following previously published protocols (Vézilier et al. 2010). The fecundity tubes were provided with a paper strip soaked with 10% sugar solution. The fecundity tubes were checked daily for 4 consecutive days for the presence of eggs. The egg laying date was recorded and egg rafts were photographed using a binocular microscope equipped with a numeric camera. Eggs counted using the Mesurim Pro freeware (Academie d'Amiens, France).

To quantify longevity, the rest of the infected and uninfected mosquitoes were kept in the cages and provided *ad libitum* drinking water, as well as with a tray of water for egg laying for the first 6 days. Survival of these mosquitoes was assessed daily by counting dead individuals lying at the bottom of each cage until all females died.

#### 2.2.2. Artesunate experiment

The protocol used was identical to the one used in the SP experiment with only a few minor modifications. The parasitaemias of the birds used to infect the mosquitoes for this experiment were 5.62%, 6.5%, 7.81% and 9.99%. Here, four days prior to the blood meal, 3 birds (henceforth AS-treated birds) had a subcutaneous injection of 50  $\mu$ l of an artesunate solution (16 mg/kg artesunate, Sigma A3731, in a 50mg/kg bicarbonate solution) twice daily (9am and 6pm) while 3 additional (control) birds were injected with 50  $\mu$ l of the bicarbonate solution. As in the previous experiment, mosquito dissections confirmed that the large majority of the *Plasmodium* mosquitoes (95 %) were indeed infected. The average number of oocysts in mosquitoes sampled from each of the cages were (513.3  $\pm$  98.28, 590  $\pm$  191.47, 649.78  $\pm$  133.73 and 38.11  $\pm$  20.49).

### 2.3. Impact of antimalarials on *Plasmodium* infection within the mosquito

The purpose of these experiments was to establish whether antimalarial drugs can have an effect on the development of *Plasmodium* within the mosquito. For this purpose we infected mosquitoes following an identical protocol as above. The parasitaemias of the birds used to infect the mosquitoes were 1.58%, 1.79%, 2.27%, 3.12%, 3.25% and 4.72%. We then allowed these previously-infected mosquitoes to feed on either SP-treated, AS-treated or control birds (n=3 birds each, 80



mosquitoes per cage, see Figure 1B). At the time of feeding, mosquitoes had been infected for 6 days from a previous blood meal. Protocols used to infect mosquitoes and treat the birds were identical to those used in the two previous experiments (Figure 1).

To assess the impact of the drugs in the blood meal on the *Plasmodium* parasites developing within the mosquitoes, 15-20 mosquitoes were haphazardly chosen from each cage at three different intervals: 8-9 days, 11-12 days and 14 days post-infection (corresponding to 2-3 days, 5-6 days and 8 days after the treated blood meal). Based on previous results (Pigeault, 2015) these intervals correspond to the expected peak oocyst numbers, start of sporozoite production and peak sporozoite production, respectively. At each of these time points, each mosquito was dissected to count the number of oocysts in the midgut under the microscope, and its head-thorax was preserved individually at -20°C for the quantification of the sporozoites. Midguts were dissected under a binocular microscope in 100 µl of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS). The dissected midguts were transferred with a pin to a slide containing a drop of PBS with 5% mercurochrome. The slide was observed under a phase contrast microscope equipped with a 40x oil immersion objective. Sporozoites were quantified using real-time quantitative PCR as the ratio of the parasite's *cytb* gene relative to the mosquito's *ace-2* gene (Zélé et al. 2014). As in the other experiments a large majority of the mosquitoes were infected (82%-87%).

#### **2.4. Statistical analyses**

Analyses were carried out using the R statistical package (v3.4.4). The different statistical models used are described in the Supplementary Materials (Tables S1 & S2). The general procedure to build models was as follows: treatment (AS, SP, control), and infection status (infected/uninfected) were fitted as fixed explanatory variables. Birds were fitted as a random effect. Where appropriate, haematin and dissection day were introduced into the model as an additional fixed variable. Since we observed differences between the different plates used for the colorimetric quantification of the haematin (Vézilier et al., 2010) the models were fitted with the haematin residuals of a model containing haematin as a response variable and plate as a fixed explanatory variable. Maximal models, including all higher order interactions, were simplified by sequentially eliminating non-significant terms and interactions to establish a minimal model. The significance of the explanatory variables was established using a likelihood ratio test (LRT) which is approximately distributed as a chi-square distribution (Bolker, 2008) and using  $p = 0.05$  as a cut-off p-value.

Survival data were analyzed using Cox proportional hazards mixed effect models (coxme). Proportion data (blood-fed females, egg laying females, oocyst and sporozoite burden) were analyzed using mixed linear models and a binomial distribution. Response variables that were highly



overdispersed (number of eggs per raft, oocyst burden) were analyzed using mixed negative binomial models (glmmTMB). *A posteriori* contrasts were carried out by aggregating factor levels together and by testing the fit of the simplified model using a LRT (Crawley, 2007) or using the 'emmeans' package in R (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/vignettes/comparisons.html>). Because of the small number of replications, differences in red blood cell counts between the birds in the different treatments were tested using Kruskal-Wallis non-parametric tests. Raw data have been deposited in the MendeleyData open repository ([doi: 10.17632/phzy3tmbzm.1](https://doi.org/10.17632/phzy3tmbzm.1)).

## 2.5. Ethics statement

Bird manipulations were carried out in strict accordance with the “National Charter on the Ethics of Animal Experimentation” of the French Government. Experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation established by the authors’ institution (CNRS) under the auspices of the French Ministry of Education and Research (permit number CEEA- LR-1051).

The authors declare no conflict of interests.

# 3. Results

## 3.1. Impact of antimalarials on *Plasmodium*-infected and uninfected mosquito traits

Mosquitoes were provided either with a *Plasmodium*-infected or an uninfected meal. Six days later (corresponding to the early oocyst stages (Sekar et al., 2020, submitted) they were provided with a second (uninfected) blood meal which was either treated with SP, AS, or their untreated controls (Figure 1A). The aim of the experiments was to establish whether the drugs have an impact on the life history traits of the mosquitoes (i.e. fecundity, longevity) and if this depends on whether the mosquito is infected or not.

### 3.1.1. Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) experiment

The vast majority of mosquitoes (97-100%) blood fed, independently of whether they were provided with an SP-treated or a control bird (model 1,  $\chi^2= 0.1306$ ,  $p = 0.7178$ , Figure S1A) and of their infection status (model 1,  $\chi^2=3.1086$ ,  $p = 0.0779$ ). The amount of blood ingested (quantified as the amount of haematine excreted) was also similar across experimental conditions (model 2, *treatment*:  $\chi^2 = 0.6545$ ,  $p = 0.4185$ ; *infection*:  $\chi^2 = 0.0001$ ,  $p = 0.9802$ , Figure S1B). There was no difference in the haematocrit of SP-treated and untreated birds (model 3,  $\chi^2 = 0.4286$ ,  $p = 0.5127$ ).

The probability of laying an egg raft was overall very high (85-95%) except for infected mosquitoes feeding on control birds (65%, model 4, *treatment\*infection*:  $\chi^2 = 11.372$ ,  $p = 0.001$ , see

Supplementary Materials, Figure S1D). Overall, females having fed in SP treated birds laid eggs earlier than those fed on control birds (model 5, LR.stat = 10.243,  $p = 0.001$ ). Egg laying date also depended on the interaction between blood meal size and the infection status of the mosquito (model 5, LR.stat = 7.2853,  $p = 0.007$ , Figure S1C). While for infected females blood meal size had no impact on oviposition day, uninfected females who took larger blood meals laid eggs earlier than those who took a smaller blood meals (LR.stat = 6.7296,  $p = 0.0094$ ). Mosquito fecundity (number of eggs per raft) decreased with egg laying date (model 6,  $\chi^2 = 15.808$ ,  $p < 0.001$ ) but was independent of both treatment (model 6,  $\chi^2 = 0.2478$ ,  $p = 0.6186$ ) and infection status (model 6,  $\chi^2 = 0.1048$ ,  $p = 0.7462$ , Figure S1E),

Uninfected mosquitoes lived longer than their infected counterparts (model 7,  $\chi^2 = 7.4768$ ,  $p = 0.006$ ). Although statistically significant, this effect was biologically marginal (HR = 0.79, i.e. uninfecteds have 21% higher chance of survival than their uninfected counterparts, CI: 0.1 - 34%). Treatment with SP had no effect on survival (model 7,  $\chi^2 = 0.0557$ ,  $p = 0.8134$ , Figure S1F). The results were identical when analyzing survival to day 14, the time at which sporozoite production peaks (model 8).

### 3.1.2. Artesunate (AS) experiment -

As above, the vast majority of mosquitoes (95-98%) blood fed, independently of whether they were provided with an AS-treated or a control bird (model 9,  $\chi^2 = 2.4543$ ,  $p = 0.1172$ , Figure S2A) and of their infection status (model 9,  $\chi^2 = 0.1085$ ,  $p = 0.7418$ ). The amount of blood ingested was also similar across experimental conditions (model 10, *treatment*:  $\chi^2 = 0.0009$ ,  $p = 0.4185$ ; *infection*:  $\chi^2 = 0.787$ ,  $p = 0.375$ , Figure S2B). There was no difference in the haematocrit of AS-treated and untreated birds (model 11,  $\chi^2 = 1.4727$ ,  $p = 0.2888$ ).

The probability of laying an egg raft was overall very high (81-88%). As in the SP experiment, infected mosquitoes had a slightly lower chance of laying eggs than their uninfected counterparts, though here this effect was dependent of whether they had fed on a treated or an untreated bird (model 12,  $\chi^2 = 4.3911$ ,  $p = 0.0361$ , Figure S2D). For mosquitoes feeding on AS-treated birds, the probability of laying an egg raft depended heavily on the amount of blood ingested: treated females that took a small blood meal saw their probability of laying eggs significantly reduced (mean  $\pm$  s.e probability of egg laying for treated females in the lowest blood meal quartile:  $55.4 \pm 6.7$  %, in the highest blood meal quartile:  $92.6 \pm 3.0$  %). No such difference was found in mosquitoes that fed on untreated birds (lowest quartile:  $78.2 \pm 5.6$  %, highest quartile  $85.5 \pm 4.8$  % ; model 12, *treatment\*haematine*:  $\chi^2 = 8.0323$ ,  $p = 0.0046$ , see Supplementary Materials, Figure S2D). The egg laying date was independent of the treatment (model 13, LR.stat = 0.203,  $p = 0.6523$ ) but was negatively correlated with the size of the blood meal: females that took smaller blood meals laid eggs later (model 13, LR.stat = 12.498,  $p < 0.001$ , Figure S2C). Mosquito fecundity (number of eggs per

raft) increased with blood meal size (model 14,  $\chi^2 = 36.875$ ,  $p < 0.001$ , Figure S2E) but was independent of both treatment (model 14,  $\chi^2 = 0.2784$ ,  $p = 0.5978$ ) and infection status ( $\chi^2 = 0.9796$ ,  $p = 0.3223$ ).

Neither the artesunate treatment (model 15,  $\chi^2 = 0.0577$ ,  $p = 0.8102$ ) nor the mosquito infection status (model 15,  $\chi^2 = 0.3266$ ,  $p\text{-value} = 0.5677$ ) had an impact on overall mosquito survival (Figure S2F). The results were identical when analyzing survival to day 14, the time at which sporozoite production peaks (model 16).

### **3.2. Impact of antimalarials on *Plasmodium* infection within the mosquito**

Mosquitoes were provided with a *Plasmodium*-infected meal. Six days later, when the infection was in the early oocyst stages, they were allowed to feed on uninfected birds that had been previously treated with either SP, AS, or given a solvent injection (DMSO as a control for SP, bicarbonate as a control for AS, Figure 1B). The aim of the experiments was to establish whether the drugs have an impact on the development of the parasite within the mosquito. For this purpose the mosquitoes were dissected at different time intervals and the number of oocysts in the midgut, and of sporozoites in the head-thorax fraction were quantified.

#### **3.2.1. Sulfadoxine-Pyrimethamine experiment**

The prevalence of oocysts decreased with dissection time (model 17,  $\chi^2 = 14.843$ ,  $p < 0.01$ ), but was independent of the antimalarial treatment (model 17,  $\chi^2 = 2.7322$ ,  $p = 0.0983$ , Figure 2A). In contrast, there was a very significant interaction between the SP-treatment and the time of dissection on the number of oocysts developing inside the mosquitoes (model 18,  $\chi^2 = 24.159$ ,  $p < 0.01$ , Figure 2C). Although the general trend was towards a decrease in the number of oocysts with time mosquitoes having fed on a SP-treated bird had a consistently higher number of oocysts in their midgut than mosquitoes having fed on their control counterparts. These results are consistent across all the birds used in the experiment (Supplementary Materials, Figure S3 and S4). Fitting day as a continuous (rather than discrete) variable in the model revealed that the rate of decline of oocysts with time was significantly higher in control-fed mosquitoes (incidence rate ratio, IRR = 21%) than in SP-fed mosquitoes (IRR = 9.4%).

Treatment had a significant effect on the prevalence of sporozoites within the mosquitoes (model 20,  $\chi^2 = 10.394$ ,  $p < 0.01$ , Figure 2B). On average, parasites developing in mosquitoes having fed on an SP-treated host had a significantly lower probability of reaching the sporozoite stage than their control counterparts (55% vs 82%, respectively). Sporozoite burden was also significantly lower in mosquitoes having fed on an SP-treated host, irrespective of the dissection date (model 21, *treatment*:  $\chi^2 = 9.8898$ ,  $p < 0.01$ ; *date*:  $\chi^2 = 3.1579$ ,  $p = 0.0762$ ; Figure 2D). As above, these results are consistent across all the birds used in the experiment (Supplementary Materials, Figures S3 and S4).

Fitting day as a continuous (rather than discrete) variable in the model revealed that while in control-fed mosquitoes the number of sporozoites stayed roughly constant with time (slope not significantly different from 0,  $t = 1.66$ ), in SP-treated mosquitoes, the number of sporozoites decreased significantly with time ( $t = 2.41$ ).

### 3.2.2. Artesunate experiment

Feeding on an AS-treated host had no impact on the prevalence of oocysts (model 23,  $\chi^2 = 0.854$ ,  $p$ -value = 0.3554, Figure 3A). Oocyst burden, on the other hand, showed the same pattern of decrease with time as in the previous experiment (model 24,  $\chi^2 = 211.91$ ,  $p < 0.01$ , Figure 3C). There was a significant effect of treatment in interaction with the date of dissection (model 24, date\*treatment:  $\chi^2 = 7.3787$ ,  $p = 0.025$ ). Post hoc analyses revealed the existence of a marginally higher oocyst burden in treated hosts on days 11 and 12 ( $\chi^2 = 3.8886$ ,  $p = 0.05$ ) while no differences were observed in day 8,9 ( $\chi^2 = 0.0106$ ,  $p = 0.9179$ ) and 14 ( $\chi^2 = 3.5452$ ,  $p = 0.0597$ ). Feeding on an AS-treated host, however, had no effect on either sporozoite prevalence (model 25:  $\chi^2 = 0.0106$ ,  $p = 0.9179$ ), or burden (model 26,  $\chi^2 = 0.0002$ ,  $p = 0.9885$ , Figure 3D).

## 4. Discussion

Artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine are the cornerstone of modern antimalarial treatments in malaria-endemic areas. Millions of people across the world are treated every year with these drugs. Both antimalarials are extremely efficient at clearing the parasite from the red blood cells but, like most other drugs, they also come of a suite of adverse effects in humans (Medscape, 2020). The aim of our study was to establish whether this double toxicity, for both *Plasmodium* and its host, also takes place in the vector, thereby interfering on parasite transmission by mosquitoes. More precisely we aimed to establish: 1) whether mosquitoes feeding on an AS or SP treated host suffer any adverse fitness effects from the drugs, and 2) whether the drugs are toxic for the oocysts and sporozoites developing inside a mosquito.

For this purpose, we carried out several factorial experiments feeding both uninfected mosquitoes and mosquitoes with a 6-day old infection (corresponding to the early stages of oocyst formation in *P. relictum*, Pigeault, 2015) on drug treated (AS or SP) and control hosts. We then quantified the life history traits of the mosquito (fecundity, longevity) and the oocyst and sporozoite stages of the parasites developing inside them.

Our results show what seem to be mostly minor effects of the drugs on the life history traits of mosquitoes feeding from a treated host. Amongst the two life history traits quantified that are known to be key for malaria transmission: mosquito longevity (Smith and McKenzie, 2004) and host

feeding probability (Cornet et al., 2019), neither were found to be affected by the drug treatments. Previous work on the longevity effects of drugs has shown that *An. gambiae* mosquitoes membrane-fed on a gametocyte culture containing high concentrations of SP (61 µg/ml sulfadoxine, 154 ng/ml pyrimethamine) had significantly shorter lifespans (Kone et al., 2010). Whether this is due to differences in the experimental system or, more likely, to key differences in experimental conditions (Kone et al added a high SP dose to a gametocyte culture) is unclear. In our experiments, some significant interactions were, however, found that may be worthy of further study. Females that fed on an SP-treated bird laid eggs on average 8 hours earlier than those fed on control birds, a result that agrees with previous studies showing that *Culex pipiens* mosquitoes are able to advance their oviposition schedule when faced with adverse conditions (Vézilier et al., 2015). In addition, mosquitoes taking small blood meals from AS-treated birds saw their probability of laying an egg raft reduced by 37% as compared to their control counterparts. In humans, artesunate use is frequently associated with haemolytic anaemia as evidenced by a decline in blood haemoglobin levels and an increase in reticulocyte counts (Burri et al., 2014; Sowunmi et al., 2017). Had a similar phenomenon taken place in our birds, mosquitoes taking a small blood meal from AS-treated hosts would not have obtained enough haemoglobin to produce a batch of eggs (Ferguson et al., 2003; Zhou et al., 2007; Vézilier et al., 2012). We found no difference in the total number of red blood cells between AS-treated and untreated birds, but since our analysis did not allow us to distinguish between young (reticulocyte) and mature red blood cells, we could not establish whether artesunate induces anaemia in this system.

In contrast to the effects observed on mosquito life history traits which are unlikely to bear significant consequences for the epidemiology of the disease, the substantial reduction in both sporozoite prevalence (- 30%) and burden (- 80%) in mosquitoes fed on an SP-treated blood meal, may result in a drastic reduction in the transmission potential of the parasite. Sulfadoxine and pyrimethamine act synergistically to inhibit the activity of dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), respectively, thus inhibiting the folic acid metabolism of the parasite (Hopkins Sibley et al., 2001). Folic acid is vital for the biosynthesis of purines and pyrimidines, which are essential for DNA synthesis and cell multiplication (Kirk et al., 1976). The mitotic-blocking properties of pyrimethamine were first gleaned through work done on *Plasmodium gallinaceum* where birds treated with high concentrations of pyrimethamine showed arrested schizont division and fewer merozoites were produced (Aikawa and Beaudoin, 1968). Since then, the schizontocidal effect of pyrimethamine has been confirmed in several other systems (Vincke, 1970; Delves et al., 2012). In contrast, work on the effect of pyrimethamine on *Plasmodium* sporogony in the mosquito has produced contrasting results. The overwhelming majority of these studies tested the so-called 'prophylactic' effect of pyrimethamine on the mosquito, that is, the effect of the drug when administered prior to or concomitantly with the infected blood meal (Table 1). These studies

found that when administered with the infected blood meal, pyrimethamine averted the arrival of sporozoites to the salivary gland. There was, however, no consensus on the mechanisms underlying this sporozoite-inhibitory effect: pyrimethamine may have rendered gametocytes uninfected (Foy and Kondi, 1952), prevented the ookinetes from traversing the midgut wall (Bray et al., 1959), or prevented the oocysts from reaching maturity (Terzian et al., 1968; Terzian, 1970). More recent work seems to confirm that pyrimethamine in combination with sulfadoxine, decreases the infectiousness of gametocytes (Beavogui et al., 2010; Kone et al., 2010) and Delves et al. have reported that pyrimethamine and other antifolates result in a strong (> 90%) inhibition of male gametocyte exflagellation, while having virtually no effect on female gametocytes (Delves et al., 2012, 2013) thus effectively strongly skewing the parasites' operational sex ratio. These studies collectively suggest that a prophylactic administration of SP has transmission-blocking effect through the inhibition of the early (gametocyte) stages within the mosquito.

Our experiments were carried out using a 'curative' protocol, i.e. the drug was administered to mosquitoes carrying a 6-day old *Plasmodium* infection which, in this system, corresponds to the initial stages of the oocyst invasion of the midgut. The drastic decrease obtained in both sporozoite prevalence (Fig 2B) and burden (Fig 2D) demonstrate that SP has an additional effect on parasite development, which is downstream from its toxicity to (male) gametes. Although the underlying mechanism remains to be established, these results are consistent with the mitosis-blocking properties of antifolates observed in the blood stages of parasites, which may here have prevented the multiple rounds of cell division that take place inside the syncytial oocyst prior to the liberation of the sporozoites (Gerald et al., 2011). Recent experiments using luciferase-expressing *Plasmodium berghei* parasites cultured *in vitro* (Azevedo et al., 2017) have observed a significant reduction in the luminescence of oocysts after adding 10 $\mu$ M pyrimethamine to the parasite culture. As the luciferase was under the control of the parasite's circumsporozoite protein (*PbCSP*) promoter regions, a reduction in the number of sporozoites produced inside the oocyst therefore seems like a plausible explanation for the observed reduction in bioluminescence. Future studies should focus on the mechanisms underlying the reduction in sporozoite numbers obtained in these experiments. One possible avenue of research is to carry out a full transcriptomic analysis of oocysts, focusing on genes involved in the folate pathway, which is the target of SP and is involved in the synthesis of DNA.

The strong reduction in sporozoite prevalence and burden in SP-fed mosquitoes is all the more notable for being associated with a significant concomitant increase in the number of oocysts in the midgut (Fig 2C). Ookinetes issued from the fusion of male and female gametes in the mosquito midgut, start invading the midgut epithelium 24-48h after the blood meal (Valkiunas, 2004). They then start growing in size as the sporozoites develop inside them. Previous work from our laboratory has shown that the first oocysts are detectable through mercurochrome staining 4-6 days after the



infected blood meal, and mature oocysts reach their peak intensity on days 8-10. On 6 day pbm (day at which the treated blood meal was ingested) on average, only between 30-50% of the mature oocysts found during the peak oocyst intensity (which happens around day 8pbm) are present in the midgut. This leaves a substantial window of opportunity (2-3 days) for the ingested drugs to have an effect on a large fraction of the oocysts developing in the midgut. The mechanisms underlying the increased oocyst intensity observed in mosquitoes having ingested a treated blood meal require further study, but several potential avenues of research are possible. SP may have an effect on oocyst maturation through alterations in the physiology of the mosquito that would affect the composition of mosquito-derived molecules that are essential for *Plasmodium* development, or through a modification of the mosquito microbiota as a result of SP's powerful antibiotic properties (Capan et al., 2010). Antibiotics have been shown to enhance the susceptibility of mosquitoes to *Plasmodium* by disturbing their gut microbiota (Gendrin et al., 2015). Microbiota, however, seem to exert their influence during the ookinete invasion of the midgut (Dong et al., 2009); whether they may also have an effect during the growth and maturation of the oocysts is not known. Further work is needed in order to establish the viability of these supernumerary oocysts. In this system, however, standard human malaria methods to establish oocyst viability are either not reliable (such as oocyst size, as this depends on the state of maturation) or not yet available (as is the case for immune-fluorescence-antibodies). To our knowledge, this is the first time that such an increase in oocysts following a drug-treated blood meal has been reported in any study, which raises some interesting questions regarding the timing of SP administration with respect to the maturation of oocysts in the midgut. In addition, we observed an interesting pattern whereby the decline in oocyst numbers with time, a natural process that takes place as mature oocysts burst to produce sporozoites, happens more rapidly in control-fed than in SP-fed mosquitoes, which may be indicative of a delay in oocyst development in the latter. Other possibilities for the increased oocyst intensity observed, such as an SP-induced immunosuppression or SP-induced facilitation of the of oocyst development within the midgut would also merit further study. Irrespective of the underlying mechanism, our results indicate that SP exerts two opposing effects on the parasite's sporogonic development within the mosquito: one that facilitates the development of oocysts in the midgut, followed by another that blocks the production of sporozoites within them.

In contrast to SP, AS treatment had no discernible effects on sporozoite burden and only a minor effect on the number of oocysts. These results are in agreement with previous work showing that artesunate and other artemisinin derivatives have a considerable gametocytocidal effect in humans but no effect on the mosquito stages of the parasite (Butcher, 1997; Wadi et al., 2019). It is worth noting that previous work using a curative dose of other drugs have obtained drastically different results to the ones we have obtained with SP and AS. A curative dose of atovaquone administered to *An. stephensi* mosquitoes carrying a 4-day old *P. berghei* infection resulted in a



decrease in oocyst numbers without a concomitant decrease in sporozoites (Fowler et al., 1995). Data from *in vitro* experiments suggests that atovaquone inhibition of pyrimidine biosynthesis may prevent meiotic DNA replication in the immature ookinete and its development into the oocyst stage (Fowler et al., 1995). However, given that the treatment was given after the ookinetes had invaded the midgut wall, atovaquone is likely to also negatively impact the process of oocyst maturation in the midgut through, as yet, unknown mechanisms. In contrast, a curative dose of a primaquine-like aminoquinoline, did not affect oocyst numbers but sporozoite production was entirely impaired, possibly by generating reactive oxygen species and/or interfering with the parasite's electron transport chain (Hamerly et al., 2019). These results highlight the need to understand the mechanisms underlying the curative effect of drugs, as a first step towards their potential use as transmission-blocking compounds in the field.

We are acutely aware that the effects of curative administration of SP on oocyst and sporozoite burden may not directly translatable to human malaria. SP is widely used as a preventive treatment for uninfected children (SMC) and pregnant women (IPT), with millions of doses being provided every year across the African continent (Van Eijk et al., 2011). The transmission-blocking effect of a curative administration of SP demonstrated here would be relevant when infected mosquitoes bite these SP-treated individuals (in the field, mosquitoes go through several gonotrophic, bloodmeal - egg laying - bloodmeal, cycles, Bomblies, 2014). To confirm the curative effect of SP in human malaria infections, experiments where infected mosquitoes are membrane-fed on treated uninfected blood could be carried out, with the caveat that membrane feeding and direct feeding on human volunteers may render different results (Butcher, 1989; Beavogui et al., 2010; Wadi et al., 2018). Provided the results obtained here are repeatable in human malaria, the epidemiological and evolutionary consequences of the preventive use of SP in malaria-endemic countries could be substantial. Fewer sporozoite-carrying mosquitoes (-30%), and fewer sporozoites in the salivary gland (-80%) should translate into lower transmission rates, even accounting for a non-linear correlation between sporozoite load and transmission (Aleshnick et al., 2019). The evolutionary consequences may not be less important. Current work largely assumes that the strongest selective pressures for drug resistance operate in the treated host. As these results show, the strong bottleneck for sporozoites in the mosquito may act as an additional selective pressure which may help maintain drug resistance in the field even when the drug is not used to treat infected hosts, as is the case in the current mass administration of pyrimethamine for ITP and SMC. More generally, these results also highlight the need for further studies on the effects of the transmission-blocking compounds on each stage of the parasite's cycle within the mosquito. The results of standard membrane feeding assays, considered to be the gold standard for assessing the efficiency of transmission-blocking interventions, are reported as a percent reduction in the number of oocysts compared to a control (Nunes et al., 2014; Paton et al., 2019), with current efficacy thresholds set at

around an 80% reduction. As shown here, drugs can have contrasting effects on different stages of the parasite's sporogonic cycle highlighting the potential drawbacks of assessing drug-based transmission-blocking interventions based on oocyst quantifications alone.

## **5. Acknowledgements**

We would like to thank Tanguy Lagache for his help with the experiments and Bethsabée Sheid, the Vectopole coordinator. The Vectopole is one of the platforms of the Vectopole Sud network and is funded through the ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). The experiments were funded through the ANR-16-CE35-0001-01 ('EVODRUG') to AR.

## 6. References

- Aikawa, M., Beaudoin, R.L., 1968. Studies on nuclear division of a malarial parasite under pyrimethamine treatment. *J. Cell Biol.* 39, 749–754. doi:10.1083/jcb.39.3.749
- Aleshnick, M., Ganusov, V. V., Nasir, G., Yenokyan, G., Sinnis, P., 2019. Experimental determination of the force of malaria infection reveals a non-linear relationship to mosquito sporozoite loads. *bioRxiv* 1–40. doi:10.1101/830299
- Azevedo, R., Markovic, M., Machado, M., Franke-Fayard, B., Mendes, A.M., Prudêncio, M., 2017. Bioluminescence method for in vitro screening of *Plasmodium* transmission-blocking compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e02699-16.
- Beavogui, A.H., Djimde, A.A., Gregson, A., Toure, A.M., Dao, A., Coulibaly, B., Ouologuem, D., Fofana, B., Sacko, A., Tekete, M., Kone, A., Niare, O., Wele, M., Plowe, C. V., Picot, S., Doumbo, O.K., 2010. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Mali. *Int. J. Parasitol.* 40, 1213–1220. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.010
- Blagborough, A.M., Churcher, T.S., Upton, L.M., Ghani, A.C., Gething, P.W., Sinden, R.E., 2013. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. *Nat. Commun.* 4, 1–7. doi:10.1038/ncomms2840
- Bolker, B.M., 2008. Ecological models and data in R, *Ecological Models and Data in R*. doi:10.1111/j.1442-9993.2010.02210.x
- Bombliès, A., 2014. Agent-based modeling of malaria vectors: the importance of spatial simulation. *Parasites and Vectors* 7, 308. doi:10.1186/1756-3305-7-308
- Bray, R.S., Burgess, R.W., Fox, R.M., Miller, M.J., 1959. Effect of pyrimethamine upon sporogony and pre-erythrocytic schizogony of *Laverania falciparum*. *Bull. World Health Organ.* 21, 233–238.
- Burgess, R.W., Young, M.D., 1959. The development of pyrimethamine resistance by *Plasmodium falciparum*. *Bull. World Health Organ.* 20, 37–46.
- Burri, C., Ferrari, G., Ntuku, H.M., Kitoto, A.T., Duparc, S., Hugo, P., Mitembo, D.K., Lengeler, C., 2014. Short report: Delayed anemia after treatment with injectable artesunate in the Democratic Republic of the Congo: a manageable issue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91, 821–823. doi:10.4269/ajtmh.14-0149
- Butcher, G., 1997. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int. J. Parasitol.* 27, 975–987.
- Butcher, P., 1989. Mechanisms of immunity to malaria and the possibilities of a blood-stage

- vaccine: a critical appraisal. *Parasitology* 98, 315–327. doi:10.1017/S0031182000062247
- Capan, M., Mombo-Ngoma, G., Makristathis, A., Ramharter, M., 2010. Anti-bacterial activity of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: comparative *in vitro* study of sulphadoxine-pyrimethamine, mefloquine, and azithromycin. *Malar. J.* 9, 303. doi:10.1186/1475-2875-9-303
- Chotivanich, K., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., Looareesuwan, S., Day, N.P.J., Coleman, R.E., White, N.J., 2006. Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1927–1930. doi:10.1128/AAC.01472-05
- Churcher, T.S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A.L., Basáñez, M.G., 2013. Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife* e00626. doi:10.7554/eLife.00626
- Chutmongkonkul, M., Maier, W.A., Seitz, H.M., 1992. *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 103–110. doi:10.1080/00034983.1992.11812639
- Coatney, G.R., Cooper, W.C., Eddy, N.B., Greenberg, J., 1953. Survey of antimalarial agents: chemotherapy of *Plasmodium gallinaceum* infections; toxicity; correlation of structure and action. Public Heal. Serv. Publ.
- Cohuet, A., Osta, M.A., Morlais, I., Awono-Ambene, P.H., Michel, K., Simard, F., Christophides, G.K., Fontenille, D., Kafatos, F.C., 2006. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 7, 1285–1289. doi:10.1038/sj.embor.7400831
- Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., Cator, L., 2019. Avian malaria alters blood feeding of *Culex pipiens* mosquitoes. *Malar. J.* 18, 82.
- Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., Gandon, S., 2014. Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1004308
- Crawley, M.J., 2007. *The R book*, Imperial C. ed. UK.
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E.A., Sinden, R.E., Leroy, D., 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* 9. doi:10.1371/journal.pmed.1001169
- Delves, M.J., Miguel-Blanco, C., Matthews, H., Molina, I., Ruecker, A., Yahiya, S., Straschil, U., Abraham, M., León, M.L., Fischer, O.J., Rueda-Zubiaurre, A., Brandt, J.R., Cortés, Á., Barnard, A., Fuchter, M.J., Calderón, F., Winzeler, E.A., Sinden, R.E., Herreros, E., Gamó, F.J., Baum, J., 2018.

- A high throughput screen for next-generation leads targeting malaria parasite transmission. *Nat. Commun.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41467-018-05777-2
- Delves, M.J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M.J., Herreros, E., Sinden, R.E., 2013. Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3268–3274. doi:10.1128/AAC.00325-13
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., Dimopoulos, G., 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.* 2, e52. doi:10.1371/journal.ppat.0020052
- Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G., 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5, e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423
- Ferguson, H.M., Rivero, A., Read, A.F., 2003. The influence of malaria parasite genetic diversity and anaemia on mosquito feeding and fecundity. *Parasitology* 127, 9–19. doi:10.1017/S0031182003003287
- Fowler, R.E., Sinden, R.E., Pudney, M., 1995. Inhibitory activity of the anti-malarial Atovaquone (566C80) against ookinetes, oocysts, and sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J. Parasitol.* 81, 452. doi:10.2307/3283831
- Foy, H., Kondi, A., 1952. Effect of daraprim on the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi:10.1016/0035-9203(52)90084-9
- Gendrin, M., Rodgers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouédraogo, J.B., Basáñez, M.G., Cohuet, A., Christophides, G.K., 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat. Commun.* 6, 1–7. doi:10.1038/ncomms6921
- Gerald, N., Mahajan, B., Kumar, S., 2011. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* 10, 474–482. doi:10.1128/EC.00314-10
- Gerberg, E.J., 1971. Evaluation of antimalarial compounds in mosquito test systems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65, 358–363.
- Gunders, A.E., 1961. The effect of a single dose of pyrimethamine and primaquine in combination upon gametocytes and sporogony of *Laverania falcipara* (= *Plasmodium falciparum*) in Liberia. *Bull. World Health Organ.* 24, 650–653.
- Hamerly, T., Tweedell, R.E., Hritzo, B., Nyasembe, V.O., Tekwani, B.L., Nanayakkara, N.P.D., Walker, L.A., Dinglasan, R.R., 2019. NPC1161B, an 8-aminoquinoline analog, is metabolized in the mosquito and inhibits *Plasmodium falciparum* oocyst maturation. *Front. Pharmacol.* 10,

1265. doi:10.3389/fphar.2019.01265

Hewitt, R., 1940. Bird Malaria, The american journal of hygiene.

Hogh, B., Gamage-Mendis, A., Butcher, G.A., Thompson, R., Begtrup, K., Mendis, C., Enosse, S.M., Dgedge, M., Barreto, J., Eling, W., Sinden, R.E., 1998. The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 176–182. doi:10.4269/ajtmh.1998.58.176

Hopkins Sibley, C., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., Plowe, C. V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., Nzila, A.M., 2001. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what's next? *TRENDS Parasitol.* 17, 582–588.

Karunajeewa, H.A., Salman, S., Mueller, I., Baiwog, F., Gomorrai, S., Law, I., Page-Sharp, M., Rogerson, S., Siba, P., Ilett, K.F., Davis, T.M.E., 2009. Pharmacokinetic properties of sulfadoxine-pyrimethamine in pregnant women. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4368–4376. doi:10.1128/AAC.00335-09

Kirk, D., Mittwoch, U., Stone, A.B., Wilkie, D., 1976. Limited ability of thymidine to relieve mitotic inhibition by pyrimethamine in human fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 25, 681–685.

Kone, A., Vegte-Bolmer, M. van de, Siebelink-Stoter, R., Gemert, G.J. van, Dara, A., Niangaly, H., Luty, A., Doumbo, O.K., Sauerwein, R., Djimde, A.A., 2010. Sulfadoxine-pyrimethamine impairs *Plasmodium falciparum* gametocyte infectivity and *Anopheles* mosquito survival. *Int. J. Parasitol.* 40, 1221–1228. doi:10.1016/j.ijpara.2010.05.004

Medscape, 2020. Artesunate dosing, indications, interactions, adverse effects, and more [WWW Document]. URL <https://reference.medscape.com/drug/artesunate-342684> (accessed 4.21.20).

Miguel-Blanco, C., Lelièvre, J., Delves, M.J., Bardera, A.I., Presa, J.L., López-Barragán, M.J., Ruecker, A., Marques, S., Sinden, R.E., Herreros, E., 2015. Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3298–3305. doi:10.1128/AAC.04684-14

Nunes, J.K., Woods, C., Carter, T., Raphael, T., Morin, M.J., Diallo, D., Leboulleux, D., Jain, S., Loucq, C., Kaslow, D.C., Birkett, A.J., 2014. Development of a transmission-blocking malaria vaccine: progress, challenges, and the path forward. *Vaccine.* doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.030

Omar, M.S., Collins, W.E., Contacos, P.G., 1973. Gametocytocidal and sporontocidal effects of antimalarial drugs on malaria parasites. *Exp. Parasitol.* 34, 229–241. doi:10.1016/0014-4894(73)90082-9

- Paaijmans, K., Fernández-Busquets, X., 2014. Antimalarial drug delivery to the mosquito: an option worth exploring? *Futur. Microbiol* 9, 579–582. doi:10.2217/FMB.14.30
- Paton, D.G., Childs, L.M., Itoe, M.A., Holmdahl, I.E., Buckee, C.O., Catteruccia, F., 2019. Exposing *Anopheles* mosquitoes to antimalarials blocks *Plasmodium* parasite transmission. *Nature*. doi:10.1038/s41586-019-0973-1
- Peatey, C.L., Leroy, D., Gardiner, D.L., Trenholme, K.R., 2012. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malar. J.* 11, 34. doi:10.1186/1475-2875-11-34
- Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E., 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Pigeault, R., 2015. Ecologie évolutive des interaction Hôte / Moustique / *Plasmodium* : sources d'hétérogénéité de l'infection des vecteurs. Université de Montpellier.
- Pigeault, R., Vézilier, J., Cornet, S., Zélé, F., Nicot, A., Perret, P., Gandon, S., Rivero, A., 2015. Avian malaria: a new lease of life for an old experimental model to study the evolutionary ecology of *Plasmodium*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140300. doi:10.1098/rstb.2014.0300
- Plouffe, D.M., Wree, M., Du, A.Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S.L., Flannery, E.L., Kato, N., Tanaseichuk, O., Comer, E., Zhou, B., Kuhlen, K., Zhou, Y., Leroy, D., Schreiber, S.L., Scherer, C.A., Vinetz, J., Winzeler, E.A., 2016. High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. *Cell Host Microbe* 19, 114–126. doi:10.1016/j.chom.2015.12.001
- Ramakrishnan, S.P., Basu, P.C., Harwant, S., Wattal, B.L., 1963. A study on the joint action of diamino-diphenyl-sulphone (DDS) and pyrimethamine in the sporogony cycle of *Plasmodium gallinaceum*: potentiation of the sporontocidal activity of pyrimethamine by DDS. *Indian J. Malariol.* 17, 141–148.
- Rivero, A., Gandon, S., 2018. Evolutionary ecology of avian malaria: past to present. *Trends Parasitol.* 34. doi:10.1016/j.pt.2018.06.002
- Robert, V., Awono-Ambene, H.P., Le Hesran, J.-Y., Trape, J.-F., 2000. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 210–216. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.210
- Ruecker, A., Mathias, D.K., Straschil, U., Churcher, T.S., Dinglasan, R.R., Leroy, D., Sinden, R.E., Delves, M.J., 2014. A male and female gametocyte functional viability assay to identify



- biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7292–7304. doi:10.1128/AAC.03666-14
- Sanders, N.G., Sullivan, D.J., Mlambo, G., Dimopoulos, G., Tripathi, A.K., 2014. Gametocytocidal screen identifies novel chemical classes with *Plasmodium falciparum* transmission blocking activity. *PLoS One* 9, e105817. doi:10.1371/journal.pone.0105817
- Saraiva, R.G., Kang, S., Simões, M.L., Angleró-Rodríguez, Y.I., Dimopoulos, G., 2016. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 53–64. doi:10.1016/j.dci.2016.01.015
- Schneider, P., Greischar, M.A., Birget, P.L.G., Repton, C., Mideo, N., Reece, S.E., 2018. Adaptive plasticity in the gametocyte conversion rate of malaria parasites. *PLoS Pathog.* 14, 1–21. doi:10.1371/journal.ppat.1007371
- Sekar, V., Rivero, A., Pigeault, R., Gandon, S., Drews, A., Ahren, D., Hellgren, O., 2020. Gene regulation of the avian malaria parasite *Plasmodium relictum*, during the different stages within the mosquito vector. *bioRxiv* 2020.07.16.204198. doi:10.1101/2020.07.16.204198
- Shinondo, C.J., Norbert Lanners, H., Lowrie, R.C.J., Wisner, M.F., 1994. Effect of pyrimethamine resistance on sporogony in a *Plasmodium berghei/Anophele stephensi* model. *Exp. Parasitol.* 78, 194–202.
- Shute, P.G., Maryion, M., 1954. The effect of pyrimethamine (Daraprim) on the gametocytes and oocysts of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. an Hyg.* 48, 50–63.
- Sinden, R.E., 2017. Developing transmission-blocking strategies for malaria control. *PLoS Pathog.* 13, e1006336. doi:10.1371/journal.ppat.1006336
- Sinden, R.E., 2010. A biologist's perspective on malaria vaccine development. *Hum. Vaccin.* doi:10.4161/hv.6.1.9604
- Sinden, R.E., Carter, R., Drakeley, C., Leroy, D., 2012. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar. J.* 11, 1–11. doi:10.1186/1475-2875-11-70
- Smith, D.L., McKenzie, F.E., 2004. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar. J.* 3. doi:10.1186/1475-2875-3-13
- Sowunmi, A., Akano, K., Ntadom, G., Ayede, A., Oguiche, S., Agomo, C., Okafor, H., Watila, I., Meremikwu, M., Ogala, W., Agomo, P., Adowoye, E., Fatunmbi, B., Aderoyeje, T., Happi, C., Gbotosho, G., Folarin, O., 2017. Anaemia following artemisinin-based combination treatments of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children: temporal patterns

- of haematocrit and the use of uncomplicated hyperparasitaemia as a model for evaluating late-appearing anaemia. *Chemotherapy* 62, 231–238. doi:10.1159/000449366
- Teklehaimanot, A., Nguyen-Dinh, P., Collins, W.E., Barber, A.M., Campbell, C.C., 1985. Evaluation of sporontocidal compounds using *Plasmodium falciparum* gametocytes produced in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 429–434. doi:10.4269/ajtmh.1985.34.429
- Terzakis, J.A., 1971. *Plasmodium gallinaceum*: drug-induced ultrastructural changes in oocysts. *Exp. Parasitol.* 30, 260–266.
- Terzian, L.A., 1970. A note on the effects of antimalarial drugs on the sporogonous cycle of *Plasmodium cynomolgi* in *Anopheles stephensi*. *Parasitology* 61, 191–194.
- Terzian, L.A., Stahler, N., Daw, A.T., 1968. The sporogonous cycle of *Plasmodium vivax* in *Anopheles* mosquitoes as a system for evaluating the prophylactic and curative capabilities of potential antimalarial compounds. *Exp. Parasitol.* 23, 56–66. doi:10.1016/0014-4894(68)90042-8
- Valkiunas, G., 2004. Life cycle and morphology, in: avian malaria parasites and other Haemosporidia. Boca Raton : CRC Press, Washington DC, pp. 17–45. doi:10.3390/v8030082
- Van Eijk, A.M., Hill, J., Alegana, V.A., Kirui, V., Gething, P.W., ter Kuile, F.O., Snow, R.W., 2011. Coverage of malaria protection in pregnant women in sub-Saharan Africa: a synthesis and analysis of national survey data. *Lancet Infect. Dis.* 11, 190–207. doi:10.1016/S1473-3099(10)70295-4
- Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2015. *Plasmodium* infection brings forward mosquito oviposition. *Biol. Lett.* 11, 2–6. doi:10.1098/rsbl.2014.0840
- Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2012. *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc. Biol. Sci.* 279, 4033–41. doi:10.1098/rspb.2012.1394
- Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S., Rivero, A., 2010. Insecticide resistance and malaria transmission: infection rate and oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes infected with *Plasmodium relictum*. *Malar. J.* 9. doi:10.1186/1475-2875-9-379
- Vincke, I.H., 1970. The effects of pyrimethamine and sulphormethoxine on the pre-erythrocytic and sporogonous cycle of *Plasmodium berghei berghei*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* (1920). 50, 339–358.
- Wadi, I., Anvikar, A.R., Nath, M., Pillai, C.R., Sinha, A., Valecha, N., 2018. Critical examination of approaches exploited to assess the effectiveness of transmission-blocking drugs for malaria. *Future Med. Chem.* 10, 2619–2639. doi:10.4155/fmc-2018-0169
- Wadi, I., Nath, M., Anvikar, A.R., Singh, P., Sinha, A., 2019. Recent advances in transmission-

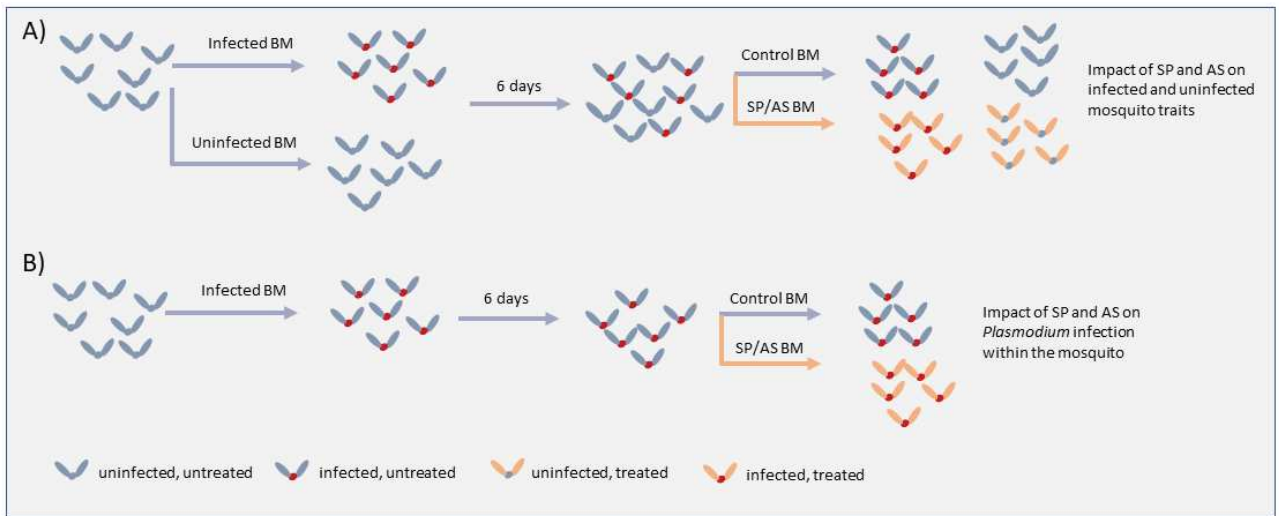
blocking drugs for malaria elimination. *Future Med. Chem.* 11, 3047–3088. doi:10.4155/fmc-2019-0225

WHO, 2019. *World Malaria Report 2019*. Geneva.

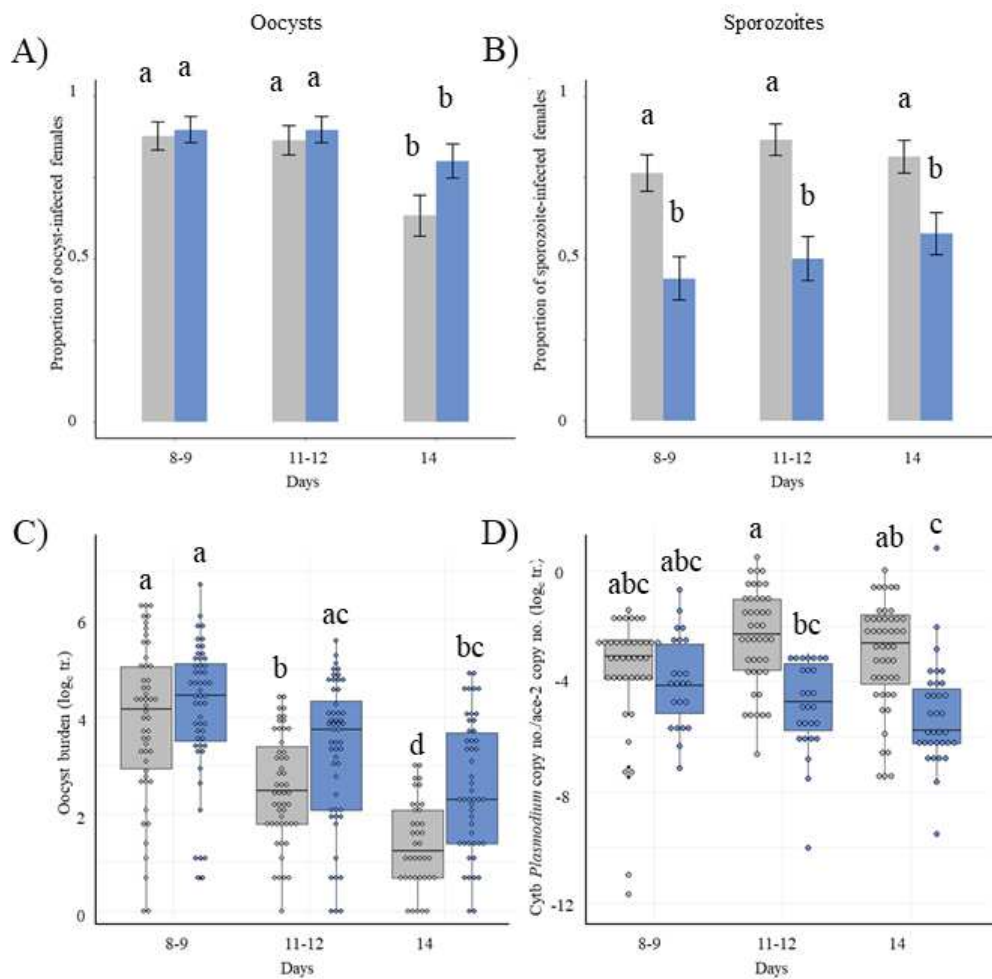
Zélé, F., Nicot, A., Berthomieu, A., Weill, M., Duron, O., Rivero, A., 2014. *Wolbachia* increases susceptibility to *Plasmodium* infection in a natural system. *Proc. R. Soc. B* 281. doi:10.1098/rspb.2013.2837

Zhou, G., Kohlhepp, P., Geiser, D., Frasquillo, M. del C., Vazquez-Moreno, L., Winzerling, J.J., 2007. Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 53, 1169–1178. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.06.009

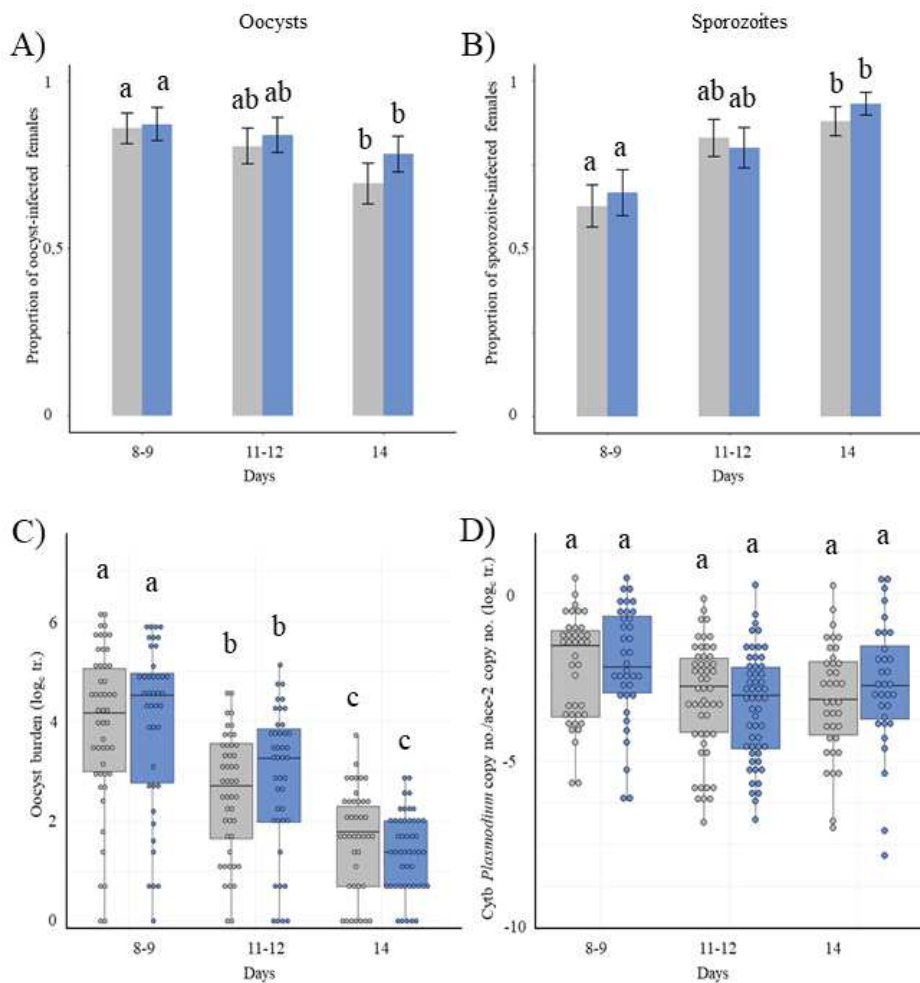
## Figure Legends



**Figure 1. Experimental design.** A) Impact of SP and AS on mosquito life history traits. Mosquitoes were either provided an infected (red 'body') or an uninfected (grey 'body') blood meal. Six days later they were either given a control blood meal (grey 'wings') or a drug treated blood meal (orange 'wings'), B) Impact of SP and AS on *Plasmodium* development. Protocol was identical except for the first blood meal, which was an infected blood meal for all the mosquitoes.



**Figure 2. Prevalence and burden of oocysts and sporozoites in mosquitoes fed on a control- (grey) or SP-treated (blue) host for each sampling day (number of days post infection). A), B): oocyst and sporozoite prevalence, respectively. C), D): oocyst and sporozoite burden, respectively. Prevalence is represented as the mean  $\pm$  standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ). Burden is represented as a boxplot where with the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians). Vertical lines delimit 1.5 times the inter-quartile range above which individual counts are considered outliers and marked as circles. Bars not connected by the same letter are significantly different. Post-hoc contrasts were carried out using the emmeans package in R (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/vignettes/comparisons.html>).**



**Figure 3. Prevalence and burden of oocysts and sporozoites in mosquitoes fed on a control- (grey) or AS-treated host (blue) for each sampling day (number of day post infection). A), B): oocyst and sporozoite prevalence, respectively. C), D): oocyst and sporozoite burden, respectively. Prevalence is represented as the mean  $\pm$  standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ). Burden is represented as a boxplot where with the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians). Vertical lines delimit 1.5 times the inter-quartile range above which individual counts are considered outliers and marked as circles. Bars not connected by the same letter are significantly different. Post-hoc contrasts were carried out using the emmeans package in R (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/vignettes/comparisons.html>).**

## Tables

**Table 1:** Summary of the main studies investigating the inhibitory effect of pyrimethamine (PYR) alone or in combination with sulfadoxine (SFX) for oocyst and sporozoite formation. In prophylactic protocols the drug is administered before or concomitantly with the infected blood meal (mosquitoes ingest the drug at the same time as the infective gametocytes). In curative protocols, the mosquito is first infected and then provided with a second blood meal containing the drug.

<i>Plasmodium</i> species	Mosquito species	Dose*	Oocyst inhibition	Sporozoite inhibition	Reference
<b>Prophylactic administration</b>					
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i>	20 mg PYR /ind	-	YES	(Foy and Kondi, 1952)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. stephensi</i>	25 mg PYR /ind	YES <sup>1</sup>	NO <sup>2</sup>	(Shute and Maryion, 1954)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i> <i>An. melas</i>	25-50 mg PYR /ind	YES	YES	(Bray et al., 1959)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. quadrimaculatus</i> <i>An. freeborni</i>	50-100 mg PYR /ind	YES <sup>1</sup>	YES	(Burgess and Young, 1959)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i>	12-50 mg PYR/ind	YES <sup>1,3</sup>	YES <sup>2,3</sup>	(Gunders, 1961)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. stephensi</i>	0.00001% PYR (ss)	-	YES <sup>2</sup>	(Gerberg, 1971)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. stephensi</i>	10 <sup>-7</sup> M PYR (mf)	YES <sup>1</sup>	-	(Chutmongkonkul et al., 1992)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i>	75 mg PYR 1500 mg SFX	YES <sup>1</sup>	-	(Hogh et al., 1998)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i>	1.25 mg/kg PYR 25 mg/kg SFX	YES	-	(Beavogui et al., 2010)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. arabiensis</i>	25 mg/kg SFX 1.25 mg/kg PYR	YES <sup>1,4</sup>	-	(Robert et al., 2000)
<i>P. vivax</i>	<i>An. stephensi</i>	50 mg PYR /ind	YES <sup>1</sup>	NO <sup>2</sup>	(Shute and Maryion, 1954)
<i>P. vivax</i>	<i>An. stephensi</i>	0.002 gr PYR /ml (ss)	YES <sup>1</sup>	YES	(Terzian et al., 1968)
<i>P. cynomolgui</i>	<i>An. stephensi</i>	0.001 gr PYR /ml (ss)	YES <sup>1</sup>	YES	(Terzian, 1970)
<i>P. cynomolgui</i>	<i>An. stephensi</i>	0.00001% PYR (ss)	-	YES <sup>2</sup>	(Gerberg, 1971)
<i>P. cynomolgui</i>	<i>An. maculatus</i>	3 mg PYR /kg	YES	YES	(Omar et al., 1973)
<i>P. berghei</i>	<i>An. stephensi</i>	2.5 - 20mg PYR /kg	YES	YES	(Vincke, 1970)
<i>P. berghei</i>	<i>An. stephensi</i>	20mg PYR /kg	YES	YES	(Shinondo et al., 1994)
<i>P. berghei</i>	<i>An. stephensi</i>	Serum from PYR/SFX treated patients (mf)	YES <sup>1</sup>	-	(Hogh et al., 1998)
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Ae. aegypti</i>	0.028 mg/kg PYR 210 mg/kg SFX	-	YES	(Ramakrishnan et al., 1963)
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Ae. aegypti</i>	0.001% and 0.0001% PYR (ss)	YES <sup>1</sup>	YES <sup>2</sup>	(Terzakis, 1971)
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Ae. aegypti</i>	0.00001% PYR (ss)	-	YES <sup>2</sup>	(Gerberg, 1971)
<b>Curative administration</b>					
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae, An. melas</i>	25-50 mg PYR 4 days post infection	YES <sup>1</sup>	NO <sup>2</sup>	(Bray et al., 1959)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. gambiae</i>	1µM PYR 2-4 days post-infection (mf)	YES <sup>1</sup>	NO <sup>2</sup>	(Teklehaimanot et al., 1985)
<i>P. falciparum</i>	<i>An. stephensi</i>	10 <sup>-7</sup> M PYR 4 days post infection (mf)	NO	-	(Chutmongkonkul et al., 1992)

\* Drug administered directly to host unless otherwise stated: (ss): drug administered in sugar solution, (mf): drug added to blood in a membrane feeder. <sup>1</sup> Inhibition was partial (some oocysts present); <sup>2</sup> Sporozoites were observed but not quantified; <sup>3</sup> No untreated controls; <sup>4</sup> Chloroquine-treated patients used as a control.



## Supplementary Materials

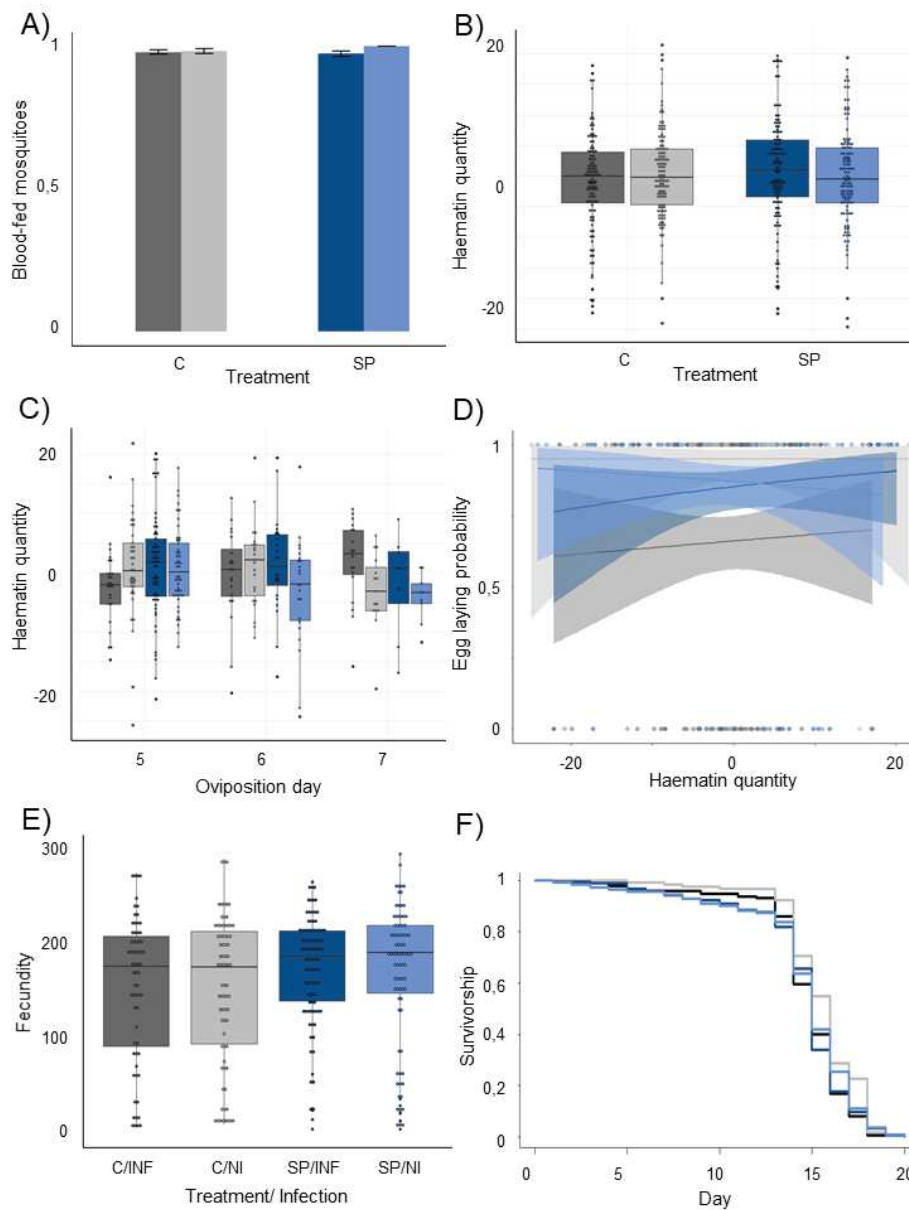
The transmission-blocking effects of antimalarial drugs revisited:  
fitness costs and sporontocidal effects of artesunate  
and sulfadoxine-pyrimethamine (Villa et al)

**Table S1. Description of the statistical models used to analyze the impact of drugs on mosquito life history traits.** Models with binomial error structure require a concatenated response variable binding together the number of successes and failures for a given outcome. N gives the number of mosquitoes included in each analysis. "Maximal model" represents the complete set of explanatory variables (and their interactions) included in the model. "Minimal model" represents the model containing only the significant variables and their interactions. N represents the number of replicates in each analysis. Round brackets indicate that the variable was fitted as a random factor. Square brackets indicate the error structure used (n: normal errors, b: binomial errors). date: sampling day, status: alive/dead on sampling day, fed/unfed: number of fed/unfed mosquitoes, hm: haematin excreted (proxi for blood meal size), plt: plate used for the colorimetric quantification haematin, hmr: residuals of hm by plate, eggs: number of eggs laid, inf: mosquito infection status (infected/uninfected), TR: mosquito fed on treated/untreated bird.

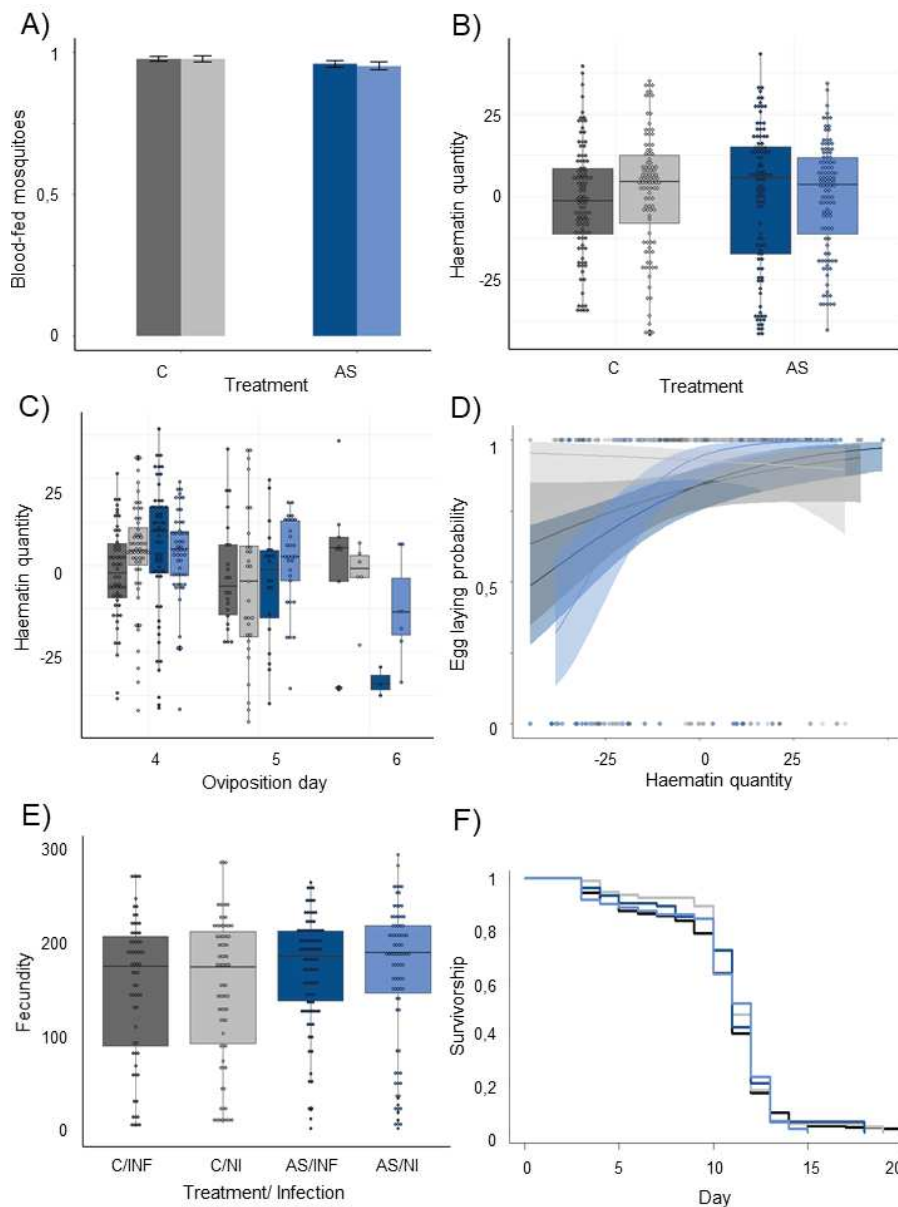
Variable of interest	Response variable	Model Nb.	N	Maximal model	Minimal model	R subroutine [err struct.]	
<i>Effect of AS on mosquito traits</i>							
RBC	RBC/ml	RBC	11	5	TR	1	K-W
Survival	Overall survival	(date, status)	15	414	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	coxme
	% mosquitoes surviving until day 14	cbind (dead, alive)	16	10	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [b]
Blood meal size	Blood-fed	cbind (fed, unfed)	9	966	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [b]
	Blood meal size	hmr (lm (hm ~ plt)	10	414	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [n]
Fecundity	Egg laying probability	cbind (laid, not laid)	12	440	hmr*TR*inf + (1 bird)	TR*hmr + inf + (1 bird)	lmer [b]
	Oviposition day	day	13	337	hmr*TR*inf	hmr	clm
	Number of eggs per raft	eggs	14	337	hmr*TR + inf*day + (1 bird)	hmr + (1 bird)	glmmTMB
<i>Effect of SP on mosquito traits</i>							
RBC	RBC/ml	RBC	3	6	TR	1	K-W
Survival	overall survival	(date, statut)	7	564	TR*inf + (1 bird)	inf + (1 bird)	coxme
	% mosquitoes surviving until day 14	cbind(dead, alive)	8	12	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [b]
Blood meal	Blood-fed	cbind (fed, unfed)	1	1045	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [b]
	Blood meal size	hmres (lm (hm ~ Plq)	2	454	TR*inf + (1 bird)	(1 bird)	lmer [n]
Fecundity	Egg-laying probability	cbind (laid, not laid)	4	378	hmr*TR*inf + (1 bird)	TR*inf + (1 bird)	lmer [b]
	Oviposition day	day	5	312	hmr*TR*inf	hmr*inf + TR	clm
	Number of eggs per raft	eggs	6	312	hmr*TR + inf*day + (1 bird)	day + (1 bird)	glmmTMB

**Table S2. Description of the statistical models used to analyze the impact of drugs on *Plasmodium* prevalence and burden.** Models with binomial error structure require a concatenated response variable binding together the number of successes and failures for a given outcome. N gives the number of mosquitoes included in each analysis. "Maximal model" represents the complete set of explanatory variables (and their interactions) included in the model. "Minimal model" represents the model containing only the significant variables and their interactions. N represents the number of replicates in each analysis. Round brackets indicate that the variable was fitted as a random factor. Square brackets indicate the error structure used (n: normal errors, b: binomial errors). date: mosquito dissection day (discrete variable), day: mosquito dissection day (continuous variable), inf: mosquito infection status (infected/uninfected), plt: plate used for the sporozoite quantification (qPCR), TR: mosquito fed on treated/untreated bird.

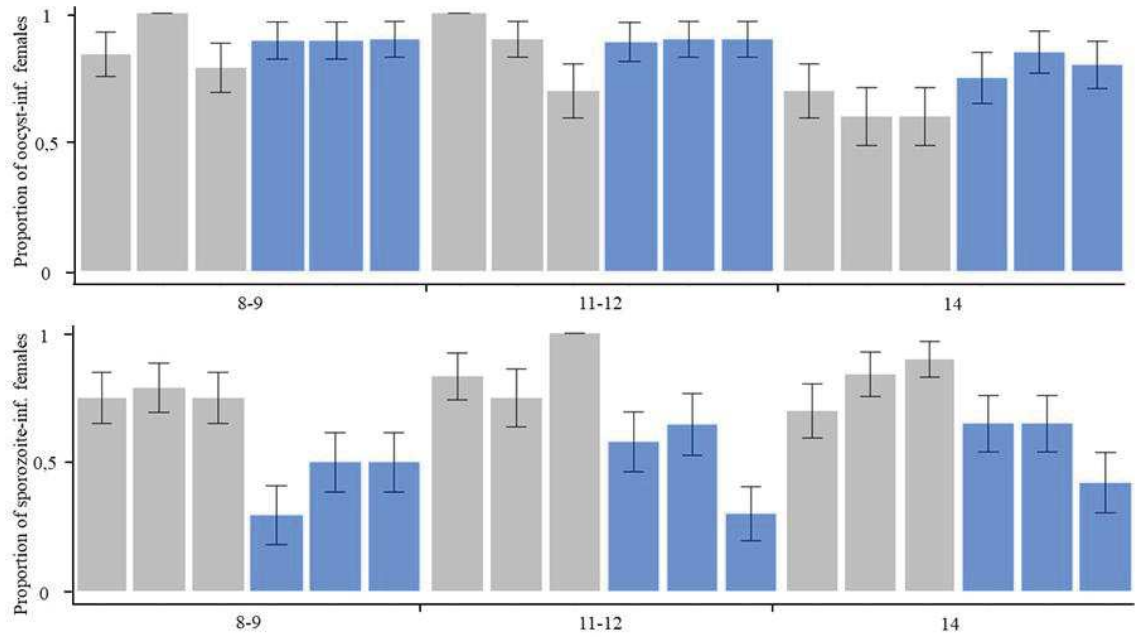
Variable of interest	Response variable	Model Nb.	N	Maximal model	Minimal model	R subroutine [err struct.]
<i>Effect of AS on Plasmodium</i>						
Oocyst prevalence	Number of mosquitos with at least 1 oocyst	cbind (inf, uninf)	23	330 TR *date + (1 bird)	date + (1 bird)	lmer [b]
Oocyst burden	Number of oocysts per infected mosquito	oocysts	24	266 TR*date + (1 bird)	date + (1 bird)	glmmTMB
Sporozoite prevalence	Number of mosquitos with sporozoites	cbind (inf, uninf)	25	287 TR *date + (1 plt)	date + (1 plt)	lmer [b]
Sporozoite burden	Ratio between mosquito and parasite DNA	log(ratio)	26	227 TR *date + (1 bird) + (1 plt)	date + (1 bird) + (1 plt)	lmer [n]
<i>Effect of SP on Plasmodium</i>						
Oocyst prevalence	Number of mosquitos with at least 1 oocyst	cbind (inf, uninf)	17	352 TR*date + (1 bird)	date + (1 bird)	lmer [b]
Oocyst burden	Number of oocysts per infected mosquito	oocysts	18	291 TR*date + (1 bird)	TR *date + (1 bird)	glmmTMB
Oocyst burden	Number of oocysts per infected mosquito	oocysts	19	291 TR*day + (1 bird)	TR *day + (1 bird)	glmmTMB
Sporozoite prevalence	Number of mosquitos with sporozoites	cbind (inf, uninf)	20	320 TR *date + (1 plt)	TR + (1 bird) + (1 plt)	lmer [b]
Sporozoite burden	Ratio between mosquito and parasite DNA	log (ratio)	21	225 TR *date + (1 bird) + (1 plt)	TR + (1 bird) + (1 plt)	lmer [n]
Sporozoite burden	Ratio between mosquito and parasite DNA	log (ratio)	22	225 TR *day + (1 bird) + (1 plt)	TR*day + (1 bird) + (1 plt)	lmer [n]



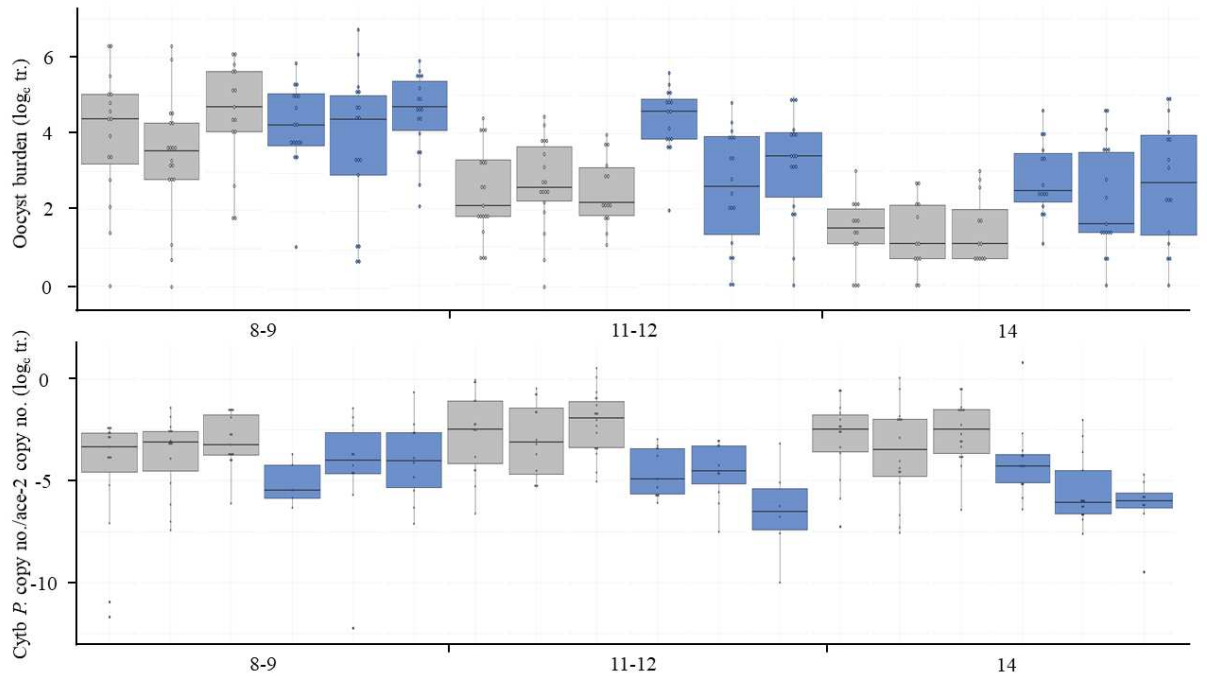
**Figure S1. Impact of SP on *Plasmodium*-infected and uninfected mosquito traits.** A) Proportion of mosquitoes that blood-fed, B) Blood meal size (represented by the residuals of a model containing 'plate' as an explanatory variable, see materials and methods) as a function of treatment, C) Blood meal size as a function of oviposition day, D) Probability of laying an egg raft, E) Fecundity, F) Survival. Grey: mosquitoes fed on a control bird, blue: mosquitoes fed on an SP-treated bird. Dark grey, dark blue: infected mosquitoes; light grey, light blue: uninfected mosquitoes. Bars (A) represent mean  $\pm$  standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ), boxplots (B, C, E) represent the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians), the 1.5 inter-quartile range (vertical lines) and the outliers (points above and below the iq range). Lines (D) are fitted using a logistic regression the colored areas are the 95% confident intervals.



**Figure S2. Impact of AS on *Plasmodium*-infected and uninfected mosquito traits.** A) Proportion of mosquitoes that blood-fed, B) Blood meal size (represented by the residuals of a model containing 'plate' as an explanatory variable, see materials and methods) as a function of treatment, C) Blood meal size as a function of oviposition day, D) Probability of laying an egg raft, E) Fecundity, F) Survival. Grey: mosquitoes fed on a control bird, blue: mosquitoes fed on an AS-treated bird. Dark grey, dark blue: infected mosquitoes; light grey, light blue: uninfected mosquitoes. Bars (A) represent mean  $\pm$  standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ), boxplots (B, C, E) represent the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians), the 1.5 inter-quartile range (vertical lines) and the outliers (points above and below the iq range). Lines (D) are fitted using a logistic regression the colored areas are the 95% confident intervals.



**Figure S3. Prevalence of oocysts (top) and sporozoites (bottom) in mosquitoes fed on each of the 3 control (grey) and SP-treated (blue) birds, for each of the 3 sampling days (8-9, 11-12 and 14).** Between 15-20 mosquitoes were sampled per bird and per time point. Each mosquito was used to estimate oocyst prevalence (abdomen dissection of midgut, top panel) and sporozoites (qPCR on head-thorax, bottom panel, see Materials and Methods). Prevalence was established as presence/absence of oocysts in the midgut (top panel) and the head-thorax (bottom panel). Prevalence is represented as the mean  $\pm$  standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ).



**Figure S4. Oocyst (top) and sporozoite (bottom) burden in mosquitoes fed on each of the 3 control (grey) and SP-treated (blue) birds, for each of the 3 sampling days (8-9, 11-12 and 14).** Between 15-20 mosquitoes were sampled per bird and per time point. Mosquitoes were dissected to count the number of oocysts in the midgut (top panel) and the head-thorax fraction was used to quantify the number of sporozoites (qPCR, bottom panel). Burden is represented as a boxplot where with the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians). Vertical lines delimit 1.5 times the inter-quartile range above which individual counts are considered outliers and marked as circles.

# Chapitre 2 – Effect of sulfadoxine- pyrimethamine ingestion on the mosquito's gut microbiome (and transcriptome)

Manon Villa<sup>1,3†\*</sup>, Marie Buysse<sup>1,3\*</sup>, Camille Gaudiard<sup>1,2</sup>, Arnaud Berthomieu<sup>1,3</sup>, Florian Binetruy<sup>1</sup>, Olivier Duron<sup>1,3</sup>, Ana Rivero<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> MIVEGEC (CNRS – Université de Montpellier – IRD), Montpellier, France

<sup>2</sup> CEFE (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive), Montpellier, France

<sup>3</sup> CREES (Centre de Recherche en Ecologie et Evolution de la Santé), Montpellier, France

† Correspondence: [manon.villa@ird.fr](mailto:manon.villa@ird.fr)

\* Equal contribution



## Abstract

Bacteria in the mosquito's microbiome are promising tools to block malaria transmission and thus decrease the impact of this disease on human populations. The gut microbiome could interact with *Plasmodium* infection in 4 different ways: 1) by helping the formation of a peritrophic membrane that blocks the parasite migration through the gut, 2) by modulating the activation of the immune system, 3) by secreting molecules impairing parasite survival, or 4) by competing for available resources within the mosquito. In a previous study (Chapter 1), we have shown that infected mosquitoes that feed from an uninfected host having been treated with sulfadoxine-pyrimethamine (SP), a key antimalarial drug, had significantly more oocysts, but fewer sporozoites, than infected mosquitoes fed on an untreated host. The mechanisms behind these results remained however unresolved. SP has a well-established antibiotic effect, and previous work has shown that antibiotics in the bloodmeal increase mosquito susceptibility to *Plasmodium*. The aim of this study was to establish whether SP has an impact on the microbiome of mosquitoes. Preliminary analyses found no significant effect on either the burden or the diversity of the bacterial community of mosquitoes fed on SP-treated hosts. The most abundant bacterial genera were *Serratia sp.*, *Wolbachia sp.* and *Elizabethkingia sp.* We found an effect on the prevalence of *Serratia sp.*, one of the main bacterial genera, which has been seen to impact *Plasmodium* development in mosquitoes. There was no difference in the burden of *Wolbachia* in the midgut. Analyses of the burden of *Serratia* and *Elisabethkingia* are ongoing.

**Keywords** - Antimalarial drugs, microbiome, transcriptomic, vectorial transmission, *Culex pipiens* (quinquefasciatus), avian malaria

## Introduction

Antimalarial drugs have played a key role in reducing the incidence and mortality due to malaria, a disease caused by *Plasmodium sp.* and transmitted by mosquitoes. Although their main purpose is to prevent or cure the infection in human patients, they can also be used to decrease the prevalence of the disease by reducing the onward transmission of the parasite by the vector (Sinden et al. 2012; Wadi et al. 2019). The transmission-blocking effect of antimalarial drugs can take place in the vertebrate host or in the vector. In the vertebrate host, drugs may be able to kill, arrest the maturation, alter the sex ratio or reduce the infectivity of gametocytes, the sexual blood stages of the parasite that are responsible for the transmission to the mosquito. In the vector, drugs may reduce the transmission of malaria by hindering the sporogonic cycle of the parasite within the mosquito (Villa et al. in press). *Plasmodium* development inside the mosquito is complex and involves the fusion of male and female gametocytes to form a zygote, the passage of the mobile zygote through the midgut wall to form an 'oocyst' that grows, undergoing successive mitosis, ruptures and releases thousands of 'sporozoites' that migrate to the salivary glands. Antimalarial drugs, or their metabolites, can find their way to the mosquito midgut where they can block the parasite either directly, by being toxic to any of the above stages of the parasite, or indirectly, by disturbing the fine-tuned mosquito physiological and immunological pathways within their midgut (Sinden et al. 2012). Recent work has shown that a third player, the mosquito gut microbiome, is also a key predictor of a successful mosquito infection (Boissière et al. 2012; Tchioffo et al. 2013). Despite this, whether antimalarial drugs ingested with a blood meal have an effect on the microbiota of the mosquito midgut, the epicenter of *Plasmodium* development, is unknown.

In a previous study (Villa et al 2020, Chapter 1), we showed that, when ingested, sulfadoxine-pyrimethamine (hereafter SP), a drug targeting the folate pathway of the parasite, has an effect on the ongoing development of *P. relictum*, within its vector, the mosquito *Culex quinquefasciatus*. When mosquitoes carrying a 6-day old *Plasmodium* infection feed on an SP-treated host, we observed both a significant increase in the number of oocysts in the midgut, and a drastic decrease in both sporozoite prevalence and burden compared to the untreated controls. In this study we explore whether SP ingested with a blood meal has an effect on the composition (diversity) or abundance of the *Culex quinquefasciatus* midgut flora that could explain the above results.

The bacteria in the mosquito microbiome may be acquired through different pathways: from the mother (vertical transmission), from the larval environment, during mating, or with the adult meal (Romoli and Gendrin 2018). The quantity of bacteria increases significantly after the bloodmeal and the community structure of the microbiome in the mosquito gut varies temporally with episodes of blood and sugar feeding (Wang et al. 2011; Chen et al. 2016). The microbiome interferes with pathogen infection in 4 different but not exclusive ways. Firstly, some bacteria contribute to the construction of the peritrophic matrix, the chitinous membrane that coats the midgut after a

bloodmeal to protect it from physiological shocks (pH modification, oxidative stress, Rodgers et al. 2017) and blood borne pathogens. Secondly, the microbiome can stimulate the immune system of the mosquito. *Serratia sp.*, for instance, activates the complement-like TEP1 pathway of the mosquito, a crucial component of their immune defense arsenal against *Plasmodium* (Gonzales-Ceron et al. 2003; Dong et al. 2009; Bando et al. 2013; Bahia et al. 2014; Bai et al. 2019). Thirdly, bacteria in the microbiome can produce metabolites such as serralysins, hemolysins and chitinases, that act directly against pathogens, as is the case with some *Serratia sp.* strains (Gonzales-Ceron et al. 2003; Bando et al. 2013; Bahia et al. 2014; Ganley et al. 2018; Bai et al. 2019). Lastly, midgut bacteria can also compete with the pathogens for limiting resources in the vector (Romoli and Gendrin 2018), particularly during the resource-intensive maturation of the oocyst during which tens of thousands of sporozoites must be produced. Following a bloodmeal, the burden of some midgut bacteria, like *Elizabethkingia sp.*, increases 3-fold potentially placing them in direct competition with *Plasmodium sp.* for the limiting mosquito resources (Chen et al. 2020). These protective mechanisms are particularly frequent in maternally-transmitted bacteria which have evolved to safeguard their host in order to ensure their own survival. However, in some circumstances the microbiome has also been shown to enhance *Plasmodium* infection. For example, some bacteria excrete peptidoglycans to activate immune regulator in mosquitoes that decrease immune activity to avoid a systematic reaction against the own microbiome thus increasing chances of infection for *Plasmodium* (Gendrin et al. 2017).

Whether it's by increasing or decreasing the probability of a pathogen infection, every disturbance of the vector microbiome can therefore have an impact on *Plasmodium* transmission. Previous work studying the impact of antibiotics on *Plasmodium* infection in mosquitoes have shown that the antibiotics disturbed the mosquito microbiome thereby increasing not only its susceptibility to the infection (Gendrin 2015, Dong et al. 2009; Meister et al. 2009) but also their fecundity and survival (Gendrin 2015). Bacteria and *Plasmodium* share metabolic pathways that allow certain drugs to be effective against both organisms, foremost of which are the folate biosynthetic pathway that synthesize precursors of cellular function (Bourne 2014). SP is a key antimalarial drug used throughout Africa as an intermittent preventive therapy (IPT) for pregnant women and young children as well as for seasonal preventive chemotherapy in areas of high transmission (WHO 2019). It interferes with the folate metabolism, reducing the production of folic acid required for the production of nucleic acid synthesis in the malarial parasite (Peterson et al. 1988). It has, however, also been shown to have potent antibiotic properties *in vitro* (Capan et al. 2010).

In this study, we investigate whether, when ingested with a blood meal, SP has an effect on the mosquito midgut microbiome that could have a knock-on effect on the probability of infection of the mosquito. For this purpose, we feed uninfected *Culex pipiens* mosquitoes on SP-treated and

untreated hosts, and the abundance and diversity of their midgut microbiota is thereafter analyzed at different timepoints. The midgut of mosquitoes is the epicenter of the parasite's development within the mosquito: this is where gametes are formed (from the ingested gametocytes), fertilization occurs, and the resulting zygote (ookinete) traverses the midgut wall to form the oocyst. Oocysts undergo several rounds of syncytial mitoses to produce thousands of sporozoites. Our parting hypotheses is that SP reduces either abundance and/or diversity of the gut microbiota, thereby potentially explaining the results (increased oocysts) of our previous experiment (Chapter 1).

*Due to COVID19 lockdown and prevention measures, certain analyses were delayed and certain results were not available at the time of submission. These include the real-time quantification of Serratia sp. and Elizabethkingia sp. bacteria, two of the most abundant bacteria found in the mosquito. The study also originally intended to explore more widely the effect of SP on mosquito physiology and immune pathways via a full transcriptome analysis of the stomachs of SP-treated and untreated mosquitoes. The experiment for the transcriptomic analysis was performed just before the lockdown (Jan-Feb), and the samples sent to our collaborators (Olof Hellgren, Lund University) in July. Unfortunately, at the time of submission the analyses of the samples had not been completed. The introduction and discussion thus focus on the available results for the microbiome analyses, but I present the materials and methods for the transcriptomic analyses, and briefly discuss the need for a broader analysis of the potential physiological and/or immunological implications of the drug.*

## Material and Methods

### *Mosquito and bird protocols*

A laboratory line of *Culex pipiens quinquefasciatus* (SLAB strain) was used for this experiment. The larvae were reared at a constant density per tray (n=300 larvae) following previously published laboratory protocols (Vézilier et al. 2010). Larval trays (n=11) were placed inside "emergence cages" (40 cm x 28 cm x 31 cm), and emerged adults were allowed to feed *ad libitum* on a 10% glucose water solution. Rearing and experiments took place at our standard insectary conditions (24-26 °C, 60-80% RH, and 12:12 L:D photoperiod).

### *Microbiome experiment*

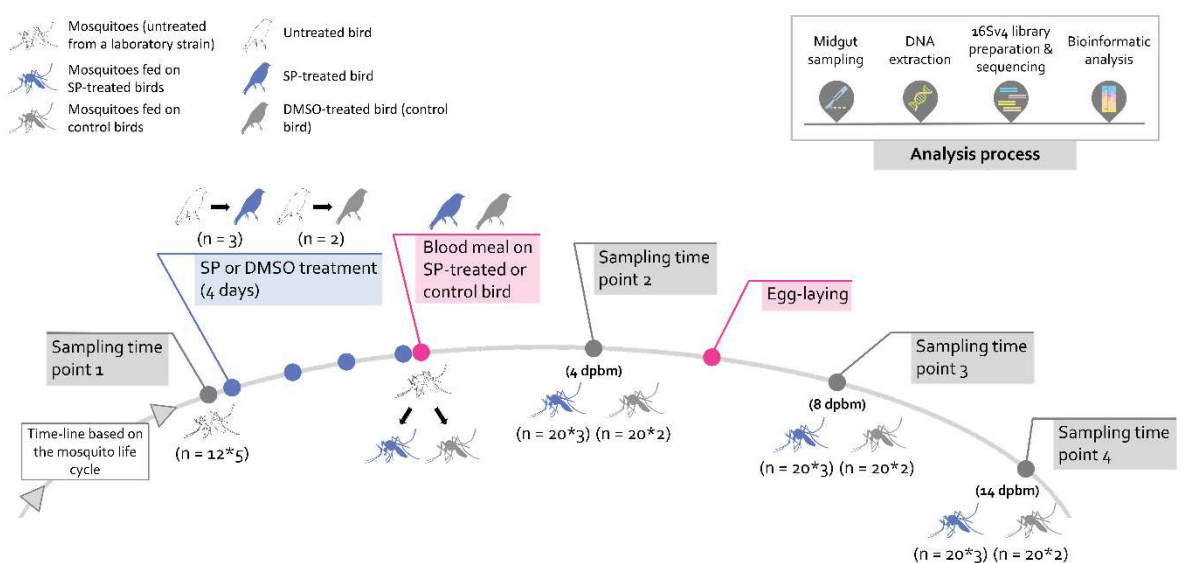
#### *Mosquito sampling and processing*

To explore the impact of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) on the abundance and diversity the mosquito gut microbiome, mosquitoes were allowed to take a blood meal on either an SP-treated or a control bird. For this purpose, four days prior to the blood meal, 3 birds (henceforth 'SP-treated' birds) had a daily subcutaneous injection of 30 µl of sulphadoxine-pyrimethamine (Sigma S7821-10G and 46706-250MG, 320 mg/kg Sulphadoxine, 16 mg/kg Pyrimethamine: 106.7 mg de S + 5.33 mg de P in 500 µl of DMSO for 3 canaries), while 2 further 'control birds' were injected with 30 µl of the DMSO solvent. Seven days after mosquito

emergence, each bird was placed individually in an experimental cage together with 135-140 female *Culex quinquefasciatus* (SLAB strain) mosquitoes. Mosquitoes were allowed to feed on the host overnight, and unfed females were taken out from the cages and discarded from further analyses.

To monitor the fluctuations in gut microbiome abundance and diversity over time, mosquitoes were haphazardly sampled from the cages at 4 time-points: immediately before the blood meal (n=12 mosquitoes per cage), and 4, 8 and 14 days post-blood meal (Fig. 1; henceforth dpbm, n=20 mosquitoes per cage and time point). These sampling times were chosen to match the time taken by the mosquito to fully digest the ingested blood (4 dpbm), and the time taken by the parasite to reach peak oocyst (8 dpbm) and sporozoite (15 dpbm) burdens (unpublished data from R. Pigeault).

At each sampling day, mosquitoes were dissected and the gut kept for further analysis. Prior to dissections, and to eliminate DNA contaminants from the cuticle surface, mosquitoes were bleach-washed as described in Binetruy et al. (2019a). For this purpose, mosquitoes were individually submerged in a 1% commercial bleach solution for 4 seconds and then rinsed for 10 seconds in three successive baths of DNA-free water. Mosquitoes were then dissected under a binocular microscope in sterile water using sterile forceps and scalpels and guts were stored with 180 µL of a DNA extraction buffer (see below). Between each dissection, scalpels and forceps were rinsed with a 1% commercial bleach solution and then rinsed twice with sterile water. Water used for the last rinse was conserved to be used as a negative dissection control for the molecular analyses. DNA of guts and negative dissection controls were immediately and individually extracted with a Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and under sterile conditions. Negative extraction controls were included in all extraction series.



**Figure 1: Illustration of the protocol in the microbiome experiment.** The time-line of the experiment is symbolized as the grey continuous line. Important steps of the mosquito life cycle (pink circles) and the time course of the SP treatments (blue circles) are reported on this time-line. Sampling time points are represented by dark grey circles.

#### *Gut microbiota 16S rDNA analysis by high-throughput sequencing*

In order to characterize the gut microbiome, a fragment of the bacterial 16S rDNA was amplified using the following primers 16S-V4F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') and 16S-V4R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA ATC C-3'), targeting a 251 bp portion of the V4 variable region, as described in Galan et al. 2016). Library preparation and sequencing were conducted by the GenSeq genomic platform of the University of Montpellier. The library was sequenced via a 2 x 300 bp paired-end sequencing using an Illumina MiSeq V3 system. Sequence filtering criteria were applied via the Illumina's quality control procedure. All bioinformatic analyses were conducted using the FROGS pipeline implemented on a Galaxy workbench (Goecks et al. 2010). First, paired-end reads were merged into contigs with the FLASH algorithm (Magoč and Salzberg 2011); sequences not included within the 200–300 bp size range were considered sequencing errors and discarded. Then, chimeras were removed with the VSEARCH tool (Rognes et al. 2016) and the remaining sequences were clustered together into operational taxonomic units (OTUs) using SWARM (Mahé et al. 2014). Each representative OUT sequence was aligned and assigned to a bacterial genus or a higher taxonomic group using the Silva132 16S database (<https://www.arb-silva.de/>). OTUs having a maximal abundance in negative controls were discarded, as described by (Birrer et al. 2017). False-positive OTUs were removed by filtering OTUs representing less than 0.005% of the total OUT abundance (Bokulich et al. 2013) and present in less than two samples. Finally, OTUs presenting a minimal rate of 96% of similarity were clustered together. Additionally, for each sample, OTUs represented by less than 50 reads were considered as a false-negatives and removed from further analyses.

#### *Real-time quantification of bacterial load and major bacterial genus*

To support and complete the microbiota analysis, real-time quantitative polymerase chain reactions (RT-qPCR) were performed to quantify the overall midgut bacterial load at 8dbpm and 14dpbm. These time points correspond to the time of peak oocyst and sporozoite burdens in mosquitoes having taken a *Plasmodium*-infected blood meal. The total bacterial load was measured as the ratio between the bacterial 16S rDNA gene and the mosquito *ace2* gene in 12 randomly chosen samples from each time point. Two PCRs were performed on each DNA, one was specific for the bacterial 16S rDNA with the q16S\_GF2 (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-3') / q16S\_GR2 (5'-GTGGACTACCAGGGTATCTAATC-3') primers and the other was specific for *ace 2* mosquito locus with Acequantidir (5'-GCAGCACCAGTCCAAGG-3') / Acequantirev (5'-



CTTCACGGCCGTTCAAGTAG-3') primers. The size of the amplified fragment was respectively 293 bp and 197 bp. Each PCR was performed with 1  $\mu$ M of each primer mixed with 3  $\mu$ l of Sensi Fast Sybr No-Rox mix (bioline) in a total volume of 6  $\mu$ l under the following conditions: an initial denaturation at 94°C for 8 min, 45 cycles defined by 94°C for 4 s, 70°C for 30 s and 72 for 20 s, followed by a continuous denaturation step between 70 and 94°C in order to generate the melting curve. The semi-quantitative nature of the microbiome diversity analyses allowed us to identify 3 particularly abundant OTUs, corresponding to the *Wolbachia sp.*, *Serratia sp.* and *Elizabethkingia sp.* genera. In order to obtain a more accurate quantification of these three genera, *Wolbachia sp. wsp* locus with primers wolpipdir 5'AGAATTGACGGCATTGAATA-3' / wolpiprev 5'CGTCGTTTTTGTGTTAGTTGTG-3' following the protocol in Berticat et al. (2002) and for the two other bacteria the primers are in development. RT-qPCR were performed using the mosquito *ace2* gene as a reference and under the conditions noted above. All real-time quantitative PCR assays were run on a LightCycler 480 thermocycler (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions.

#### *Statistical analysis*

Microbiome analyses were carried out using the R statistical package (v3.4.4).  $\beta$  diversity (an index that captures the differences in microbial diversity between mosquitoes) was calculated using the 'GuniFrac' package with an  $\alpha = 0.5$  (Chen et al. 2012), and then compared with PERMANOVA ('vegan' package) which allows for multivariate comparisons of microbial community composition. Treatment and day were included as fixed explanatory variables and bird as strata to constrain the permutations and take into account the repeated measurements (Oksanen et al. 2009). Heatmaps were generated using different FROGS tools implemented on the Galaxy workbench and the 'phyloseq' package.

For the subsequent analyses, bird-treatment (SP or control) and dissection day were fitted as fixed explanatory variables. The birds that mosquitoes fed on were fitted as a random effect. Maximal models, including all higher order interactions, were simplified by sequentially eliminating non-significant terms and interactions to establish a minimal model. The significance of the explanatory variables was established using a likelihood ratio test (LRT) which is approximately distributed as a chi-square distribution (Bolker 2008) and using  $p = 0.05$  as a cut-off p-value. The prevalence of each bacteria genus was analyzed with mixed linear model and a binomial distribution. The *bacterial richness* (number of Operational Taxonomic Units, henceforth OTUs, per mosquito) in the midgut was analyzed with a negative binomial distribution to correct for the overdispersion of the data (glmmTMB function). For the analysis of real-time PCR results (total bacterial load, *Wolbachia* load) the qPCR plates were fitted as random effect, and normal distributions were used. The total bacterial load was log transformed and the *Wolbachia* load was transformed with a boxcox transformation with the 'MASS' and 'car' packages (Sakia 1992).



## Transcriptomic experiment

### *Mosquito sampling and processing*

To explore the impact of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) on mosquito gut gene expression, we used an identical protocol as the one described above but for a few minor modifications. Here, 3 SP-treated, 3 control birds were used, and mosquitoes were sampled at 5 different time points: 30 minutes after the blood meal (henceforth 30 mpbm), and 4, 8, 12 and 14 days thereafter (henceforth dpbm, n=10 mosquitoes per sampling day and per cage). The mosquitoes were dissected in a sterile saline solution. The 10 guts obtained from one cage were washed together 3 times in sterile saline solution. As mosquitoes sampled at 30 mpbm and 4 dpbm contain blood or traces of blood, the samples were stored in Trizol (Thermofisher 15596026), while those sampled at 8dpbm, 12 dpbm and 14 dpbm were stored in RNAlater (Thermofisher AM7020). All samples were stored at -80 °C for further processing.

### *RNA extraction and processing*

RNA extractions and reverse transcriptome analyses are being carried out at Olof Hellgren's lab in Lund University, Sweden.

## Ethic statement

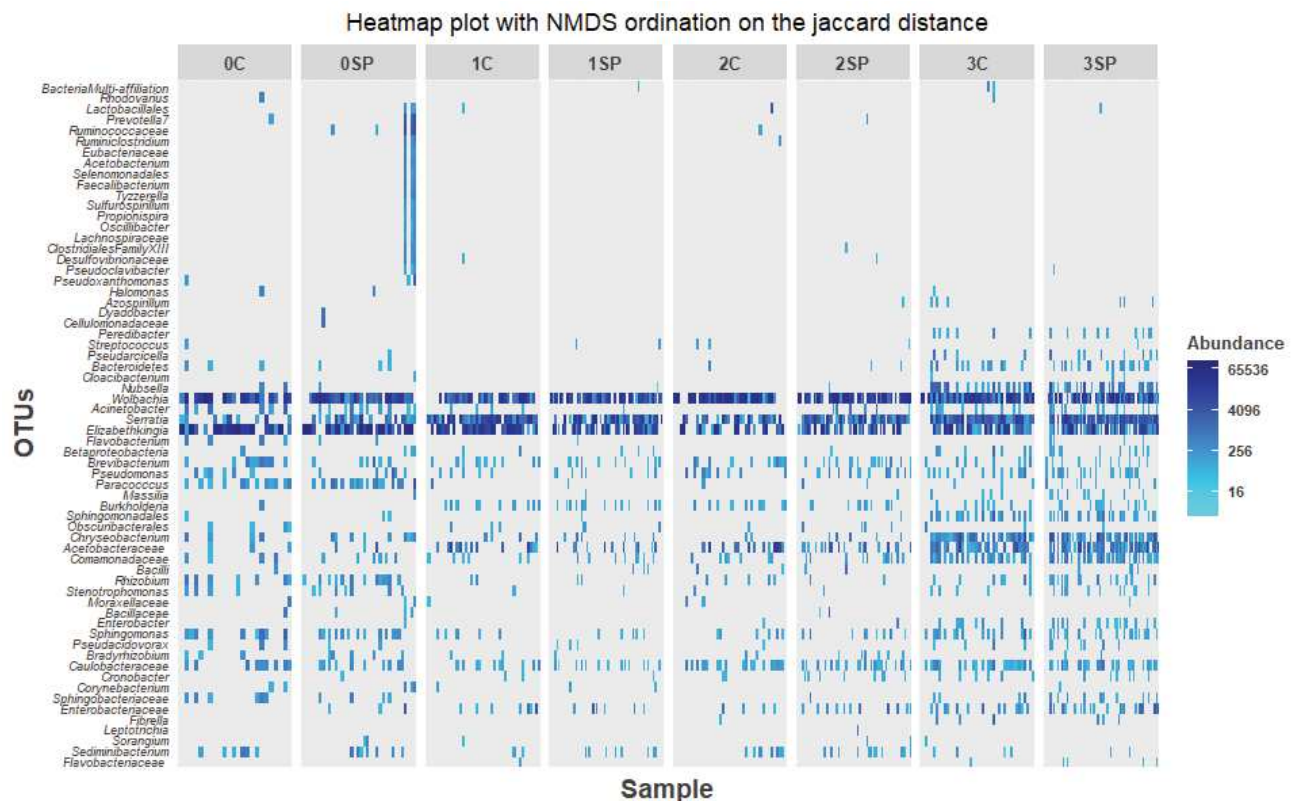
Bird manipulations were carried out in strict accordance with the "National Charter on the Ethics of Animal Experimentation" of the French Government. Experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation established by the authors' institution (CNRS) under the auspices of the French Ministry of Education and Research (permit number CEEA- LR-1051).

## Results

### *Microbiome experiment*

We examined the whole bacterial diversity in a total of 360 samples via high-throughput 16S rDNA sequencing. Samples and negative controls were collected at 4 sampling days (0 dpbm, n=12; 4 dpbm, n=20; 8 dpbm, n=20; 14 dpbm, n=20, 2 control and 3 SP-treated birds). After filtration of false-positive OTUs and negative control examination, 12 944 345 reads (86,79% of raw reads) were allocated to 64 different OTUs (Binetruy & al 2019). Mosquitoes without detected bacteria were discarded from further analysis. *Wolbachia*, *Elizabethkingia* and *Serratia* were the most abundant genera, representing respectively 42%, 35% and 15% of the total number of reads, respectively.

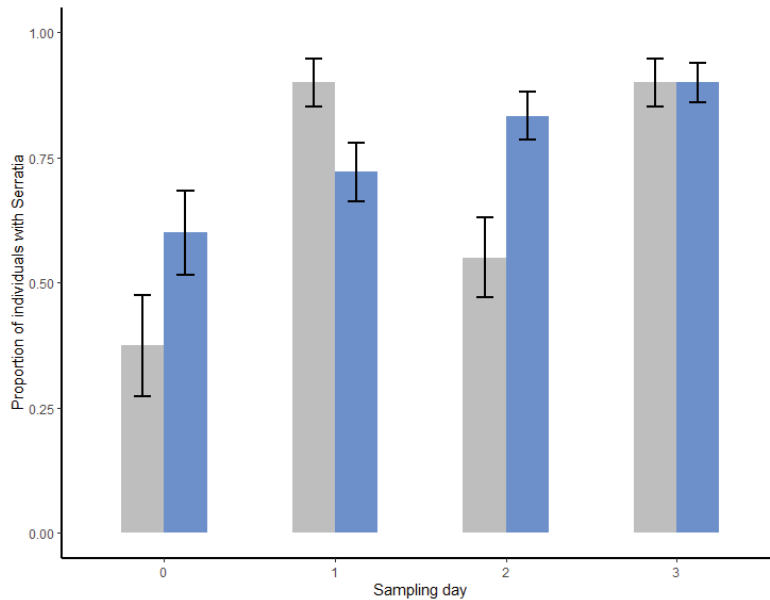
Both bacterial richness and  $\beta$ -diversity were different between the time-sampling points (richness:  $\chi^2 = 117.2$ ,  $p < 0.01$ ;  $\beta$ -diversity:  $F = 8.8969$ ,  $p = 0.0001$ ). Richness decreased after the bloodmeal (mean  $\pm$  se, before bloodmeal:  $7.6 \pm 5.6$ , 4 dpbm:  $4.4 \pm 2.3$ ) and then increased once more (8 dpbm:  $5.1 \pm 2.2$ ; 14 dpbm:  $10.1 \pm 5.2$ ). Both diversity measurements were, however, independent of whether the mosquitoes had fed on a control or an SP-treated bird (richness:  $\chi^2 = 0.6965$ ,  $p = 0.404$ ;  $\beta$ -diversity:  $F = 0.1390$ ,  $p = 0.9899$ , Fig. 2).



**Figure 2: Heatmap of the diversity and abundance of OTUs between samples, depending on treatment conditions (control OUT and treated with sulphadoxine-pyrimethamine (SP)) and sampling time-points (0 as before blood meal, 1 = 4 dpbm, 2 = 8 dpbm and 3 = 14 dpbm).**

We then analyzed the prevalence (presence/absence) of the most common bacteria, defined as the OTUs that were present in at least 30 mosquitoes, independently of the treatment. The prevalence of *Serratia sp.* was strongly dependent on whether mosquitoes had fed on a control or a SP-treated bird (Fig. 3;  $day^*treatment$ :  $\chi^2 = 15.24$ ,  $p = 0.0016$ ). In mosquitoes fed on an SP-treated bird the prevalence of *Serratia sp.* increased from  $60 \pm 8\%$  (mean  $\pm$  se) immediately before the treatment to  $90 \pm 4\%$  14 days post treatment. In untreated mosquitoes, in contrast, *Serratia* prevalence fluctuated: it increased after the blood meal (before =  $37.5 \pm 10\%$ ; 4 dpbm =

90 ± 5%; difference between 0-4 dpbm:  $Z = -4.012$ ,  $p = 0.0015$ ), but decreased between 4 and 8 dpbm (8 dpbm = 55 ± 8%;  $Z = 3.244$ ,  $p = 0.026$ ), and increased again between 8 and 14 dpbm (14 dpbm = 90 ± 5%;  $Z = -3.244$ ,  $p = 0.026$ ). The treatment had, however, no effect on the prevalence of the other OTUs (Tab. 1), although for most of them (except *Wolbachia* and *Brevibacterium sp*) the prevalence varied over time (Tab. 1), decreasing after the blood meal then increasing steadily thereafter until the end of the experiment.



**Figure 3: Proportion of mosquitoes with *Serratia sp.* in the gut for each of the sampling time points (0 = before blood meal, 1 = 4 dpbm, 2 = 8 dpbm and 3 = 14 dpbm) for mosquitoes fed on SP-treated bird (blue) and mosquitoes fed on control birds (grey). Prevalence is represented as the mean ± standard error (calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ).**

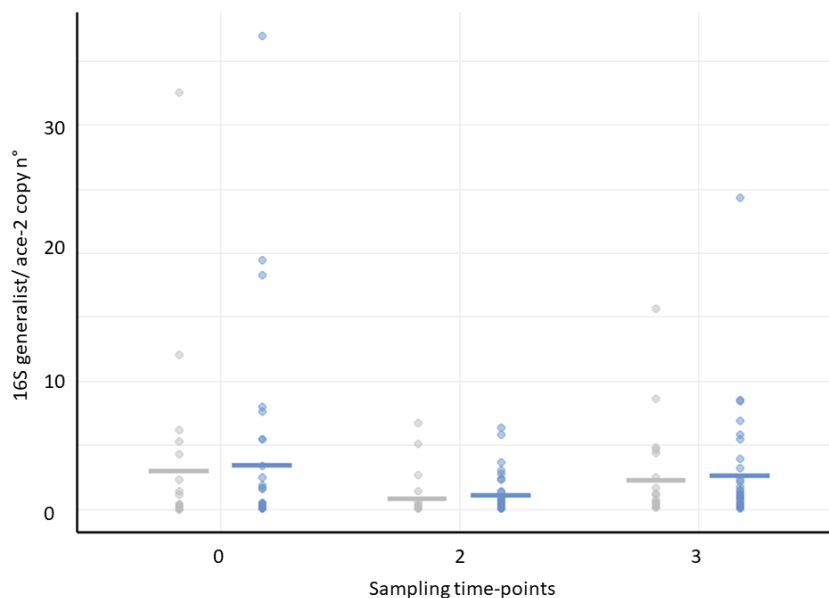
**Table 1: Statistical significance of the effect of the bird treatment and the time on the prevalence of each OUT.**

<i>OTUs</i>	<i>Treatment</i>		<i>Date</i>	
	$\chi^2$	p-value	$\chi^2$	p-value
<i>Wolbachia</i>	0.3183	0.5726	2.6243	0.4532
<i>Elizabethkingia sp.</i>	0.1165	0.7328	16.89	0.0007
<i>Acetobacteraceae</i>	0.3751	0.5403	71.099	<0.01
<i>Chryseobacterium sp.</i>	0.0632	0.8015	126.28	<0.01
<i>Nubsella sp.</i>	0.0047	0.9452	112.92	<0.01
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.3296	0.5659	26.002	<0.01
<i>Paracoccus sp.</i>	0.3624	0.5472	77.624	<0.01
<i>Caulobacteraceae</i>	1.7312	0.1883	18.584	0.0003
<i>Brevibacterium sp.</i>	1.2432	0.2648	3.3233	0.3444

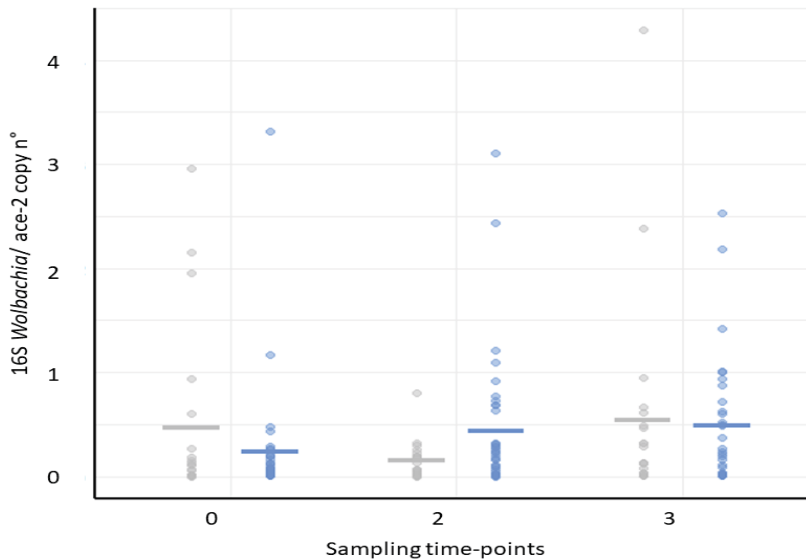
<i>Comamonadaceae</i>	0.1821	0.6695	57.581	<0.01
<i>Sphingomonas sp.</i>	0.3087	0.5785	27.024	<0.01
<i>Acinetobacter sp.</i>	0.3751	0.5403	71.099	<0.01
<i>Rhizobium sp.</i>	0.0524	0.819	36.555	<0.01
<i>Sediminobacterium sp.</i>	0.0778	0.7803	14.622	0.0022
<i>Burkholderia sp.</i>	0.4137	0.5201	19.549	0.0002

The total bacterial load was quantified at 3 different time points (0, 8 and 14 dpbm). It decreased after the bloodmeal until 8 dpbm (mean  $\pm$  se, before blood meal:  $3.22 \pm 0.97$ , 8dpbm:  $0.97 \pm 0.21$ ) and by 14 dpbm the bacterial load had restored its pre-blood meal levels ( $2.48 \pm 0.56$ ;  $\chi^2 = 8.0114$ ,  $p = 0.0182$ ). This effect was independent of the treatment in the bloodmeal ( $\chi^2 = 0.3997$ ,  $p = 0.5273$ ; Fig. 4).

The quantification of *Wolbachia*, the most common bacterial OUT in the mosquitoes, did not reveal any trends either with time or in response to the treatment. (*treatment*:  $\chi^2 = 0.3072$ ,  $p = 0.5794$ ; *time*:  $\chi^2 = 5.6228$ ,  $p = 0.0601$ ; Fig. 5). At the time of submission, the quantification of *Serratia sp.* and *Elizabethkingia sp.* was ongoing.



**Figure 4: Total bacterial load in the mosquito midgut at each sampling point** (0 = before blood meal, 2 = 8 dpbm and 3 =14 dpbm), for mosquitoes fed on SP-treated bird (blue) and mosquitoes fed on control birds (grey). Each point represents one sample and the bars are the mean bacterial load.



**Figure 5: *Wolbachia* load in mosquito's gut at each sampling time-points** (0 = before blood meal, 2 = 8 dpbm and 3 = 14 dpbm), for mosquitoes fed on SP-treated bird (blue) and mosquitoes fed on control birds (grey). Each point represents one sample and the bars are the mean bacterial load.

## Discussion

The largest bottleneck in the development of *Plasmodium* within mosquitoes takes place in the midgut. Here, male and female gametocytes fuse, the resulting mobile zygote needs to traverse the chitinous peritrophic membrane, the oocysts need to find sufficient resources to build up thousands of sporozoites, all while avoiding the mosquito immune system (Smith et al. 2014). All of these crucial steps have been shown to be influenced by the gut microbiome. Any drug that disturbs the mosquito's microbiome has therefore the potential to influence *Plasmodium* infection success. The aim of our study was to investigate the effect of sulfadoxine-pyrimethamine, a main antimalarial drug, on the vector microbiome.

Midgut bacteria are exposed directly to the stress associated with blood digestion. The vertebrate blood increases drastically the temperature of the midgut (10°C on average, Benoit et al. 2011), alters the pH (Nepomuceno et al. 2017) and contains immune effectors (such as antibodies for example) that may directly target the microbiota (Rener et al. 1980). In addition, the bloodmeal results in a drastic increase in iron and the accompanying oxidative stress (Zhou et al. 2007; Wang et al. 2011; Oliveira et al. 2011). We observed a decrease of the bacterial prevalence 4 days after the blood meal suggesting that the bloodmeal challenges the bacterial flora in the midgut. However, the SP treatment had no discernible effect on the overall bacterial burden.

In total, there were 64 different OTUs. The dominant bacteria in terms of prevalence were *Wolbachia*, *Serratia sp.* and *Elizabethkingia sp.* As expected, the bacterial diversity in this

laboratory strain is poorer than that of field-caught *Culex quinquefasciatus* and its sister species *Culex pipiens* mosquitoes (Muturi et al. 2016). The homogeneous conditions under which mosquitoes are reared in the laboratory, and in particular the standardized food provided to the larvae (here Tetramin®) and the adults (*ad libitum* sugar, blood from a single bird species) account for this lack of diversity (Minard et al. 2013; Romoli and Gendrin 2018). The richness varied over time between a minimal of  $4.4 \pm 2.3$  4dpbm and a maximal of  $10.1 \pm 5.2$  OTUs 14dpbm per mosquitoes. This is consistent with other studies on *C. pipiens* that found a mean richness between 5 and 11 OTUs per mosquito (Muturi et al. 2016, 2017). There was no effect of the treatment on either the bacterial richness or the beta-diversity of the bacterial community.

We then focused our attention on the most abundant bacterial genera in the gut: *Wolbachia*, *Serratia sp.* and *Elizabethkingia sp.*, all of which are Gram-negative bacteria. An inverse correlation has been observed between certain Gram-negative bacteria and *Plasmodium* infection rates in mosquitoes (Pumpuni et al. 1993; Dennison et al. 2014). Although our knowledge of the precise mechanisms underlying this effect is still limited, antibodies against Gram-negative bacteria have been shown to increase the conversion of ookinetes to oocysts in certain *Plasmodium* species (Noden et al. 2011). Our knowledge of the precise mechanisms by which certain bacteria can influence the mosquitoes' susceptibility to human pathogens is still limited.

*Wolbachia* is a maternally transmitted bacterial endosymbiont of large diversity of arthropods, including *Culex sp.*, *Aedes sp.* and *Anopheles sp.* mosquitoes (Baldini et al. 2014; Weinert et al. 2015; Ayala et al. 2019). It is best known for manipulating the reproductive output of its hosts, but in recent years it has also come to the forefront for its ability to protect insects against a whole range of viral infections (Hedges et al. 2008; Moreira et al. 2009; Glaser and Meola 2010; Joshi et al. 2017). Current evidence for the ability of natural *Wolbachia* infections to block *Plasmodium* within the mosquitoes in a field study showing a negative correlation between *Wolbachia* and *Plasmodium* (Gomes et al. 2017), is contradictory with an experimental study showing that *Wolbachia* facilitates *Plasmodium* (Zélé et al. 2012). Either way, an effect of currently used antimalarial drugs like SP on *Wolbachia* could translate into an altered capacity of vectors to transmit malaria. Our qPCR results, however, didn't show any effect of SP on the burden of *Wolbachia* in the midgut of *Culex* mosquitoes. It is still, however, possible that SP may have had an effect on the *Wolbachia* population colonizing the mosquito ovaries, the main host organ for this vertically-transmitted bacteria.

*Serratia sp.* is another genus largely represented in our samples and usually found in mosquito's microbiome (Dong et al. 2009). It is an ubiquitous *Enterobacteriaceae*, found in soil, plants and animals (Petersen et al. 2013), and is particularly abundant in mosquitoes. Some strains of a particular species, *Serratia marescens*, seem to have a strong anti-*Plasmodium* activity in several mosquito species (Gonzales-Ceron et al. 2003; Bando et al. 2013; Bahia et al. 2014; Chen



et al. 2017; Wang et al. 2017; Bai et al. 2019). The bacterial influence on mosquito susceptibility to *Plasmodium sp* occurs during the midgut invasion of the motile ookinete (Bando et al. 2013). Several mechanisms have been suggested, including an activation of the immune system, and the production of direct secretions such as serralysins, hemolysins and chitinases (Chen et al. 2017). Chitinases from *Serratia* have been shown to digest the peritrophic membrane of mosquitoes (Huber et al. 1991) therefore potentially facilitating the invasion of the midgut by *Plasmodium*. Proof of concept of the crucial role of chitinases on the successful invasion of *Plasmodium* is that all *Plasmodium* parasites, including *P. relictum* (Garcia-Longoria et al. 2014) produce their own chitinase (Vinetz 2005). In addition, *Serratia* strains produce hemolysins that lyse the erythrocytes thus facilitating the digestion of the blood meal and the acquisition of nutrients not only for themselves but also for other commensal bacteria (Gaio et al. 2011). Interestingly, some *Serratia* strains are resistant to a wide range of antibiotics, including those that inhibit folic acid biosynthesis by binding to *dhfr*, the target of SP (Chen et al 2017). In our experiment, the prevalence of *Serratia sp*, followed a different pattern in mosquitoes fed on SP-treated and untreated hosts. While in control mosquitoes the prevalence was reduced by 39% between 4-8 dpbm, only to recover afterwards, in SP mosquitoes it increased steadily from the beginning till the end of the experiment. The treatment therefore seems to erase the negative effect triggered by the bloodmeal on this bacterium. The sequencing of the *Serratia sp*. and the analysis of its burden (ongoing) will provide a more accurate picture of whether this bacterium is impacted by the SP treatment and, if not, why. In particular, we will be looking for the presence of the A108S mutation in its *dhfr* locus which confers resistance to both trimethoprim (a widely-used antibiotic targeting the folate pathway) and pyrimethamine (Iyer et al. 2001). In addition, the effect of *Serratia* on *Plasmodium* is highly dependent on the strain, so an obvious follow up to this study would be to establish the species and strain present in our mosquitoes and to follow concomitantly the *Plasmodium* and *Serratia* burden in mosquitoes fed on SP-treated blood.

*Elizabethkingia sp.* is a *Flavobacteriaceae* ubiquitously distributed in diverse natural environments including water, soil, sediment, plants, and animal digestive tracts (Wang et al. 2011; Breurec et al. 2016), and is the most abundant bacteria in the *Anopheles gambiae* microbiome (Kämpfer et al. 2011; Gao et al. 2020). This bacterium plays a role in the lysis of erythrocytes after a blood meal and in the management of iron-induced stress in mosquitoes. Iron is insufficient prior to and between blood meals but spikes to ca. 600 ng/ $\mu$ g after a blood meal (Chen et al 2020). *Elizabethkingia anophelis* respond to varying iron concentrations, harvesting iron in sugar-fed mosquitoes and protecting the mosquito against the iron-induced oxidative stress after a blood meal (Chen et al 2020). We saw no differences in *Elizabethkingia sp* prevalence between mosquitoes fed on SP or control hosts. The analysis of *Elizabethkingia sp.* burden are in progress.



As expected, the microbial communities of laboratory reared and wild-caught *Culex* mosquitoes differ widely. In the field, the microbial community is primarily driven by the dominance of *Wolbachia*, and *Serratia* sp. and *Elizabethkingia* sp have not been reported in any of the wild populations sampled to date (Osei-Poku et al. 2012; Chandel et al. 2013; Duguma et al. 2015; Muturi et al. 2016). In contrast, in the main vectors of human malaria in Africa, *Wolbachia* is present but infrequent (Baldini et al. 2014; Gomes et al. 2017) while *Elizabethkingia* sp. and *Serratia* sp. are common (Lindh et al. 2005; Boissière et al. 2012). An obvious follow-up to this experiment would be to conduct a similar experiment in wild *An. gambiae* mosquitoes. While several experiments have been carried out on the role of antibiotics on the microbial community of these vectors of human malaria, to our knowledge information about the role of commonly-used antimalarial drugs is still limited. In this respect, the similarities between the mode of action of certain antibiotics and SP mentioned above render this widely used antimalarial an obvious candidate.

The comparison of the transcriptome of mosquitoes fed on drug-treated and untreated mosquitoes was delayed due to the Covid-19 lockdown. This would have provided us with a wider picture of the drug-induced changes in the mosquito physiology that may bear on the successful infection by *Plasmodium*. Key immune molecules such as TEP1, which plays a major role in the mosquito defense against *Plasmodium* are obvious candidates (Blandin et al Cell 2004). The fate of *Plasmodium* in mosquitoes, however, is also dependent on a whole array of finely tuned physiological mechanisms, many of which act at the midgut level. These include the production of xanthurenic acid (a by-product of the eye pigmentation pathway of mosquitoes required for the exflagellation of the male gametocyte), the amount and timing of digestive enzyme secretion, and the expression of putative ookinete receptors on the mosquito midgut (Vinetz 2005).

## Acknowledges

The experiments were funded through the ANR-16-CE35-0001-01 ('EVODRUG') to AR.

## References

- Ayala, D., O. Akone-Ella, N. Rahola, P. Kengne, M. F. Ngangue, F. Mezeme, B. K. Makanga, M. Nigg, C. Costantini, F. Simard, F. Prugnonle, B. Roche, O. Duron, and C. Paupy. 2019. Natural *Wolbachia* infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. *Evol. Appl.* 12:1583–1594. Wiley-Blackwell.
- Bahia, A. C., Y. Dong, B. J. Blumberg, G. Mlambo, A. Tripathi, O. J. Benmarzouk-Hidalgo, R. Chandra, and G. Dimopoulos. 2014. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ. Microbiol.* 16:2980–2994. Blackwell Publishing Ltd.
- Bai, L., L. Wang, J. Vega-Rodríguez, G. Wang, and S. Wang. 2019. A gut symbiotic bacterium *Serratia marcescens* renders mosquito resistance to *Plasmodium* infection through activation of mosquito immune responses. *Front. Microbiol.* 10:1580. Frontiers Media S.A.
- Baldini, F., N. Segata, J. Pompon, P. Marcenac, W. Robert Shaw, R. K. Dabiré, A. Diabaté, E. A. Levashina, and F. Catteruccia. 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nat. Commun.* 5:3985.
- Bando, H., K. Okado, W. M. Guelbeogo, A. Badolo, H. Aonuma, B. Nelson, S. Fukumoto, X. Xuan, N. Sagnon, and H. Kanuka. 2013. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Sci. Rep.* 3:1–9. Nature Publishing Group.
- Benoit, J. B., G. Lopez-Martinez, K. R. Patrick, Z. P. Phillips, T. B. Krause, and D. L. Denlinger. 2011. Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *PNAS* 108:8026–8029.
- Berticat, C., F. Rousset, M. Raymond, A. Berthomieu, and M. Weill. 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269:1413–1416.
- Binetruy, F., M. Dupraz, M. Buysse, and O. Duron. 2019. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites and Vectors* 12:1–10. BioMed Central.
- Birer, C., N. Tysklind, L. Zinger, and C. Duplais. 2017. Comparative analysis of DNA extraction methods to study the body surface microbiota of insects: A case study with ant cuticular bacteria. *Mol. Ecol. Resour.* 17:e34–e45. Blackwell Publishing Ltd.
- Boissière, A., M. T. Tchioffo, D. Bachar, L. Abate, A. Marie, S. E. Nsango, H. R. Shahbazkia, P. H. Awono-Ambene, E. A. Levashina, R. Christen, and I. Morlais. 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum*

- infection. PLoS Pathog. 8:e1002742. Public Library of Science.
- Bokulich, N. A., S. Subramanian, J. J. Faith, D. Gevers, J. I. Gordon, R. Knight, D. A. Mills, and J. G. Caporaso. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nat. Methods 10:57–59. Nature Publishing Group.
- Bolker, B. M. 2008. Ecological models and data in R.
- Bourne, C. R. 2014. Utility of the biosynthetic folate pathway for targets in antimicrobial discovery. MDPI AG.
- Breurec, S., A. Criscuolo, L. Diancourt, O. Rendueles, M. Vandenbergert, V. Passet, V. Caro, E. P. C. Rocha, M. Touchon, and S. Brisse. 2016. Genomic epidemiology and global diversity of the emerging bacterial pathogen *Elizabethkingia anophelis*. Sci. Rep. 6:1–12. Nature Publishing Group.
- Capan, M., G. Mombo-Ngoma, A. Makristathis, and M. Ramharther. 2010. Anti-bacterial activity of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: comparative in vitro study of sulphadoxine-pyrimethamine, mefloquine, and azithromycin. Malar. J. 9:1–5. BioMed Central.
- Chandel, K., M. J. Mendki, R. Y. Parikh, G. Kulkarni, S. N. Tikar, D. Sukumaran, S. Prakash, B. D. Parashar, Y. S. Shouche, and V. Veer. 2013. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. PLoS One 8:e80453. Public Library of Science.
- Chen, J., K. Bittinger, E. S. Charlson, C. Hoffmann, J. Lewis, G. D. Wu, R. G. Collman, F. D. Bushman, and H. Li. 2012. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. Bioinformatics 28:2106–2113.
- Chen, S., J. Blom, and E. D. Walker. 2017. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. Front. Microbiol. 8:1483. Frontiers Media S.A.
- Chen, S., B. K. Johnson, T. Yu, B. N. Nelson, and E. D. Walker. 2020. *Elizabethkingia anophelis*: physiologic and transcriptomic responses to iron stress. Front. Microbiol. 11:804. Frontiers Media S.A.
- Chen, S., J. Zhao, D. Joshi, Z. Xi, B. Norman, and E. D. Walker. 2016. Persistent infection by *Wolbachia wAlbB* has no effect on composition of the gut microbiota in adult female *Anopheles stephensi*. Front. Microbiol. 7:1485. Frontiers Media S.A.

- Dennison, N. J., N. Jupatanakul, and G. Dimopoulos. 2014. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. Elsevier Inc.
- Dong, Y., F. Manfredini, and G. Dimopoulos. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5:e1000423.
- Duguma, D., M. W. Hall, P. Rugman-Jones, R. Stouthamer, O. Terenius, J. D. Neufeld, and W. E. Walton. 2015. Developmental succession of the microbiome of *Culex* mosquitoes. *Ecological and evolutionary microbiology.* *BMC Microbiol.* 15:1–13. BioMed Central Ltd.
- Gaio, A. D. O., D. S. Gusmão, A. V. Santos, M. A. Berbert-Molina, P. F. P. Pimenta, and F. J. A. Lemos. 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) (L.). *Parasites and Vectors* 4:105. BioMed Central.
- Galan, M., M. Razzauti, E. Bard, M. Bernard, C. Brouat, N. Charbonnel, A. Dehne-Garcia, A. Loiseau, C. Tatar, L. Tamisier, M. Vayssier-Taussat, H. Vignes, and J.-F. Cosson. 2016. 16S rRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. *mSystems* 1:1–22.
- Ganley, J. G., G. Carr, T. R. Ioerger, J. C. Sacchettini, J. Clardy, and E. R. Derbyshire. 2018. Discovery of antimicrobial lipodepsipeptides produced by a *Serratia sp.* within mosquito microbiomes. *ChemBioChem* 19:1590–1594. Wiley-VCH Verlag.
- Gao, H., C. Cui, L. Wang, M. Jacobs-Lorena, and S. Wang. 2020. Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends Parasitol.* 36:98–111. Elsevier Inc.
- Garcia-Longoria, L., O. Hellgren, and S. Bensch. 2014. Molecular identification of the chitinase genes in *Plasmodium relictum*. *Malar. J.* 13:1–5.
- Gendrin, M., Rodgers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouédraogo, J.B., Basáñez, M.G., Cohuet, A., Christophides, G.K., 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat. Commun.* 6, 1–7. doi:10.1038/ncomms6921
- Gendrin, M., F. Turlure, F. H. Rodgers, A. Cohuet, I. Morlais, and G. K. Christophides. 2017. The peptidoglycan recognition proteins PGRPLA and PGRPLB regulate *Anopheles* immunity to bacteria and affect infection by *Plasmodium*. *J. Innate Immun.* 9:333–342. S. Karger AG.
- Glaser, R. L., and M. A. Meola. 2010. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to west nile virus infection. *PLoS One* 5:e11977. Public Library of Science.
- Goecks, J., A. Nekrutenko, J. Taylor, E. Afgan, G. Ananda, D. Baker, D. Blankenberg, R. Chakrabarty, N. Coraor, J. Goecks, G. Von Kuster, R. Lazarus, K. Li, J. Taylor, and K. Vincent. 2010. Galaxy: A comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent

computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11.

- Gomes, F. M., B. L. Hixson, M. D. W. Tyner, J. L. Ramirez, G. E. Canepa, T. L. Alves e Silva, A. Molina-Cruz, M. Keita, F. Kane, B. Traoré, N. Sogoba, and C. Barillas-Mury. 2017. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:12566–12571.
- Gonzales-Ceron, L., F. Santillan, M. H. Rodriguez, D. Mendez, and J. E. Hernandez-Avila. 2003. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J. Med. Entomol.* 40:371–374. Oxford University Press (OUP).
- Hedges, L. M., J. C. Brownlie, S. L. O'Neill, and K. N. Johnson. 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* (80-. ). 322:702.
- Huber, M., E. Cabib, and L. H. Miller. 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:2807–2810.
- Iyer, J. K., W. K. Milhous, J. F. Cortese, J. G. Kublin, and C. V. Plowe. 2001. *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet* 358:1066–1067. Elsevier Limited.
- Joshi, D., X. Pan, M. J. McFadden, D. Bevins, X. Liang, P. Lu, S. Thiem, and Z. Xi. 2017. The maternally inheritable *Wolbachia wAlbB* induces refractoriness to *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi*. *Front. Microbiol.* 8:366. Frontiers Research Foundation.
- Kämpfer, P., H. Matthews, S. P. Glaeser, K. Martin, N. Lodders, and I. Faye. 2011. *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:2670–2675. Microbiology Society.
- Lindh, J. M., O. Terenius, and I. Faye. 2005. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae sensu lato* and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7217–7223.
- Magoč, T., and S. L. Salzberg. 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27:2957–2963.
- Mahé, F., T. Rognes, C. Quince, C. de Vargas, and M. Dunthorn. 2014. Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014:1–13.
- Meister, S., B. Agianian, F. Turlure, A. Reló gio, I. Morlais, F. C. Kafatos, and G. K. Christophides. 2009. *Anopheles gambiae* PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. , doi: 10.1371/journal.ppat.1000542.

- Minard, G., P. Mavingui, and C. V. Moro. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *BioMed Central*.
- Moreira, L. A., I. Iturbe-Ormaetxe, J. A. Jeffery, G. Lu, A. T. Pyke, L. M. Hedges, B. C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L. E. Hugo, K. N. Johnson, B. H. Kay, E. A. McGraw, A. F. van den Hurk, P. A. Ryan, and S. L. O'Neill. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139:1268–1278. *Cell Press*.
- Muturi, E. J., C. H. Kim, J. Bara, E. M. Bach, and M. H. Siddappaji. 2016a. *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. *Parasites and Vectors* 9:1–11. *BioMed Central*.
- Muturi, E. J., J. L. Ramirez, A. P. Rooney, and C. H. Kim. 2017. Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005377. *Public Library of Science*.
- Nepomuceno, D. B., V. C. Santos, R. N. Araújo, M. H. Pereira, M. R. Sant'Anna, L. A. Moreira, and N. F. Gontijo. 2017. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions. *J. Exp. Biol.* 220:3355–3362. *Company of Biologists Ltd*.
- Noden, B. H., J. A. Vaughan, C. B. Pumpuni, and J. C. Beier. 2011. Mosquito ingestion of antibodies against mosquito midgut microbiota improves conversion of ookinetes to oocysts for *Plasmodium falciparum*, but not *P. yoelii*. *Parasitol. Int.* 60:440–446.
- Oksanen, J., G. L. Simpson, and R. Kindt. 2009. The vegan Package.
- Oliveira, J. H. M., R. L. S. Gonçalves, F. A. Lara, F. A. Dias, A. C. P. Gandara, R. F. S. Menna-Barreto, M. C. Edwards, F. R. M. Laurindo, M. A. C. Silva-Neto, M. H. F. Sorgine, and P. L. Oliveira. 2011. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog.* 7:1001320.
- Osei-Poku, J., C. M. Mbogo, W. J. Palmer, and F. M. Jiggins. 2012. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol. Ecol.* 21:5138–5150.
- Petersen, L., L. M. Petersen, and L. S. Tisa. 2013. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Artic. Can. J. Microbiol.*, doi: 10.1139/cjm-2013-0343.
- Peterson, D. S., D. Walliker, and T. E. Wellems. 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:9114–9118.

- Pumpuni, C. B., M. S. Beier, J. P. Nataro, L. D. Guers, and J. R. Davis. 1993. *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by Gram-negative bacteria. *Exp. Parasitol.* 77:195–199.
- Reiner, J., R. Carter, Y. Rosenberg, and L. H. Miller. 1980. Anti-gamete monoclonal antibodies synergistically block transmission of malaria by preventing fertilization in the mosquito. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:6797–6799.
- Rodgers, F. H., M. Gendrin, C. A. S. Wyer, and G. K. Christophides. 2017. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* 13.
- Rognes, T., T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, and F. Mahé. 2016. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 2016:1–22.
- Romoli, O., and M. Gendrin. 2018. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasites and Vectors* 11:1–8. BioMed Central Ltd.
- Sakia, R. M. 1992. The Box-Cox transformation technique: a review. *Stat.* 41:169.
- Sinden, R. E., R. Carter, C. Drakeley, and D. Leroy. 2012. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar. J.* 11:1–11.
- Smith, R. C., J. Vega-Rodríguez, and M. Jacobs-Lorena. 2014. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109:644–661. Fundacao Oswaldo Cruz.
- Tchioffo, M. T., A. Boissière, T. S. Churcher, L. Abate, G. Gimonneau, S. E. Nsango, P. H. Awono-Ambéné, R. Christen, A. Berry, and I. Morlais. 2013. Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS One* 8:e81663. Public Library of Science.
- Vézilier, J., A. Nicot, S. Gandon, and A. Rivero. 2010. Insecticide resistance and malaria transmission: infection rate and oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes infected with *Plasmodium relictum*. *Malar. J.* 9.
- Villa, M., M. Buysse, A. Berthomieu, and A. Rivero. n.d. The transmission-blocking effects of antimalarial drugs revisited: fitness costs and sporontocidal effects of artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine. *Int. J. Parasitol.*
- Vinetz, J. M. 2005. *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. Pp. 357–382 in *Malaria:*



Drugs, Disease and Post-genomic Biology. Springer Verlag, Berlin.

- Wadi, I., M. Nath, A. R. Anvikar, P. Singh, and A. Sinha. 2019. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Med. Chem.* 11:3047–3088.
- Wang, S., A. L. A. Dos-Santos, W. Huang, K. C. Liu, M. A. Oshaghi, G. Wei, P. Agre, and M. Jacobs-Lorena. 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* (80-. ). 357:1399–1402. American Association for the Advancement of Science.
- Wang, Y., T. M. Gilbreath, P. Kukutla, G. Yan, and J. Xu. 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* 6:e24767. Public Library of Science.
- Weinert, L. A., E. V Araujo-Jnr, M. Z. Ahmed, and J. J. Welch. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282.
- WHO. 2019. World Malaria Report 2019. Geneva.
- Zélé, F., A. Nicot, O. Duron, and A. Rivero. 2012. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *J. Evol. Biol.* 25:1243–1252.
- Zhou, G., P. Kohlhepp, D. Geiser, M. del C. Frasquillo, L. Vazquez-Moreno, and J. J. Winzerling. 2007. Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 53:1169–1178.

Chapitre 3 - Costs and benefits associated to  
artesunate-selected lines of *Plasmodium relictum*: a  
study on birds and mosquitoes

Devrait être soumis à *Malaria Journal* ou *Journal of Evolutionary Biology*

**Costs and benefits associated to artesunate-selected lines of *Plasmodium relictum*: a study on birds and mosquitoes**

Villa M<sup>1\*</sup>, Berthomieu A<sup>1,2</sup>, Rivero A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>MIVEGEC (CNRS - Université de Montpellier - IRD)

<sup>2</sup> CREES (Center for Research on the Ecology and Evolution of Diseases), Montpellier

\*Corresponding author ([manon.villa@ird.fr](mailto:manon.villa@ird.fr))

## Abstract

Drug resistance is a major issue in the control of malaria. Mutations linked to drug resistance often target key metabolic pathways and are therefore expected to be associated with biological costs. The spread of drug resistance depends on the balance between the benefits that these mutations provide in the drug-treated host and the costs they incur in the untreated host. The latter may therefore be expressed both in the vertebrate host and in the vector.

Current information about the costs of drug resistant mutations comes almost exclusively from vertebrate hosts. The potential for these costs to be expressed also in mosquitoes has been given only cursory attention. In this study, we aim to identify the costs and benefits of resistance against artesunate (AS), one of the main artemisinin-derivatives used in malaria-endemic countries. For this purpose, we drug-selected different lines of the avian malaria parasite *Plasmodium relictum*, (avian malaria) and tested their within host dynamics and virulence both in the vertebrate host and in its natural vector, the mosquito *Culex (pipiens) quinquefasciatus*.

The within-host dynamics of the drug-selected lines in the treated birds was consistent with the phenotype of resistance on *P. falciparum* in the field: a clearance delay during the treatment followed by a recrudescence once the treatment was interrupted. In the absence of treatment, however, we found no significant costs of resistance in the bird. The results of the two experiments to establish the infectivity of the lines to mosquitoes give somewhat contrasting results but all point towards a decreased infectivity of the drug-selected lines as compared to the ancestral, susceptible one. We discuss the potential implication of these results on the spread of AS-resistance in the field.

**Key - words:** *drug-resistance, biological costs, within-host dynamic, virulence, Plasmodium relictum.*

## Introduction

Malaria is a life-threatening disease caused by *Plasmodium* parasites which are transmitted to people through the bites of infected mosquitoes. According to the latest World Health Organisation Malaria Report, in 2018 there were an estimated 228 million episodes of malaria which caused over 400 000 deaths, most of them among African children (WHO 2019).

Currently, four major antimalarial drug classes exist for the treatment of malaria: quinolines, antifolates, atovaquone and artemisinin derivatives. The widespread use of these synthetic anti-malarials has saved thousands of lives, but has also exerted an intense selection pressure for the evolution of resistance in the parasite. Drug resistance in malaria has become a major human health issue because *Plasmodium* parasites have evolved resistance to all classes of anti-malarials that have gone into widespread use. The rapid evolution of drug resistance in *Plasmodium* highlights the urgent need to understand the selective pressures under which drug resistant mutations emerge and spread in the population (Read and Huijben 2009; Huijben et al. 2011).

The fate of mutations responsible for resistance is expected to be governed by the balance between the benefits accrued in the drug-treated hosts and the costs suffered in the untreated hosts. The benefits of resistance are obvious: drug resistant parasites show an improved ability to survive the drug treatment. The costs of resistance, on the other hand, arise from the metabolic costs of detoxification or the reduced biochemical efficiency associated with target site mutations and are expected to become manifest in the absence of the drugs (Sirawaraporn et al. 1997; Hastings and Donnelly 2005). For this reason, these costs can be expressed both in the vertebrate host, but also in the vector. Current views about the impact of drug resistance on parasite fitness are, however, almost entirely based on data obtained from vertebrate hosts. In humans, costs of resistance have been inferred by the decrease in drug-resistance alleles when drug use is stopped or discontinued (Laufer and Plowe 2004; Ord et al. 2007; Babiker 2009). The largest contributions to our understanding of the costs of drug resistance in the vertebrate host have, however, come from work carried out in animal models. *In vivo* competition experiments using laboratory selected drug resistant strains of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi* have shown that drug resistant strains are competitively suppressed by the sensitive strains in the absence of drug treatment (De Roode et al. 2004; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2010).

In contrast, the costs of resistance in the mosquito vector have, thus far, either been ignored entirely or given only cursory attention (Koella 1998). Yet, the passage through a mosquito is an essential step in the life cycle of *Plasmodium*. Within mosquitoes the parasites reproduce sexually, differentiate, proliferate and migrate to the salivary glands to ensure transmission to the next host. Costs of drug resistance may be expressed at any one of these stages,

profoundly impacting the probability of transmission of drug resistant strains. These costs may be expressed in two different ways: by altering the ability of the parasite to infect the mosquito vector (infectivity), or by altering the effects that the parasite has on the fitness of the mosquito vector (virulence).

Here, we investigate the costs and benefits of resistance to artesunate (one of the main artemisinin derivatives) both in the vertebrate host and in the vector. Artemisinin derivatives are the most potent and effective anti-malarial to date. The precise mode of action of artemisinin derivatives is still controversial, but several lines of evidence indicate that they exert their anti-malarial action by perturbing redox homeostasis and the haematin detoxification in the parasite (O'Neill et al. 2010). To prevent the evolution of resistance, the World Health Organisation recommends the use of the so-called artemisinin combination therapies (or ACTs) which combine the highly toxic, but short lived, artemisinin derivatives with a partner drug with a long half-life such as sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, or lumefantrine (WHO 2015). Despite the hopes raised by the implementation of ACTs, artemisinin resistance is already present in several countries of the Greater Mekong Subregion (WHO 2019), and worryingly, the *de novo* emergence of artemisinin resistance has just been detected in Rwanda (Uwimana et al. 2020). Phenotypically, artemisinin resistant parasites are characterized by: a delay in parasite clearance (resistant parasites take an extra 24-48 to be cleared from the blood) followed by a recrudescence of the parasite at the end of the standard 3-day therapeutic course (Dondorp et al. 2009). This phenotype has been shown to be associated to several mutations in the Kelch 13 (K13) propeller domain of the parasite (Straimer et al. 2014). Despite the ongoing spread of artemisinin resistance across malaria-endemic areas we still lack a clear picture about the costs and benefits associated to these mutations (but see Nair et al. 2018; Tirrell et al. 2019).

Selecting for drug resistance in rodent and avian malaria has proven to be a straightforward procedure that provides a powerful tool for testing the effects of a particular drug resistance mutation on parasite fitness *in vivo* (Greenberg 1956; Beaudoin et al. 1967; De Roode et al. 2005; Walliker et al. 2005; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2011). Here we select for artesunate (AS) resistance in *Plasmodium relictum* (the most widespread species of avian malaria in the wild) by submitting it to gradually increasing doses of the drug. We then compare the within host dynamics and virulence of the drug-selected lines to the unselected control line both in the presence and in the absence of an AS-treatment. We expect that: i) in treated hosts (birds) resistant lines will exhibit a similar phenotype to that of human malaria, i.e. delayed clearance followed by recrudescence, ii) in untreated hosts (birds and vectors) resistant parasites will suffer higher fitness costs than the susceptible counterparts.

## Material and Methods

### Mosquito and parasite protocols -

*Plasmodium relictum* (lineage SGS1) is the aetiological agent of the most prevalent form of avian malaria in Europe. The biology of avian malaria is similar to that of human malaria, both in the vertebrate host and in the mosquito, which is why avian malaria has historically played a key role in human malaria research (Hewitt 1940; Rivero and Gandon 2018). The parasite lineage was isolated from blue tits (*Parus caeruleus*) collected in the Montpellier area in October 2016 and subsequently passaged to naïve canaries (*Serinus canaria*) by intraperitoneal injection. Since then, it has been maintained by carrying out regular passages between our stock canaries through intraperitoneal injections with the occasional passage through the mosquito.

All experiments were carried out using a laboratory line of *Culex pipiens quinquefasciatus* (SLAB strain). *Culex pipiens* is the most important natural vector of avian malaria in Europe. The larvae in all the experiments were reared at a constant density per tray (n=300 larvae) following previously published laboratory protocols (Vézilier et al 2010). Larval trays (n=20) were placed individually inside an “emergence cage” (40 cm x 28 cm x 31 cm) and emerged adults were allowed to feed *ad libitum* on a 10% glucose water solution.

Artesunate-resistant parasite lines were obtained by treating infected birds with increasing concentrations of artesunate (Sigma A3731). Birds were infected by injecting them intra-peritoneally with 100 µl of infected blood. The artesunate treatment was initiated 12 days later, to coincide with the peak of the acute phase of the parasite’s infection. Artesunate was diluted in bicarbonate (50 mg/Kg) and administered through intra-peritoneal injections carried out twice daily (9am and 6pm) for four consecutive days. Five or six days after the last treatment, 100 µl of blood from the treated birds was taken via a wing puncture, transferred to new canaries, and the treatment was thus repeated until a total of 5 passages were carried out. Three AS-treated lines were obtained in this way. Line 1 (R1) was obtained by treating birds with 16 mg/kg artesunate for 3 passages followed by 32 mg/kg for a further 2 passages. Lines 2 (R2) and 3 (R3) were obtained by treating birds with 8 mg/kg for 3 passages followed by 16 mg for 2 passages. The susceptible line (S) was maintained in parallel by injecting birds with bicarbonate following the same protocol. Experiments were initiated immediately after the 5<sup>th</sup> passage.

### Experiment 1 - Phenotypic characterization of drug resistance in the bird

Artesunate-resistance is expected to be beneficial for the parasite in the presence of the drug, but to incur fitness costs when the drug is absent. In this experiment, we infected birds with either the susceptible line (S) or one of the drug-selected lines (R1, R2, R3). Half of the birds where



then treated with a standard dose of artesunate, while the other half were given a sham (bicarbonate) injection. For each bird we quantified parasite density dynamics (number of parasites through time) and parasite virulence (bird weight loss and anaemia).

For this purpose, 6 birds were infected by each of the parasite lines (S, R1, R2 and R3) by means of an intra-peritoneal injection. Each bird received between 70 000 to 90 000 parasites, except for the birds injected with the R3 line, which received 30 000 parasites because the parasitaemia in the donor birds were too low. Bird weight and red blood cell count (RBC: number of red blood cells per ml of blood, Beckman Coulter Counter, Series Z1) were measured immediately before the infection and every two days thereafter. Bird parasitaemia (% red blood cells infected) was monitored every two days from the second day after the infection (2 dpbi= days post bird infection) on wards, using thin smears as described in (Valkiunas 2004). Twelve days after the infections, to coincide with the acute phase of the parasite infection, half of the birds were injected with 50  $\mu$ l of 16mg/kg AS (dissolved in 50mg/kg bicarbonate) while other were injected with an equivalent amount of bicarbonate (50mg/kg). The injections took place twice a day (9 am and 6 pm) for 4 consecutive days (12-15, days post-bird infection, henceforth dpbi). During this period, parasitaemia and virulence measurements were taken 24h after each injection (13-16 dpbi). Bird parasitaemia, weight and RBC were thereafter followed every two days for 16 days after the end of the treatment (18-30 dpbi; Fig. 1). Due to the high variance in parasitaemia between birds on the day immediately preceding the treatment (12 dpbi, see Tab. S1) the parasitaemia on 13 dpbi onwards was calculated using the parasitaemia at 12 dpbi as the baseline ( $px/pb$ , where  $px$  is the parasitaemia at a given day, and  $pb$  the baseline parasitaemia at 12dpbi). This variable is henceforth called 'standardized parasitaemia'.

## **Experiment 2 – Costs of drug resistance in the vector: parasite infectivity and virulence**

The aim of this experiment was to establish whether artesunate-resistant and susceptible lines differ in their virulence in the mosquito. For this purpose, mosquitoes were allowed to blood feed on birds infected with the drug-selected and susceptible parasite lines. Uninfected birds were used as controls. A subsample of the mosquitoes was used to quantify oocyst density, while the rest were followed for several days to quantify their fecundity and longevity.

Six naïve birds were infected with 100 000 parasites of either the S, R1 or R2 lines (2 birds per line). Two further birds were used as uninfected controls. Twelve days after the infection (to coincide with the acute phase of the infection), parasitaemia and gametocytemia of each infected bird were estimated by carrying out blood smear. Birds were then introduced into a cage containing 150 12-day old female mosquitoes. The following morning, unfed females were counted and discarded from the study and all cages were provided with *ad libitum* sugar in the

form of a 10% sugar solution. To quantify fecundity, three days after the blood meal (3 dpmi = days post mosquito infection, Fig.1), a tray of water was placed in each to allow females to lay eggs. The trays were checked daily for the presence of eggs for 3 consecutive days (3-6 dpmi). *Culex pipiens* females lay eggs in a single raft containing up to 250 tightly packed eggs. This facilitates the estimation of the number of laying females and the eggs laid per female. The egg laying date was recorded and the egg rafts were photographed using a binocular microscope equipped with a numeric camera and the eggs counted using the Mesurim Pro freeware (Academie d'Amiens, France). Survival was assessed daily by counting dead individuals lying at the bottom of each cage until all females died.

To quantify parasitaemia, on day 8 and 9 post-blood meal, 20 mosquitoes were haphazardly sampled from each cage and immediately dissected under a binocular microscope to extract the oocyst-infected midguts. Midguts were stained with a 5% mercurochrome solution to assess infection rate (oocysts present/absent) and oocyst burden (number of oocysts) under a phase contrast microscope.

### **Experiment 3 – Costs of drug resistance in the vector: parasite dynamics**

The aim of this experiment was to establish whether artesunate-resistant and susceptible lines differ in their parasite dynamics within the vector. For this purpose, mosquitoes were allowed to blood feed on birds infected with the drug-selected and susceptible parasite lines. Mosquitoes were dissected at regular intervals and the number of oocysts and sporozoites were compared between the resistant and the susceptible lines. Following the results of the previous experiment and due to the work-intensive nature of this experiment, no infection with R3 was carried out in this experiment.

Six naïve birds were infected with 100 000 parasites of either the S, R1 or R2 lines (2 birds per line). Twelve days after the infection, parasitaemia and gametocytaemia of each bird was estimated by carrying out blood smear. Each bird was then introduced into a cage containing 150 12-day old female mosquitoes. The following morning, unfed females were counted and discarded from the study and all cages were provided with *ad libitum* sugar for the remainder of the experiment. Starting on day 4 post blood meal and every 2 days thereafter (4-20 dpmi), 20 mosquitoes were haphazardly sampled from each cage and immediately dissected under a binocular microscope to extract the oocyst-infected midguts. Midguts were stained with a 5% mercurochrome solution to assess infection rate (oocysts present/absent) and oocyst burden (number of oocysts) under a phase contrast microscope. The mosquito thorax, containing the sporozoite-infected salivary glands, was then severed and frozen at -20°C for the subsequent

quantification of parasites via qPCR. Sporozoite quantification was calculated as a ratio between mosquito DNA (*ace2* gene) and *Plasmodium relictum* DNA (*cytb*) as described previously (Zélé et al. 2014).

### **Ethics statement**

Bird manipulations were carried out in strict accordance with the “National Charter on the Ethics of Animal Experimentation” of the French Government. Experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation established by the authors’ institution (CNRS) under the auspices of the French Ministry of Education and Research (permit number CEEA- LR-1051).

### **Statistical analysis**

Analyses were carried out using the R statistical package (v3.4.4). The different statistical models used are described in the Supplementary Materials (Tables S2). The general procedure to build models was as follows: lines (S, R1, R2, R3) were fitted as fixed explanatory variables. Birds and the qPCR plates used to quantify sporozoites in the head-thorax fraction of the mosquito (Experiment 3 only) were fitted as a random effect. Where appropriate, sampling day (continuous or factor), treatment (AS, control, Experiment 1) and standardized parasitaemia were introduced into the model as additional fixed variable. Maximal models, including all higher order interactions, were simplified by sequentially eliminating non-significant terms and interactions to establish a minimal model. The significance of the explanatory variables was established using a likelihood ratio test (LRT) which is approximately distributed as a chi-square distribution (Bolker 2008) and using  $p = 0.05$  as a cut-off p-value.

Mosquito survival (Experiment 2) was analyzed using Cox proportional hazards mixed effect models (coxme). Proportion data (oocyst and sporozoite prevalence) were analyzed using mixed linear models and a binomial distribution. Counting data (eggs per raft) were analyzed using mixed linear models and a Poisson distribution. Response variables that were highly overdispersed (e.g. oocyst burden) were analyzed using mixed negative binomial models (glmmTMB). *A posteriori* contrasts were carried out by aggregating factor levels together and by testing the fit of the simplified model using a LRT (Crawley 2007).

## **Results**

### **Experiment 1 – Phenotypic characterization of artesunate resistance in bird**

We infected birds with either the susceptible line (S) or one of the drug-selected parasite lines (R1, R2, R3). Twelve days later, half of the birds were then treated with AS, while the other half were given a control (bicarbonate) injection. For each bird, we quantified parasite density dynamics (proportion of infected red blood cell through time) and parasite virulence (bird weight loss and anaemia) before, during and after the AS treatment.

We started by analysing whether there were differences between their lines in their virulence or parasitaemia *before* the AS treatment (2-12 dpbi). There was a marginally statistically significant difference between the lines: the parasitaemia of the R2 line increased at a slightly lower rate than that of the other resistant lines (model 1, *line\*day*:  $\chi^2= 8.3134$ ,  $p= 0.04$ , Fig. S1). The red blood cell counts (RBC) were contingent on both parasitaemia and day (model 2, *parasitaemia\*day*:  $\chi^2= 12,887$ ,  $p= 0.0015$ ), but were independent of the line (model 2, *line*:  $\chi^2= 7.3716$ ,  $p= 0.060$ ). Bird weight. on the other hand. was not explained by any of the fitted explanatory variables (model 3, *line*:  $\chi^2= 0.3201$ ,  $p= 0.9562$ , *day*:  $\chi^2 < 0.01$ ,  $p= 0.993$ , *parasitaemia*:  $\chi^2= 0.8511$ ,  $p= 0.3562$ ).

*During* the treatment (13-16 dpbi), the parasitaemia of treated and untreated birds followed very different courses (Fig. 2). Treatment with AS had a very significant effect on the parasitaemia, and the effect was dependent on both the day and the parasite line (model 4, *line\*treatment\*day*:  $\chi^2= 12.088$ ,  $p = 0.0071$ , Fig. 2A). To obtain a more accurate picture of the nature of this interaction, the following analyses were done separately for AS-treated and control birds. Treatment with AS resulted in an overall decrease in parasitaemia in all lines (see Table S3). On the first day after the treatment (day 13) the reduction in parasitaemia was greater in the control line (-93.6% on average) than in either the R1 (-59.8%), R2 (-57.8) or R3 (-69,6%) lines. This effect largely disappears in subsequent days (Table S3). The statistical analyses revealed a significant interaction between day (dpbi) and line (model 5, *line\*day*:  $\chi^2= 20.563$ ,  $p= 0.0147$ ). In untreated birds, we observed a significant difference between the lines (model 6, *line*:  $\chi^2= 9.1288$ ,  $p= 0.0276$ ) that was independent of the sampling time (model 6, *day*:  $\chi^2= 7.7845$ ,  $p= 0.0507$ , Fig. 2B). Indeed, R2 had a significantly higher parasitaemia than the other lines.

*After* the treatment, parasitaemia in the treated birds showed a very different pattern between the lines (model 7, *line*:  $\chi^2= 8.8851$ ,  $p= 0.0308$ , Fig. 2A). Lines R1 and R2 had a significantly higher parasitaemia than the S line. In untreated birds, the parasitaemia decreased with time after the peak (model 8, *day*:  $\chi^2= 54.449$ ,  $p < 0.01$ ) and was marginally dependant of the parasite line (model 8, *line*:  $\chi^2= 7.9084$ ,  $p= 0.0479$ , Fig. 2B). Line R1 seems to have a recrudescence of parasites 26 and 28 dpi.

The analysis of RBC and weight were done concomitantly for the during and after treatment periods. As expected, RBC was higher in AS-treated birds than in their untreated

counterparts (model 9, *treatment\*day*:  $\chi^2= 20.407$ ,  $p= 0.0089$ ). The weight of untreated birds increased with time (model 10, *day*:  $\chi^2= 7.99$ ,  $p= 0.005$ ) but was independent of all of the other measured variables, including the line (model 10, *line*:  $\chi^2= 1.622$ ,  $p= 0.65$ , *parasitaemia*:  $\chi^2= 0.27$ ,  $p= 0.60$ ). In treated birds, weight only increased with time in birds infected with the R2 line (model 11, *line\*day*:  $\chi^2= 15.47$ ,  $p= 0.002$ ).

### **Experiment 2 – Costs of drug resistance in the vector: parasite virulence**

Mosquitoes were allowed to blood feed either on uninfected birds or on birds infected with drug-selected and susceptible parasite lines. A subsample of the mosquitoes fed on the infected birds was used to quantify oocyst density, while the rest were followed for several days to quantify their fecundity and longevity.

The prevalence of infection was low ( $29 \pm 4\%$  of females had at least 1 oocyst in their midgut) and independent of the parasite lines (model 12,  $\chi^2= 0.6017$ ,  $p= 0.7402$ ). Oocyst burden (number of oocysts in infected females), on the other hand, was significantly different between the lines (model 13,  $\chi^2= 8.0512$ ,  $p= 0.0179$ ); mosquitoes infected with the S line had a significantly higher number of oocysts (mean  $\pm$  s.e:  $70 \pm 22$ ) than mosquitoes infected with the R1 (mean  $\pm$  s.e:  $13 \pm 5$ ) and R2 (mean  $\pm$  s.e:  $25 \pm 11$ ) lines (Fig. 3).

There were also significant differences in mosquito fecundity (number of eggs per raft) between lines (model 14,  $\chi^2= 11.1$ ,  $p= 0.0112$ , Fig. 4). Post-hoc analysis showed that mosquitoes infected with the R2 line laid significantly fewer eggs (mean  $\pm$  s.e:  $126 \pm 4$ ) than uninfected mosquitoes (mean  $\pm$  s.e:  $142 \pm 5$ ) and mosquitoes infected with the S (mean  $\pm$  s.e:  $142 \pm 4$ ) and R1 (mean  $\pm$  s.e:  $148 \pm 4$ ) lines ( $\chi^2= 6.5741$ ,  $p= 0.0104$ ).

There were no significant differences in longevity between infected and uninfected mosquitoes, or between mosquitoes infected with the different lines (model 15,  $\chi^2= 3.7758$ ,  $p= 0.2867$ , Fig. 5).

### **Experiment 3 – Costs of drug resistance in the vector: parasite dynamics**

Mosquitoes were allowed to blood feed on birds infected with drug-selected and susceptible parasite lines. Mosquitoes were dissected at regular intervals and the number of oocysts and sporozoites were compared between the resistant and the susceptible lines.

The mean oocyst prevalence (% mosquitoes containing at least 1 oocyst) averaged over the whole experiment was higher in control and R1 lines (mean  $\pm$  s.e., control  $67.92 \pm 6.47\%$ , R1:  $53.65 \pm 7.88\%$ ) than in R2 line ( $36.36 \pm 10.49\%$ ). The same pattern was found with oocyst burden, which was higher in the control ( $32.80 \pm 11.95$ ) and R1 lines ( $18.90 \pm 11.33$ ) than in the R2 line ( $7.75 \pm 4.83$ ). When day was fitted to the model the effect of line, however disappeared (prevalence: model 16,  $\chi^2= 5.3164$ ,  $p= 0.0701$ ; burden: model 17,  $\chi^2= 0.2313$ ,  $p= 0.8908$ ; Fig. 6A

and B). Oocyst prevalence and burden decreased significantly with time (prevalence: model 16,  $\chi^2= 4.9008$ ,  $p= 0.0268$ , burden: model 17,  $\chi^2= 21.772$ ,  $p < 0.01$ ).

The mean sporozoite prevalence, averaged over the whole experiment, was roughly 2-times higher in the control and R1 lines (control:  $28.30 \pm 6.24\%$ , R1:  $27.90 \pm 6.92\%$ ) than in the R2 line ( $13.63 \pm 7.48\%$ ). Sporozoite burden, on the other hand, was 4-5 higher in control mosquitoes than in resistant ones (mean  $\pm$  s.e. control:  $0.0126 \pm 0.0067$ , R1:  $0.0026 \pm 0.0009$ , R2:  $0.0034 \pm 0.0029$ ). Both sporozoite prevalence and burden changed according to the dissection day (prevalence: model 18, *day*:  $\chi^2= 7.8744$ ,  $p= 0.0487$ , burden: model 19, *day*:  $\chi^2= 10.886$ ,  $p= 0.0124$ , Fig. 6C and D). When day was fitted to the model the effect of line, however disappeared (prevalence: model 18, *line*:  $\chi^2= 0.1788$ ,  $p= 0.9145$ , burden: model 19, *line*:  $\chi^2= 1.9214$ ,  $p= 0.3826$ , Fig. 6C and D). Interestingly, however, the correlation between oocyst and sporozoite burden at a given time was strongly dependent on the line (model 19, *line\*oocyst*:  $\chi^2= 10.065$ ,  $p= 0.0065$ , Fig. 7). In all lines the number of sporozoites found at a given time in the head-thorax was positively correlated with the number of oocysts found concomitantly in the midgut. The relationship was, however, significantly steeper for S than for R1 and R2 mosquitoes.

## Discussion

Drug resistance mutations are known to disrupt the parasite's metabolism, generating fitness costs. In drug-treated hosts these costs are largely compensated by the benefits conferred by the resistance. In untreated hosts, however, the magnitude of these costs will determine whether these mutations will persist and spread in the population. Here we selected different parasite lines using increasing doses of artesunate. These 3 lines were then compared to the untreated (control) line issued from the same ancestral isolate in a series of experiments that aim to quantify the costs (untreated hosts) and benefits (treated hosts) of the drug-selected lines.

In Experiment 1, the lines were phenotypically characterized in treated and untreated birds before (day0-day 12 post infection), during (day13 – day 16), and after (day 18-day 30) the treatment, by quantifying both the intra-host parasite dynamics and its virulence (weight loss and anaemia). Before the treatment, the parasite burden of the 4 lines (3 selected + control) behaved in a very similar way, save for a marginally significant slower rate for R2. There was no evidence for differences in virulence between the lines. During the treatment, however, a major difference between the lines was observed. The within-host dynamics of the drug-selected lines in the treated birds was consistent with the phenotype of resistance on *P. falciparum* in the field: a clearance delay during the treatment followed by a recrudescence once the treatment was interrupted. In the first 24h after the beginning of the treatment (day 13) the parasitaemia of the control line dropped by over 90% on average, while drug selected lines saw their parasitaemia



drop by between 60% (R1, R2) and 70% (R3). This effect was short lived as, by the following day, there was no discernible difference between the parasitaemia of control and drug selected lines. The hallmark of artemisinin derivatives is that they clear parasitaemia more rapidly than other drugs. Elimination of microscopically detectable parasitemia by 24–48 hours, is typical of *P. falciparum* that is fully susceptible to ACTs, and persistent parasitemia 72 hours after the start of the treatment treatment is interpreted as evidence of possible resistance to the artemisinin-derivative component (Witkowski et al. 2013; Mok et al. 2015). This delayed clearance phenotype is a far cry from the standard definition of resistance (survival to a drug treatment), which is why artesunate resistance is commonly referred to as 'partial resistance' (Uhlemann et al. 2010; Menard and Dondorp 2017). Partial artemisinin resistance rarely leads to ACT failure, but may select for drug resistance to the partner drug, as larger parasite populations remain in the blood stream for longer periods of time (Fairhurst 2015). In our study, a much more accurate estimation of the clearance delay (which is usually calculated in hours rather than days) would have required a more regular monitoring of the birds, in particular during the first 24h after the beginning of the treatment. Given the length of the experiment, we chose against this procedure to limit the stress the birds were exposed to and the associated mortality losses. In keeping with previous studies on *P. falciparum* parasites, two of our drug-selected lines (R1, R2) also had a more pronounced recrudescence, producing on average more than 20 times as many parasites in the two weeks following drug treatment than did our control line (Fig. 2A). Slower clearance and recrudescence, were not linked to parasite virulence (anaemia, weight loss) confirming previous studies showing that artesunate resistance treatment does not drive the evolution of virulence in this system (Pollitt et al. 2014).

Current views about the impact of drug resistance on parasite fitness are almost entirely based on data obtained from the vertebrate host. In humans, costs of resistance have been inferred by the decrease in drug-resistance alleles when drug use is stopped or discontinued (Laufer and Plowe 2004) and from the decrease in the frequency of drug resistant parasites during the dry season, when there is no transmission and drug use is dramatically reduced. Direct experimental evidence of the costs of artemisinin resistance has been obtained by setting up *in vitro* competition experiments between drug-resistant and susceptible *Plasmodium* strains (Hott et al. 2015; Nair et al. 2018; Tirrell et al. 2019; Mathieu et al. 2020). To our knowledge the only *in vivo* experiments were carried out with *Plasmodium chabaudi* (a rodent species) and showed no obvious cost of AS in the absence of treatment (Pollitt et al. 2014).

We did not observe any costs associated to the AS-selected lines in the absence of the AS-treatment. In fact, an opposite trend was found, whereby the drug selected lines (R2 in particular) fares better in terms of parasitaemia than its susceptible counterparts. One possible explanation for these results, which would warrant further studies is that drug selection may have also select



for other parasite traits that will increase the parasite's survival probabilities in the presence of drugs. Highly replicating parasite lines may be selected for because they can rapidly recover high parasite densities after a bout of drug-induced mortality (Schneider et al 2008). This opens the possibility of drugs selecting for more resistant but also more virulent parasites. Of note, we did not find any noticeable difference in virulence between birds infected with the drug-selected and susceptible lines.

Despite its crucial implications for the emergence and spread of drug resistant mutations in the field, work on the transmissibility of artemisinin-resistant parasites, is practically non-existent. St. Laurent et al. (2015) showed that artemisinin-resistant strains of *P. falciparum* from Cambodia were able to infect and produce sporozoites in three vector species (*An. dirus*, *An. minimus*, *An. coluzzi*), and Pollitt et al. (2014) showed that in the rodent malaria species *P. chabaudi*, the AS-selected line produced more gametocytes (the blood stages of the parasite that are transmitted to the mosquito) than its susceptible counterpart. Here, we infected mosquitoes with the drug-selected (R1, R2) and control lines in two different experiments. The results of these experiments rendered contrasting results. In experiment 2, all mosquitoes were dissected on a single day corresponding to the peak oocystaemia as established in previous experiments with the ancestral, susceptible line (day 8-9). In this experiment we observed no significant difference in prevalence between the lines, but a highly significant difference in the number of oocysts between the control and the two drug-selected lines. Drug-selected lines produced between 3-5 times more oocysts than the control line. This difference could reflect either a true difference in oocyst burden between the lines, or a shift in the within-mosquito dynamics (peak oocystaemia may have occurred earlier or later in the drug-selected lines). To discriminate between these two options a new experiment (experiment 3) was launched, where mosquitoes were dissected every two days (6-20 days post infection). Here, the mean overall prevalence and burden of oocysts was higher in control than in R1 and R2 mosquitoes. This effect, however, disappears once day is fitted to the model. For unknown reasons, the overall prevalence of the infection in the mosquitoes was very low (23%, it is usually >85% following the same protocol) which significantly reduced the statistical power of the analyses.

In experiment 3, the sporozoites in the salivary glands were quantified at the same time as the oocysts in the stomach. As above, overall prevalence was higher in control and R1 mosquitoes than in R2 mosquitoes. Sporozoite burden, on the other hand, showed a clear partition between the control and the drug-selected (R1, R2) lines, with the former having overall 4-5 higher burden than the latter. As above, however, when date was fitted to the model the effect of line on sporozoite prevalence and burden disappeared, although the same caveats regarding statistical power apply. In addition, we obtained a significant correlation between the number of oocysts and sporozoites at a given point in time, and the slope for this correlation was significantly

steeper for control mosquitoes than for drug-selected ones. The reasons for this are not entirely clear and would warrant further detailed studies that would allow us to establish whether the steeper slope of the control line is due to a higher number of sporozoites per oocyst, or to a faster oocyst to sporozoite transition.

In conclusion, our data using drug-selected strains of *P. relictum* provides further proof that susceptibility to artesunate can be rapidly lost under drug pressure. The clearance delay and recrudescence observed during and after the AS treatment, respectively, in two of our three AS-selected lines were similar to the resistance phenotype seen in human malaria infections. In *P. falciparum* this phenotype is associated to several mutations in the gene coding for kelch 13 (k13), a protein that is essential for the intra-erythrocytic growth of the parasite. Mutations in this protein modify the parasite's cell cycle so that it spends more time at a developmental stage that is less sensitive to the artemisinin drugs (early ring stages). The most widespread allele associated with partial artemisinin resistance in South East Asia is C580Y (Ariey et al. 2014), while in Africa (Rwanda), recent work has demonstrated de novo emergence and clonal expansion of a new mutation, R561H. k13 is a highly conserved protein amongst Apicomplexans, and orthologous amino acid sequences have been found in 21 different *Plasmodium* species, including *P. relictum* (Coppée et al. 2019). Unfortunately, the drug-selected lines were lost after the completion of the experiment so it was not possible to associate the resistance phenotype to any given k13 mutation.

The recent emergence and clonal expansion of R561H in Rwanda, highlights the urgent need to understand the costs associated to artemisinin-resistant strains both in the vertebrate host and in the mosquito vector. In our avian malaria model, we observed no obvious costs of the AS-selected lines in the vertebrate host. Further work should aim at exploring whether the drug-selected lines are competitively suppressed when in competition with a susceptible line (De Roode et al. 2004; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2010). Current knowledge on the transmission potential of artemisinin-resistant strains is extremely limited. Our results suggest that, under certain experimental conditions, drug-selected strains may generate lower sporozoite prevalences and burdens in mosquitoes, thus potentially impacting their transmission efficiency. Although the relative costs and benefits of resistance likely differ in magnitude between human and avian malaria parasites, these results provide proof of principle of the need for further studies comparing the infectiousness to mosquitoes of artemisinin-resistant and susceptible strains of human malaria.

## References

- Ariey, F., B. Witkowski, A. Chanaki, J. Beghain, A.-C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Ménard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon, and D. Ménard. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 55:50–55.
- Babiker, H. A. 2009. Seasonal fluctuation of drug-resistant malari parasites: a sign of fitness cost. *Trends Parasitol.* 25.
- Beaudoin, R. L., C. P. A. Strome, and C. G. Huff. 1967. Persistence of pyrimethamine resistance in the exoerythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Exp. Parasitol.*, doi: 10.1016/0014-4894(67)90034-3.
- Bolker, B. M. 2008. Ecological models and data in R.
- Coppée, R., D. C. Jeffares, M. A. Miteva, A. Sabbagh, and J. Clain. 2019. Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13. *Sci. Rep.* 9:1–17. Nature Publishing Group.
- Crawley, M. J. 2007. *The R book*. Imperial C. UK.
- De Roode, J. C., R. Culleton, A. S. Bell, and A. F. Read. 2004. Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar. J.* 3:33.
- De Roode, J. C., R. Pansini, S. J. Cheesman, M. E. H. Helinski, S. Huijben, A. R. Wargo, A. S. Bell, B. H. K. Chan, D. Walliker, A. F. Read, and N. A. Moran. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *PNAS* 102:7624–7628.
- Dondorp, A. M., F. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phyto, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Ariey, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. J. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, and N. J. N. White. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 361:455–467.
- Fairhurst, R. M. 2015. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis.* 28:417–425.
- Greenberg, J. 1956. Mixed lethal strains of *Plasmodium gallinaceum*: drug-sensitive, transferable (SP) × drug-resistant, non-transferable (BI). *Exp. Parasitol.* 5:359–370.
- Hastings, I. M., and M. J. Donnelly. 2005. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist. Updat.* 8:43–

50.

Hewitt, R. 1940. Bird Malaria.

Hott, A., M. S. Tucker, D. Casandra, K. Sparks, and D. E. Kyle. 2015. Fitness of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 70:2787–2796.

Huijben, S., W. A. Nelson, A. R. Wargo, D. G. Sim, D. R. Drew, and A. F. Read. 2010. Chemotherapy, within host ecology and the fitness of drug resistant malaria parasites. *Evolution* (N. Y). 64:2952–2968.

Huijben, S., D. G. Sim, W. A. Nelson, and A. F. Read. 2011. The fitness of drug-resistant malaria parasites in a rodent model: Multiplicity of infection. *J. Evol. Biol.* 24:2410–2422.

Koella, J. C. 1998. Costs and benefits of resistance against antimalarial drugs. *Parasitol. Today* 14:360–364.

Laufer, M. K., and C. V. Plowe. 2004. Withdrawing antimalarial drugs: Impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist. Updat.* 7:279–288.

Mathieu, L. C., H. Cox, A. M. Early, S. Mok, Y. Lazrek, J. C. Paquet, M. P. Ade, N. W. Lucchi, Q. Grant, V. Udhayakumar, J. S. F. Alexandre, M. Demar, P. Ringwald, D. E. Neafsey, D. A. Fidock, and L. Musset. 2020. Local emergence in amazonia of *Plasmodium falciparum* K13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife* 9:1–21.

Menard, D., and A. Dondorp. 2017. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7:1–24.

Mok, S., E. A. Ashley, P. E. Ferreira, L. Zhu, Z. Lin, T. Yeo, K. Chotivanich, M. Imwong, S. Pukrittayakamee, M. Dhorda, C. Nguon, P. Lim, C. Amaratunga, S. Suon, T. T. Hien, Y. Htut, M. A. Faiz, M. A. Onyamboko, M. Mayxay, P. N. Newton, R. Tripura, C. J. Woodrow, O. Miotto, D. P. Kwiatkowski, F. Nosten, N. P. J. Day, P. R. Preiser, N. J. White, A. M. Dondorp, R. M. Fairhurst, and Z. Bozdech. 2015. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science* (80-. ). 347.

Nair, S., X. Li, G. A. Arya, M. McDew-White, M. Ferrari, F. Nosten, and T. J. C. Anderson. 2018. Fitness costs and the rapid spread of kelch13-C580Y substitutions conferring artemisinin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.

O'Neill, P. M., V. E. Barton, and S. A. Ward. 2010. The molecular mechanism of action of artemisinin— the debate continues. *Molecules* 15:1705–1721. Molecular Diversity Preservation International.

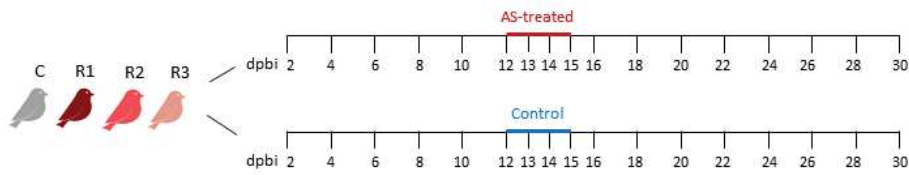
Ord, R., N. Alexander, S. Dunyo, R. Hallett, M. Jawara, G. Targett, C. J. Drakeley, and C. J. Sutherland.

2007. Seasonal carriage of *pfprt* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J. Infect. Dis.* 196:1613–1619.
- Pollitt, L. C., S. Huijben, D. G. Sim, R. M. Salathé, M. J. Jones, and A. F. Read. 2014. Rapid response to selection, competitive release and increased transmission potential of artesunate-selected *Plasmodium chabaudi* malaria parasites. *PLoS Pathog.* 10:e1004019.
- Read, A. F., and S. Huijben. 2009. Evolutionary biology and the avoidance of antimicrobial resistance. *Evol. Appl.* 2:40–51. John Wiley & Sons, Ltd.
- Rivero, A., and S. Gandon. 2018. Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends Parasitol.* 34.
- Sirawaraporn, W., T. Sathitkul, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong, and D. V Santi. 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:1124–1129.
- St. Laurent, B., B. Miller, T. A. Burton, C. Amaratunga, S. Men, S. Sovannaroeth, M. P. Fay, O. Miotto, R. W. Gwadz, J. M. Anderson, and R. M. Fairhurst. 2015. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa. *Nat. Commun.* 6:1–7. Nature Publishing Group.
- Straimer, J., N. F. Gnädig, B. Witkowski, C. Amaratunga, V. Duru, A. P. Ramadani, M. Dacheux, N. Khim, L. Zhang, S. Lam, P. D. Gregory, F. D. Urnov, O. Mercereau-Puijalon, F. Benoit-Vical, R. M. Fairhurst, D. Ménard, and D. A. Fidock. 2014. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* (80-. ). 2624:428–431.
- Tirrell, A. R., K. M. Vendrely, L. A. Checkley, S. Z. Davis, M. McDew-White, I. H. Cheeseman, A. M. Vaughan, F. H. Nosten, T. J. C. Anderson, and M. T. Ferdig. 2019. Pairwise growth competitions identify relative fitness relationships among artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* field isolates. *Malar. J.* 18:295. BioMed Central Ltd.
- Uhlemann, A. C., D. A. Fidock, A. M. Dondorp, S. Yeung, L. White, C. Nguon, N. P. J. Day, D. Socheat, and L. Von Seidlein. 2010. Loss of malarial susceptibility to artemisinin in Thailand. *Lancet* 8:272–280.
- Uwimana, A., E. Legrand, B. H. Stokes, J. L. M. Ndikumana, M. Warsame, N. Umulisa, D. Ngamije, T. Munyaneza, J. B. Mazarati, K. Munguti, P. Campagne, A. Criscuolo, F. Ariey, M. Murindahabi, P. Ringwald, D. A. Fidock, A. Mbituyumuremyi, and D. Menard. 2020. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* *kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* 1–7. Nature Research.
- Valkiunas, G. 2004. Avian malaria parasites and other haemosporidia.

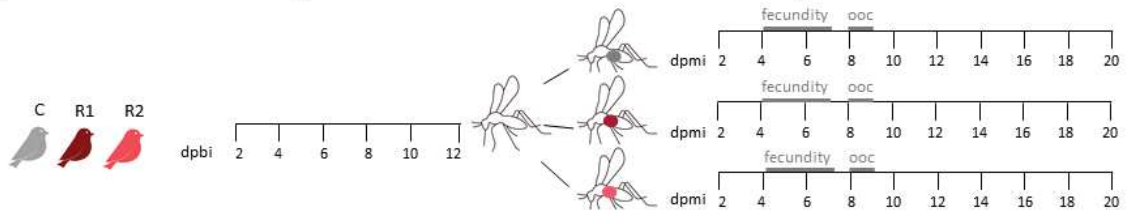
- Walliker, D., P. Hunt, and H. Babiker. 2005. Fitness of drug-resistant malaria parasites.
- Wargo, A. R., S. Huijben, J. C. De Roode, J. Shepherd, and A. F. Read. 2007. Competitive release and facilitation of drug-resistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *PNAS* 104:19914–19919.
- WHO. 2015. Guidelines for the treatment of malaria - third edition.
- WHO. 2019. World Malaria Report 2019. Geneva.
- Witkowski, B., N. Khim, P. Chim, S. Kim, S. Ke, N. Kloeung, S. Chy, S. Duong, R. Leang, P. Ringwald, A. M. Dondorp, R. Tripura, F. Benoit-Vical, A. Berry, O. Gorgette, F. Ariey, J. C. Barale, O. Mercereau-Puijalon, and D. Menard. 2013. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:914–923.
- Zélé, F., A. Nicot, A. Berthomieu, M. Weill, O. Duron, and A. Rivero. 2014. *Wolbachia* increases susceptibility to *Plasmodium* infection in a natural system. *Proc. R. Soc. B* 281.

# Figures

## Experiment 1 – Phenotypic characterization of AS resistance in the bird

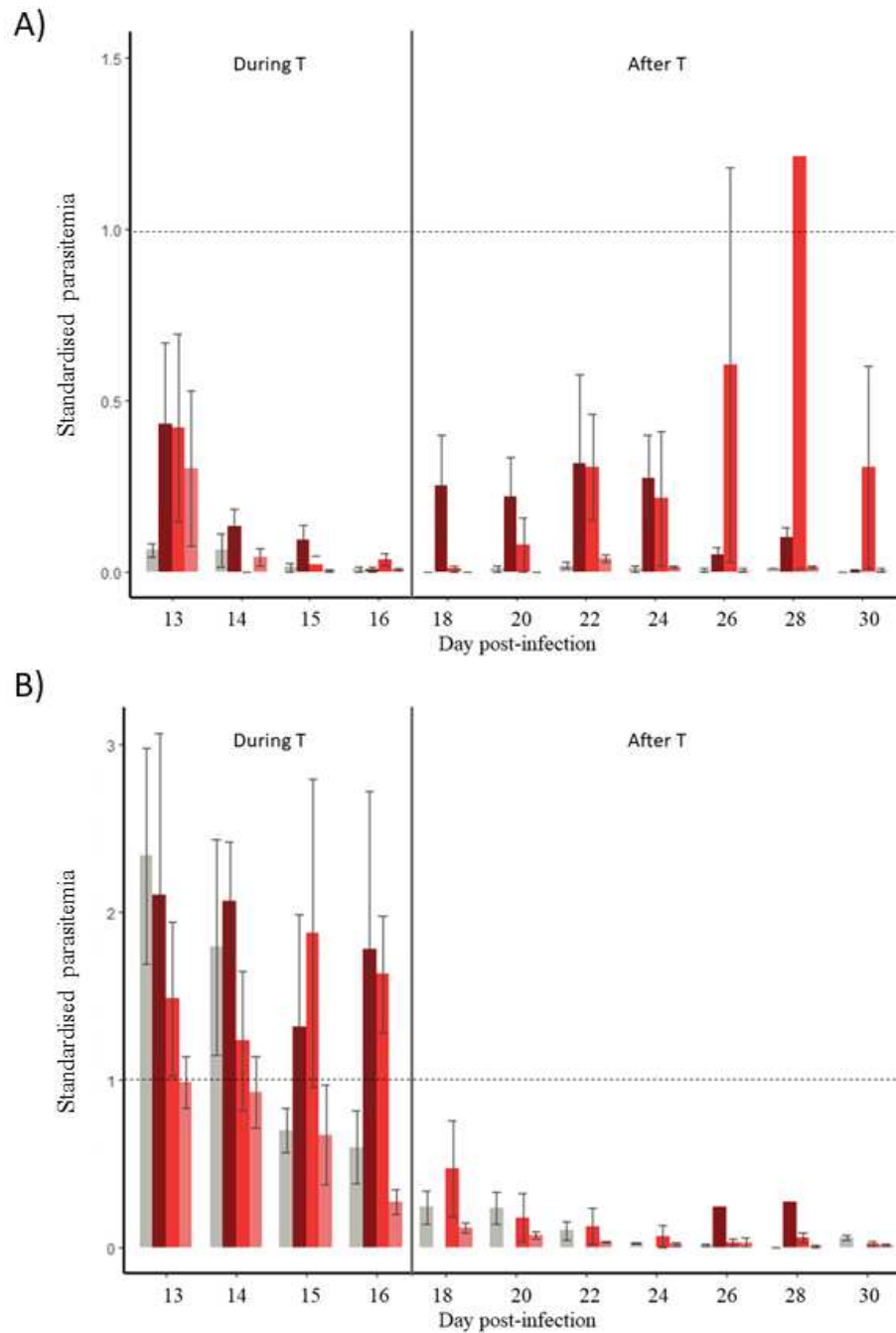


## Experiments 2 and 3 – Phenotypic characterization of AS resistance in the mosquito

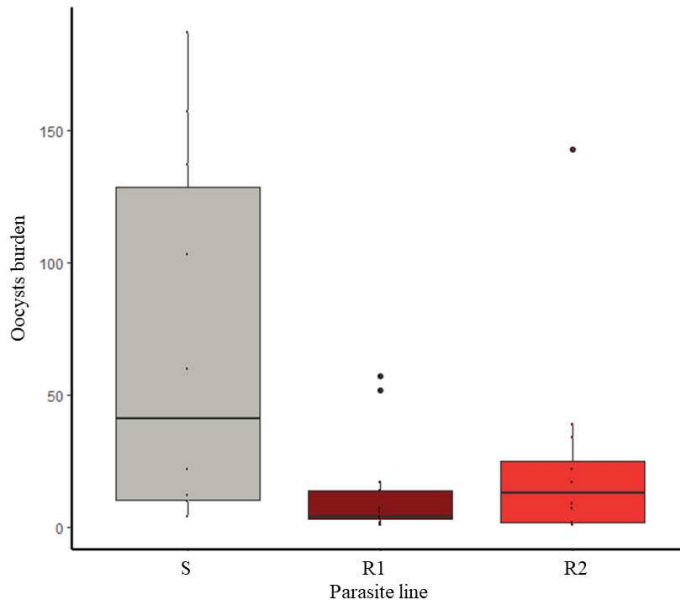


**Figure 1** – Experimental design for Experiments 1, 2 and 3. The time line corresponds to the time-points at which samples were taken: Experiment 1 (n = 6 birds per line) : bird parasitaemia, bird weight and RBC count; Experiment 2 (n = 2 birds per line) : fecundity (4-7 dpmi, ~150 mosquitoes per bird), longevity (~150 mosquitoes per bird, survival was monitored on a daily basis), and oocyst count (8-9 dpmi, 20 mosquitoes per bird); Experiment 3 (n = 2 birds per line, n = 20 mosquitoes per bird) : oocyst (abdomen) and sporozoite (head-thorax) prevalence and intensity within mosquitoes. dpbi = days post bird infection, dpmi = days post mosquito infection. C = Control line, R1, R2, R3 = drug-selected lines.

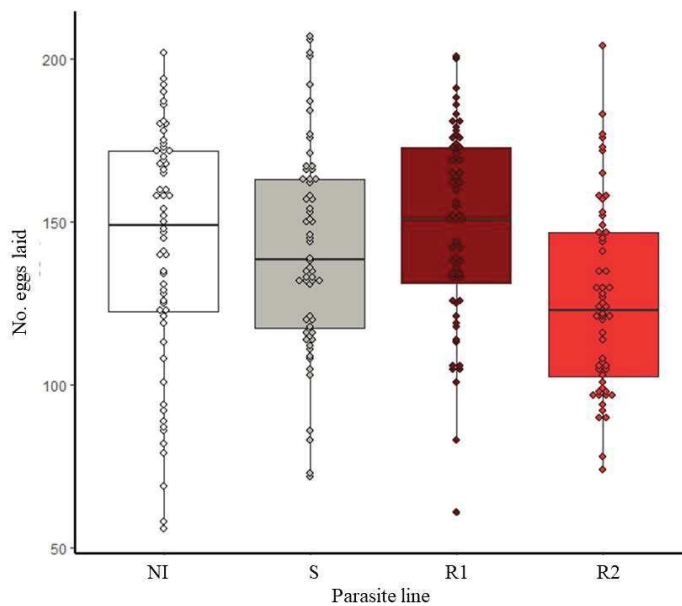




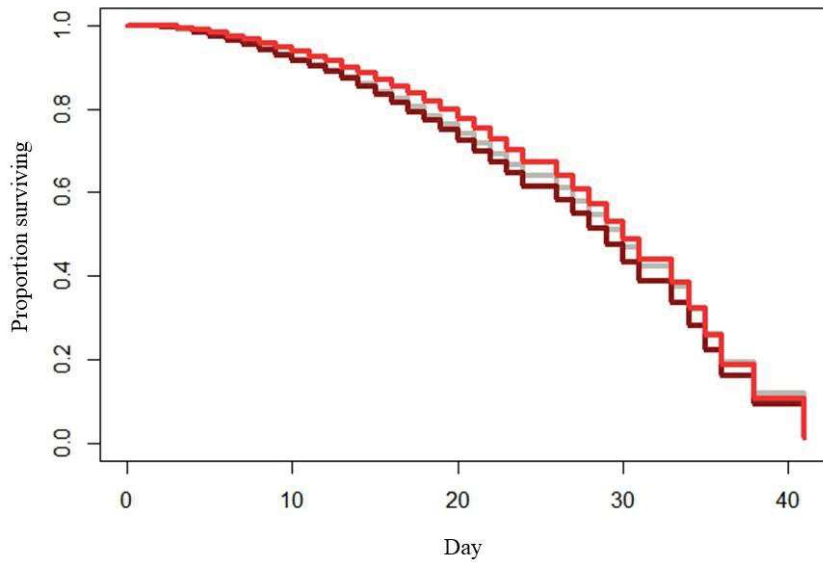
**Figure 2** – Experiment 1: standardised parasitaemia (mean  $\pm$  s.e) in artesunate-treated (A) and untreated (B) birds. Days 13-14 ("during T") correspond to the measurements taken 24h after each injection; days 18-30 ("after T") correspond to measurements taken after the treatment was finished. Untreated birds were sham injected with the artesunate solvent. Grey bars represent birds infected with the sensitive parasites and the red bars are the birds infected by AS-selected lines (dark red: R1, bright red: R2, pale red: R3). Dashed line indicates the baseline parasitaemia on the day immediately before the first injection (day 12). Bars above/below the dashed line indicate an increase/decrease in parasitaemia with respect to day 12.



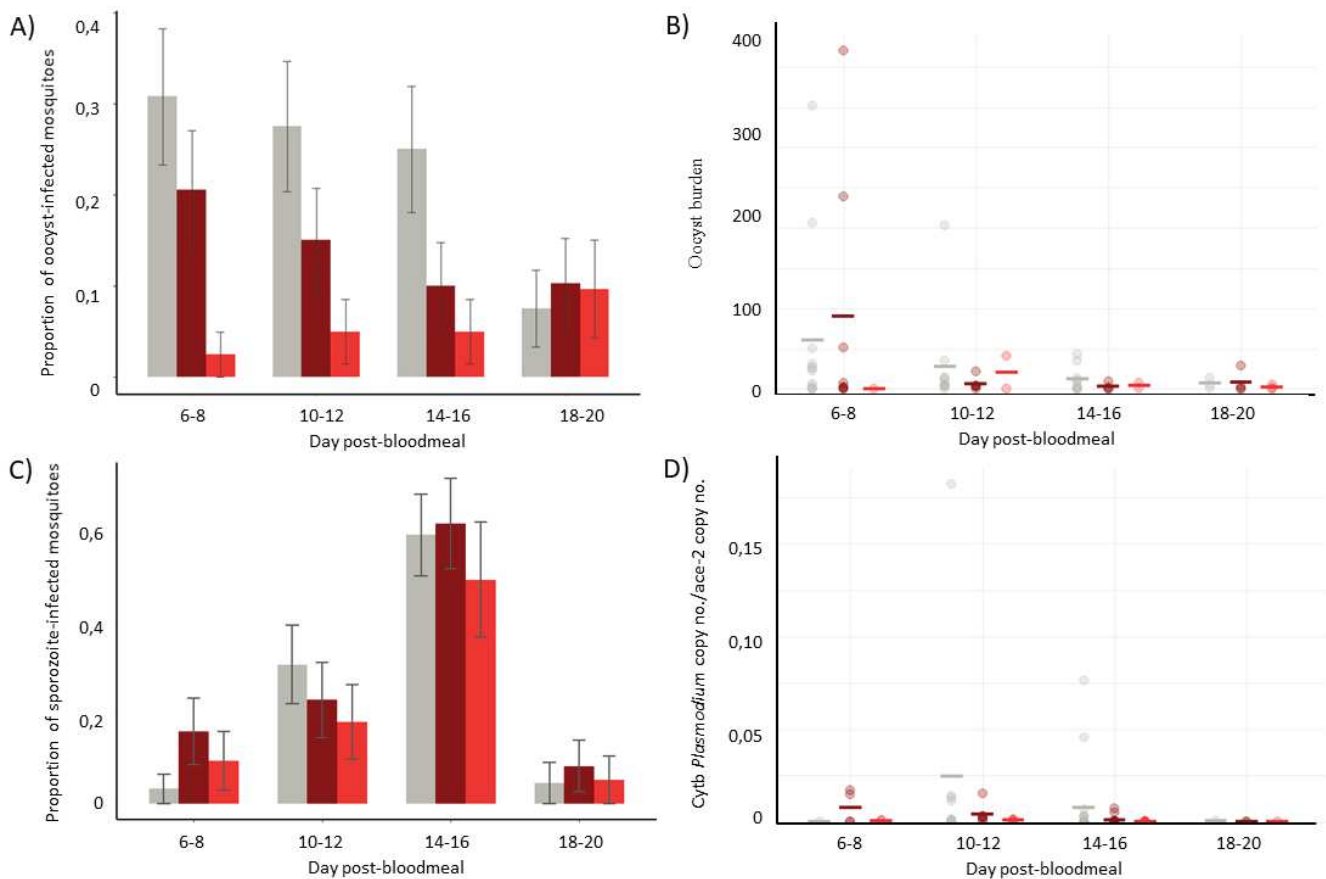
**Figure 3** – Experiment 2: oocyst burden in mosquitoes infected by one of each parasite lines (sensitive= grey, R1= dark red, R2= bright red) 8-9 days post infection (dpmi). Burden is represented as a boxplot where with the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians). Vertical lines delimit 1.5 times the inter-quartile range above which individual counts are considered outliers and marked as circles.



**Figure 4** – Experiment 2: Fecundity of *Culex pipiens* females uninfected (NI) or infected with each of the different parasite lines (sensitive= grey, R1= dark red, R2= bright red). The number of eggs per raft is represented as a boxplot where with the median (horizontal lines), first and third quartiles (box above and below the medians). Vertical lines delimit 1.5 times the inter-quartile range above which individual counts are considered outliers and marked as circles.

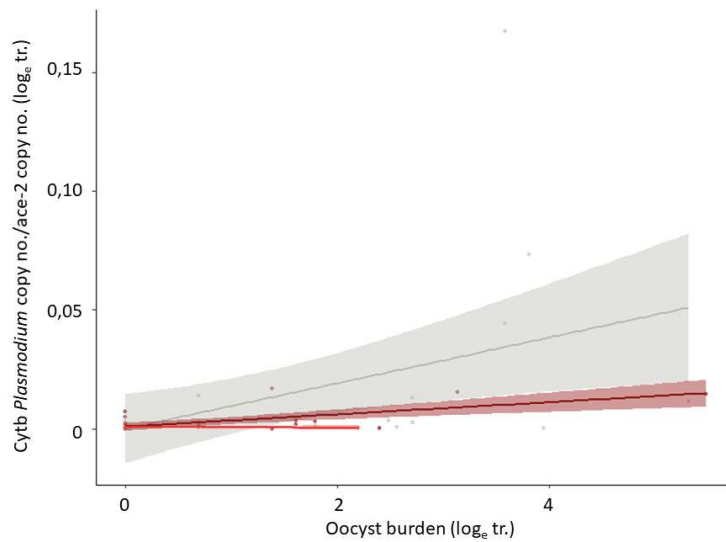


**Figure 5** – Experiment 2: Kaplan–Meier survival curves for mosquito infected with the different parasite lines (sensitive= grey, R1= dark red, R2= bright red).



**Figure 6** – Experiment 3: oocyst prevalence (A), oocyst burden (B), sporozoite prevalence (C), sporozoite burden (D) of mosquitoes infected by each of the parasite lines (sensitive= grey, R1= dark red, R2= bright red) for different sampling intervals. Prevalence is represented as the mean  $\pm$  standard error

(calculated as  $\sqrt{pq/n}$ ). In the graph for the burden, each point represents one mosquito and the bars show the mean measure for this group (line and day).



**Figure 7: Sporozoite burden as a function of oocyst burden.** Each point represents a single mosquito, shades around the lines represent are the (95%) confident interval. Grey dots, line and shade represent mosquitoes infected with the sensitive parasites and the red are the birds infected by AS-selected lines (R1= dark red, R2 = bright red).

## Supplementary Materials

Costs and benefits associated to artesunate-selected lines of *Plasmodium relictum*: a study on birds and mosquitoes (Villa et al)

**Table S1:** Proportion of blood cells infected (parasitaemia) immediately before the AS-treatment for each of the lines. Table shows the maximum (max) and minimum (min) values, the median (med) and the 25% (Q1) and 75% (Q3) quartiles.

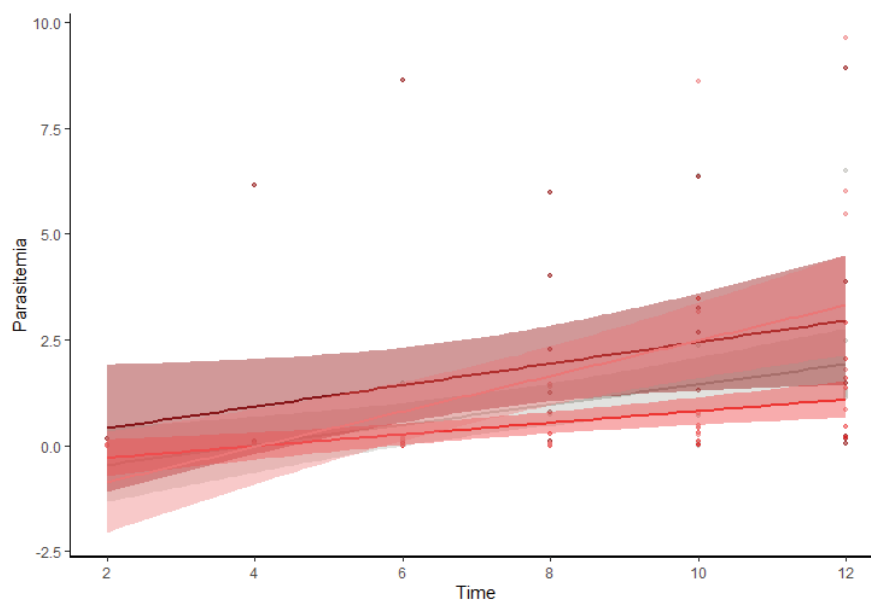
	Control	R1	R2	R3
max	6.50	8.92	2,92	9.63
Q3	3.48	5.12	2.25	6.91
med	1.27	0.83	1.48	4.18
Q1	1.17	1.13	0.39	1.54
min	1.14	0.56	1.19	0.83

**Table S2. Description of the statistical models used to analyze the costs of AS-resistance in bird and vector.** Models with binomial error structure require a concatenated response variable binding together the number of successes and failures for a given outcome. N gives the number of mosquitoes or birds included in each analysis. "Maximal model" represents the complete set of explanatory variables (and their interactions) included in the model. "Minimal model" represents the model containing only the significant variables and their interactions. Round brackets indicate that the variable was fitted as a random factor. Square brackets indicate the error structure used (n: normal errors, b: binomial errors). day: sampling day, dayf: sampling day fitted as factor, status: alive/dead on sampling day, eggs: number of eggs laid, ttmnt: treatment (AS or control), line: parasite line, para: proportion of infected red blood cells, RBC: number of red blood cell per ml.

Variable of interest	Response variable	Model Nb.	N	Maximal model	Minimal model	R subroutine [err struct.]	
<i>Experiment 1 – Bird - parasite dynamics and virulence</i>							
Parasitaemia	All birds - before	bx(para)	1	116	line*day + (1 bird)	line*day + (1 bird)	lmer [n]
	All birds - during	bx (para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> )	4	95	line*day*ttmnt+ (1 bird)	line*day*ttmnt+ (1 bird)	lmer [n]
	Treated birds – during	bx (para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> )	5	51	line*dayf + (1 bird)	line*dayf + (1 bird)	lmer [n]
	Treated birds – after	bx (para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> )	7	67	line*dayf + (1 bird)	line*dayf + (1 bird)	lmer [n]
	Control birds –during	log <sub>e</sub> (para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> )	6	44	line*dayf + (1 bird)	line+ (1 bird)	lmer [n]
	Control birds –after	bx (para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> )	8	114	line*day + day <sup>2</sup> + (1 bird)	line + day + day <sup>2</sup> + (1 bird)	lmer [n]
rbc	All birds – before	rbc	2	140	para*line+para*day + (1 bird)	day*para + (1 bird)	lmer [n]
	All birds – during/after	bx (rbc d <sub>n</sub> /rbc d <sub>12</sub> )	9	184	line*dayf*ttmnt+line*ttmnt*(para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> ) + (1 bird)	dayf*tt + (1 bird)	lmer [n]
Weight	All birds - before	weight	3	116	line*day*para+(1 bird)	1+(1 bird)	lmer [n]
	Treated birds – during + after	bx(weight/weight d <sub>12</sub> )	11		line*day*(para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> ) + (1 bird)	day+ (1 bird)	lmer [n]
	Control birds – during + after	bx(weight/weight d <sub>12</sub> )	10	232	line*day*(para d <sub>n</sub> /para d <sub>12</sub> ) + (1 bird)	line*dayf+ (1 bird)	lmer [n]
<i>Experiment 2 – Mosquito – parasitaemia and virulence</i>							
Infection	Number of mosquitos with at least 1 oocyst	cbind (inf, uninf)	12	119	line+ (1  bird)	1+ (1  bird)	glmer [b]
	Number of oocysts per infected mosquito	oocyst	13	35	line+ (1  bird)	line + (1  bird)	glmer [p]
Survival	Overall survival	(date, status)	15	734	line + (1  bird)	1 + (1  bird)	coxme
Fecundity	Number of eggs per raft	eggs	14	236	line + (1  bird)	line + (1  bird)	lmer [n]
<i>Experiment 3 – Mosquito - parasite dynamics</i>							
Oocysts	Number of mosquitos with at least 1 oocyst	cbind (inf, uninf)	16	468	line*day + (1 bird)	day + (1 bird)	glmer [b]
	Number of oocysts per infected mosquito	oocyst	17	66	line*dayf + (1 bird)	dayf + (1 bird)	glmmTMB
Sporozoites	Number of mosquitos with sporozoites	cbind (inf, uninf)	18	289	line*dayf+ (1 bird)	dayf+ (1 bird)	glmer [b]
	Sporozoite quantity produced by oocysts	log(sporozoite)	19	71	line*dayf*oocyst+ (1 bird)	line*oocyst+day*oocyst+ (1 bird)	lmer [n]

**Table S3:** Reduction in parasitaemia as a result of treatment for each of the 3 lines. Treatment is given on days 12-15, parasitaemia is calculated 24h after each treatment (days 13-16). The reduction in parasitaemia is calculated as  $(px-pb)/pb * 100$  where  $px$ = parasitaemia at a given day, and  $pb$  = baseline parasitaemia (parasitaemia immediately before the treatment, day 12). mn=mean, md=median, Q1=25% quartile, Q3= 75% quartile.

	Control	R1	R2	R3
day 13	mn: - 93.6 % md: - 93.9 % Q1: - 90.2 % Q3: - 96.6 %	mn: - 59.8 % md: - 71.6 % Q1: - 24.6 % Q3: - 85.7 %	mn: - 57.8 % md: - 78.0 % Q1: - 37.2 % Q3: - 91.8 %	mn: - 69.6 % md: - 85.9 % Q1: - 25.2 % Q3: - 97.6 %
day 14	mn: - 93.7 % md: - 97.2 % Q1: - 83.9 % Q3: - 100 %	mn: - 86.9 % md: - 86.1 % Q1: - 77.7 % Q3: - 98.3 %	mn: - 100 % md: - 100 % Q1: - 100 % Q3: - 100 %	mn: - 95.7 % md: - 96.1 % Q1: - 91.41 % Q3: - 96.6 %
day 15	mn: - 98.6 % md: - 100 % Q1: - 95.9 % Q3: - 100 %	mn: - 99.3 % md: - 91.1 % Q1: - 81.4 % Q3: - 100 %	mn: - 97.6 % md: - 100 % Q1: - 92.7 % Q3: - 100 %	mn: - 99.8 % md: - 100 % Q1: - 99.4 % Q3: - 100 %
day 16	mn: - 99.3 % md: - 100 % Q1: - 98.0 % Q3: - 100 %	mn: - 99.3 % md: - 100 % Q1: - 98.0 % Q3: - 100 %	mn: - 96.5 % md: - 95.4 % Q1: - 94.2 % Q3: - 100 %	mn: - 99.5 % md: - 99.2 % Q1: - 99 % Q3: - 100 %



**Figure S1: Parasitaemia as a function of sampling day before the treatment.** Each point represents a sample, shades around the lines represent are the (95%?) confident interval. Grey dots, line and shade represent mosquitoes infected with the sensitive parasites and the red are the birds infected by AS-selected lines (R1= dark red, R2 = bright red).



# Chapitre 4 – Etude de la fréquence des allèles de résistance chez l'homme et chez le moustique : une étude de terrain au Cameroun et Burkina Faso

M. Villa<sup>1</sup>, A. Berthomieu<sup>1,2</sup>, S. Ménard<sup>3</sup>, A. Berry<sup>3</sup>, S. Nsango<sup>4</sup>, A. Cohuet<sup>1</sup>, I. Morlais<sup>1</sup>, T. Lefèvre<sup>1,2,5</sup>, S. Yerbanga<sup>5</sup> and A. Rivero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> MIVEGEC (CNRS, Université de Montpellier, IRD), Montpellier, France

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Ecologie et Evolution de la Santé (CREES), Montpellier

<sup>3</sup> CPTP (Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan), Inserm -Université de Toulouse III - CNRS, Toulouse, France

<sup>4</sup> CPC (Centre Pasteur du Cameroun), Ministère de la santé publique du Cameroun – Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), Yaoundé, Cameroun

<sup>5</sup> IRSS (Institut de Recherche en Sciences de la Santé), Bobo Dioulasso, Burkina Faso

## Résumé

Le paludisme a encore aujourd'hui une incidence importante dans les populations humaines, notamment en Afrique sub-Saharienne, malgré le développement de médicaments antipaludiques. Ces médicaments ont dans un premier temps grandement diminué la mortalité et la morbidité associée à la maladie mais ont dans le même temps exercé une pression de sélection forte menant à l'émergence et la propagation de parasites résistants. Les mutations induisant une résistance sont souvent associées à des coûts sur la valeur sélective des parasites qui s'expriment en absence de traitement. Jusqu'à maintenant, l'étude des coûts associés à ces mutations s'est concentrée principalement dans l'hôte vertébré (humain et souris).

Dans cette étude, nous comparons la prévalence de 3 allèles de résistances majeurs sur 3 loci différents, chacun conférant la résistance par des mécanismes différents (*pfcr73-76*, *dhfr59*, *pfmdr184*) chez l'homme et chez les vecteurs collectés sur 4 sites au Burkina Faso et Cameroun. Le but est non seulement d'établir l'existence de coûts sur la transmission des parasites mais aussi d'avoir une estimation plus précise de la circulation des allèles de résistance sur les sites d'échantillonnages.

Chez l'homme, la prévalence des allèles de résistance des loci *pfmdr184* et *dhfr59* est très forte (<90%) alors que l'allèle de résistance sur le loci *pfcr73-76* est présent à très basse fréquence (9%). La prévalence d'allèle de résistance de *pfmdr184* est significativement plus faible dans le vecteur *An. funestus* s.s. que dans l'homme (-20%). En revanche, pour l'allèle de résistance *pfcr73-76* on trouve l'effet contraire : la fréquence est plus forte chez le moustique *An. gambiae* s. s. que chez l'homme. Ceci peut être indicatif d'une différence entre ces deux allèles en termes des coûts qu'ils imposent au parasite chez l'homme et chez le moustique. Nous mettons aussi en évidence l'importance du rôle de sentinelle des moustiques, qui pourraient permettre de détecter des allèles de résistance indétectable chez l'homme mais toujours présentes dans la population de moustiques.

**Mots-clefs :** résistance, *Plasmodium falciparum*, transmission, coûts, vecteur

## Introduction

Le paludisme est une maladie ancienne avec un fort impact sur les populations humaines malgré une lutte acharnée à base de médicaments antipaludiques, d'insecticides et de répulsifs. Le développement des médicaments antipaludiques s'est fait selon un cycle dépendant de l'émergence et de la propagation de parasites résistants aux thérapies existantes et des moyens financiers disponibles. Ils ont permis de réduire considérablement l'incidence et la mortalité associée au paludisme mais ont dans le même temps exercé une pression de sélection forte menant à l'émergence et à la propagation de parasites résistants. L'émergence des résistances se fait souvent dans des zones de faible transmission où les coinfections sont rares, dans des zones où il y a beaucoup de mouvements de populations et où le système de soins est peu développé au profit du marché noir des médicaments. C'est le cas de l'Asie du Sud-Est. L'émergence et la propagation de mutations associées à la résistance aux médicaments va donc dépendre de facteurs que nous contrôlons, le contexte économique, social et médical, mais aussi de facteurs que nous ne contrôlons pas, dont les plus importants sont **coûts biologiques associés à ces mutations** (Andersson and Levin 1999).

L'hypothèse des coûts biologiques liés aux mutations induisant une résistance aux antipaludiques est soutenue par des observations sur le terrain et en laboratoire (Hastings and Donnelly 2005). Sur le terrain, la diminution de la prévalence des allèles de résistance lorsqu'on arrête d'utiliser un médicament, est interprétée comme étant le résultat de coûts associés aux mutations (Thaithong et al. 1988; Liu et al. 1995; Laufer and Plowe 2004; Ord et al. 2007). En laboratoire, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez la souris ont mis en évidence des coûts associés à la résistance à des antipaludiques comme la chloroquine (Koella 1998), la luméfantine et à la pipéraquline (Gimode et al. 2015) ou la pyriméthamine (De Roode et al. 2004; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2010). Les coûts biologiques associés aux mutations liées à la résistance aux antipaludiques sont dus au fait que ces mutations ont lieu sur des gènes codants pour des chaînes métaboliques ou des transporteurs très conservés car primordiaux pour le métabolisme du parasite. En effet, les antipaludiques ciblent des chaînes métaboliques telles que celle du folate qui intervient dans la synthèse d'ADN (Hastings and Donnelly 2005). A ce jour, la plupart des études portant sur les coûts biologiques de ces mutations se sont concentrées sur l'hôte vertébré, notamment l'humain. Or, **des étapes importantes du cycle de vie du parasite se déroulent dans le moustique vecteur** (fécondation, invasion du tube digestif, multiplications asexuées au sein des oocystes, migration vers les glandes salivaires des sporozoïtes). Chez le moustique, les allèles de résistance pourraient porter des coûts sur une ou plusieurs de ces étapes ce qui pourrait impacter fortement la **capacité de transmission du parasite** et l'épidémiologie de la maladie. Cela a déjà été observé avec les parasites résistants à l'atovaquone qui sont incapables de se développer dans le vecteur et donc de se transmettre (Goodman et al. 2016). Cependant, sur le

terrain, les études de suivi d'émergence et de propagation de résistances sont intégralement réalisées chez l'homme, et nous disposons de très peu d'informations sur la circulation des parasites résistants chez le vecteur (Mharakurwa et al. 2011; Smith-Aguasca et al. 2019).

Dans ce chapitre, nous comparons la prévalence de mutations liées à la résistance à différents antipaludiques chez l'homme et chez le vecteur dans plusieurs zones de forte transmission de *Plasmodium falciparum* au Burkina Faso et au Cameroun. L'objectif est double : **(i) évaluer les coûts liés à la transmission, (ii) avoir une estimation plus précise de la circulation des parasites résistants dans la région.** Le scénario le plus simple (hypothèse nulle) est l'existence d'une relation linéaire entre la prévalence de parasites résistants chez les hommes et chez les moustiques (ligne bleue pointillée dans la Fig. 1). Dans ce scénario, si un allèle disparaît du compartiment humain, par exemple suite à l'arrêt de l'utilisation d'un médicament, il devrait aussi disparaître du compartiment moustique. Ceci est l'hypothèse implicite des études qui ont constaté la disparition des allèles de résistance chez *P. falciparum* dans des échantillons sanguins, comme ça a été le cas de l'allèle de résistance à la chloroquine *pfcr-t-73-76* au Malawi (Kublin et al. 2003). On peut cependant imaginer un scénario alternatif dans lequel la fréquence de parasites résistants est plus importante dans l'homme que dans le vecteur ou inversement. Ceci pourrait être le résultat de la dynamique de transmission (un homme peut se faire piquer par plusieurs moustiques, un moustique peut piquer différents hommes), mais pourrait être également indicatif de l'existence de coûts différentiels chez les deux hôtes. Dans le cas où la prévalence de parasites résistants serait plus importante dans l'humain que dans le vecteur (ligne rouge dans la Fig. 1), ceci pourrait être un indicateur que les coûts associés aux mutations liées à la résistance aux antipaludiques seraient plus forts dans le vecteur. Le moustique agirait donc comme un goulot d'étranglement pour les parasites, ce qui pourrait impacter à la fois l'épidémiologie, mais aussi l'évolution du parasite. Par exemple, en Zambie, une étude de 2011, a montré que la prévalence des mutations associées à la résistance aux antifolates était différente entre les hommes et *Anopheles arabiensis* ou *An. funestus* (Mharakurwa et al. 2011). Au contraire, dans le cas où il y aurait une prévalence plus forte dans le vecteur (ligne verte dans la Fig. 1), ceci pourrait être un indicateur que les coûts associés aux mutations liées à la résistance aux antipaludiques seraient plus forts dans l'homme. D'autre part, la présence des allèles de résistance chez le moustique pourrait permettre d'établir l'existence d'une circulation d'allèles de résistance dans une région donnée quand leur présence dans le sang est en dessous du seuil de détection (partie grisée sur Fig. 1). Mharakurwa & al. (2011) ont, par exemple, observé en Zambie que des parasites résistants au cycloguanil, qui étaient rares voire considérés comme disparus en Afrique depuis l'arrêt de l'utilisation de ce traitement, étaient en fait présents en forte prévalence dans la population de vecteur. Ceci peut avoir une implication dans le choix des stratégies médicamenteuses, comme

lors de la réintroduction d'un médicament qui pourrait être suivie par une augmentation plus rapide qu'attendu de la prévalence des allèles de résistance.

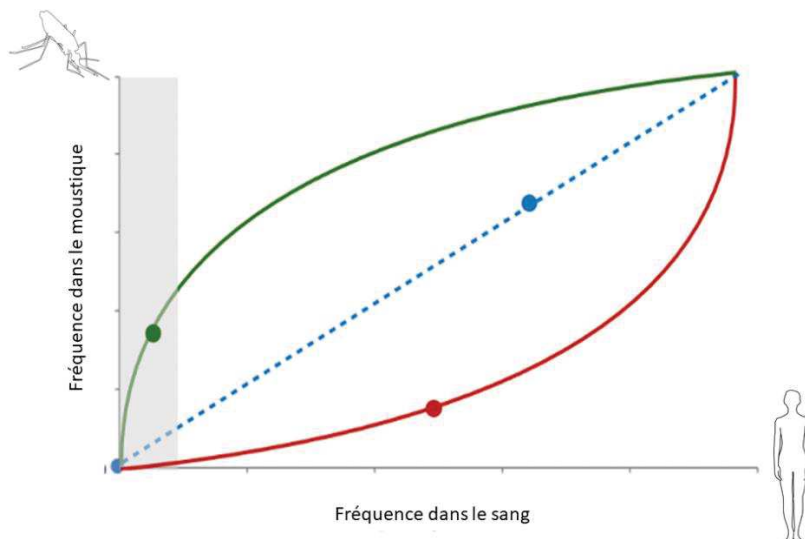
Cette étude vise à évaluer s'il y a une différence de prévalence d'allèles de résistance entre les deux compartiments hôtes dans 5 zones en Afrique de l'Ouest : 3 au Burkina Faso et 2 au Cameroun. Pour ce faire, nous avons échantillonné simultanément du sang et des moustiques dans chacun des sites. Le Burkina Faso et le Cameroun sont deux régions de forte transmission du paludisme et *P. falciparum* y est largement majoritaire (Fig. 2). Dans ces deux pays, les traitements préconisés par le gouvernement sont des ACTs (Artemisinin-derivative Combination Therapies): l'artésunate-amodiaquine (ASAQ) et l'arthéméter-luméfantrine (AL, Burkina Faso uniquement), et, en cas d'échec des traitements, la quinine ou l'artésunate (AS) en injection (OMS 2018a,b). Afin de protéger les populations les plus à risques (enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes) des traitements préventifs (« Seasonal Malaria Chemoprevention », SMC et « Intermittent Preventive Treatment », IPT) à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) sont utilisés dans ces deux pays.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à 3 loci principaux en termes de résistance aux antipaludiques et qui circulent à plus ou moins forte fréquence dans ces zones : *pfcr*, *pfdhfr* et *pfmdr1*. Des mutations ayant lieu sur le gène *pfcr* entraînent une résistance à la chloroquine ou à l'amodiaquine (Holmgren et al. 2006). La chloroquine a été un des antipaludiques les plus efficaces et les plus utilisés malgré l'apparition et la propagation rapide de parasites résistants (Coatney 1963; Achan et al. 2011; Singh and Singh 2014). La mutation la plus courante est K76T qui modifie un transporteur, empêchant l'accumulation de la molécule et donc son action dans la vacuole digestive (Cooper et al. 2002; Sanchez et al. 2004, 2005; Singh and Singh 2014). Les mutants sont capables d'évacuer la chloroquine grâce au transporteur muté tandis que le phénotype sauvage ne permet pas de faire sortir le médicament de la vacuole digestive (Martin et al. 2009). Dans cette étude, nous nous concentrerons sur les mutations principales responsables de la résistance à la chloroquine : *pfcr73-76*.

Des mutations sur *dhfr* sont responsables de la résistance à certains antifolates, dont la pyriméthamine. Les antifolates interfèrent avec des chaînes de réaction dans les stades asexués de *Plasmodium* inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'acides aminés (Aikawa and Beaudoin 1968; Vincke 1970; Delves et al. 2012). Les parasites résistants aux antifolates, dont la sulfadoxine-pyriméthamine est le plus courant, sont apparus et se sont propagés mondialement rapidement (Nurse 1981). Les mutations les plus importantes pour la résistance à la pyriméthamine sont S108N, N51I, C59R et I164L (Peterson et al. 1988; Sirawaraporn et al. 1997). Le degré de résistance induit dépend de chacune des mutations et est plus fort en cas d'accumulation des mutations démontrant ainsi une activité synergique (Sirawaraporn et al. 1997). De plus, certaines mutations semblent jouer un rôle de compensation des coûts métaboliques induits par les autres

(Brown et al. 2010). D'ailleurs, certaines de ces mutations, *dhfr51* et *dhfr59*, ne sont jamais détectées dans la nature seules mais toujours en association avec une autre mutation sur le même gène (Sirawaraporn et al. 1997; Roper et al. 2003). Dans cette étude, nous nous focaliserons sur le locus *dhfr59*, la troisième mutation apparue parmi les 4 mutations principales citées précédemment, et présente uniquement en association avec *dhfr108* et *dhfr51* (Wongsrichanalai et al. 2002).

Certaines mutations induisent une résistance à plusieurs antipaludiques comme les mutations ayant lieu sur le gène *pfmdr1*. Ce gène code pour un transporteur, une pompe à efflux, et une mutation sur *pfmdr1* peut conférer une résistance à la chloroquine, l'amodiaquine, la méfloquine et à l'artémisinine et ses dérivés (Naß and Efferth 2019). Du polymorphisme lié à la résistance aux antipaludiques a été détecté aux positions 86, 184, 1034, 1042 et 1246 (Duraisingh and Cowman 2005). Dans cette étude, nous nous focaliserons sur le locus *pfmdr184*, l'une des plus courante en Afrique et en Asie (Veiga et al. 2016). La mutation Y184F altère la cinétique du transporteur et entraîne une résistance notamment à la chloroquine et à la luméfantine (Wongsrichanalai et al. 2002; Naß and Efferth 2019).



**Figure 1 :** Schéma représentant les prédictions de fréquence des allèles de résistance dans l'homme et le vecteur suivant les coûts associés.

## Matériel et méthodes

### Collecte et diagnostic des échantillons de sang humain et de moustiques

*Plasmodium falciparum* est l'espèce majoritaire en Afrique sub-saharienne et elle est responsable de la forme la plus grave du paludisme. Ce parasite a donc été particulièrement ciblé lors du développement des antipaludiques.

Pour comparer la prévalence des mutations liées à la résistance aux antipaludiques dans l'homme et dans le vecteur, des échantillons de sang et des moustiques ont été récoltés

simultanément durant la saison des pluies, où la transmission est plus forte, dans 3 sites au Burkina Faso en juillet et août 2017 (Bapla : N10°53.238' W003°16.072' ; Longo : N11°37.140' W004°33.649' ; Klesso : N10°56.847' W003°58.967') et 2 sites au Cameroun en juin et juillet 2018 (Mfou : N03°45.805' E011°37.049' ; Kribi : N02°56.6' E9°54.36' ; Fig. 2). Afin d'obtenir environ 100 échantillons infectés de chaque type, environ 200 échantillons sanguins (prévalence estimée à 50%, Gouagna et al. 2010 ; Mendes et al. 2008) et 1000 moustiques (prévalence estimée entre 5 et 10% ; Dabiré et al. 2007) ont été récupérés par site.

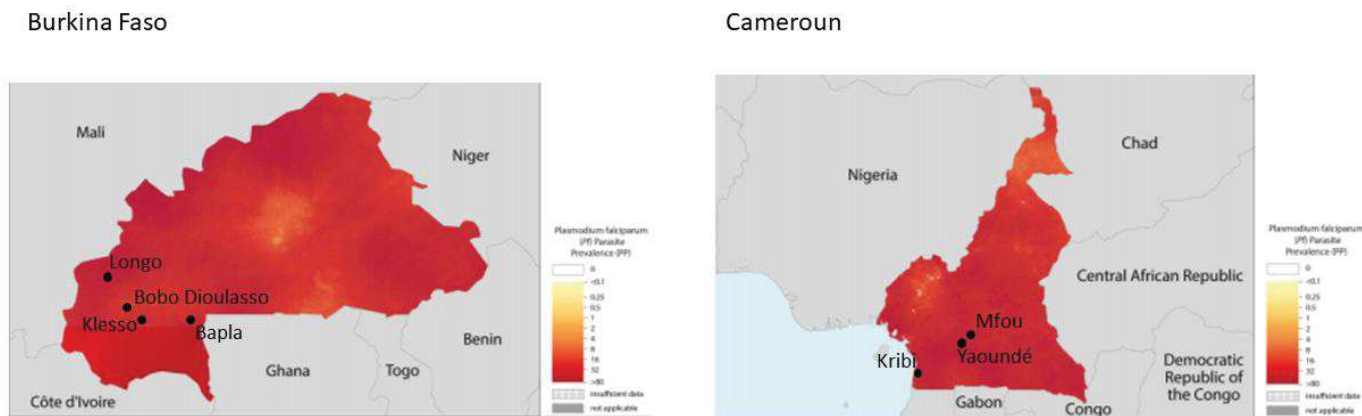
Les échantillons sanguins ont été collectés sur des enfants de 5 à 12 ans par une piqûre au bout du doigt. Au maximum, 3 enfants d'une même maison ont été inclus dans l'étude. Vingt microlitres de sang collectés ont été stockés avec 4µl d'EDTA, un anticoagulant, à -20°C, et une goutte épaisse a été réalisée pour faire un diagnostic rapide. La goutte épaisse a été séchée puis colorée au Giemsa (10%) et analysée par microscope pour détecter la présence de *Plasmodium sp.*. Les extractions d'ADN ont eu lieu soit à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) à Bobo Dioulasso (Burkina Faso), soit au Centre Pasteur du Cameroun (CPC) à Yaoundé en suivant les instructions du fournisseur (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit).

Les moustiques ont été collectés dans les villages, dans lesquels ont été prélevés les enfants, avec des aspirateurs manuels ou électriques, en ne collectant que les femelles se reposant dans les maisons. En effet, les femelles gorgées trouvent un endroit ombragé et à proximité du lieu de piqûre pour digérer le repas sanguin. Un maximum de 10 moustiques par maison a été inclus dans l'étude. Les vecteurs ont été immédiatement identifiés morphologiquement et seulement les individus des complexes *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus s.l.* ont été inclus dans l'étude. Ils ont été gardés vivants dans des conditions de laboratoire (solution de sucre à 10% *ad libitum*, 80% d'humidité et 28°C) pendant 10 jours après la capture. Cette période de 10 jours permet aux parasites potentiellement présents dans le dernier repas sanguin d'atteindre les glandes salivaires sous forme de sporozoïtes, le seul stade transmissible à l'homme (WHO 1975). Au bout de 10 jours, chaque moustique a été sacrifié et coupé en deux. La fraction tête-thorax et la fraction abdomen ont été stockées séparément à -20°C dans des tubes contenant 200µl de DNAzol® (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH, USA). L'extraction d'ADN des têtes-thorax a eu lieu à Montpellier en suivant les instructions du fournisseur (Qiagen) et l'ADN a été élué dans 30µl d'eau stérile et stocké à -20°C. Les abdomens ont été gardés congelés pour des besoins futurs. Pour des raisons inconnues, tous les moustiques collectés à Kribi (Cameroun) sont morts 24-48h après avoir été collectés, ils n'ont donc pas pu être utilisés dans nos analyses.

Le diagnostic des échantillons sanguins négatifs en goutte épaisse et la détection de sporozoïtes dans la fraction tête-thorax des vecteurs ont été réalisées par qPCR en utilisant un protocole adapté depuis celui de Marie et al. 2013.



L'identification des espèces de moustiques au sein des complexes *An. gambiae s.l.* et *An. funestus s.l.* n'est possible que par PCR. Les moustiques du complexe *An. gambiae s.l.* ont été identifiés en tant qu'*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzi* ou *An. arabiensis* en suivant un protocole modifié à partir de Favia et al. 2001 (raccourcissement du temps des phases initiales et finales à 3 et 5 minutes) et Scott et al. 1993 (amplification à 56°C au lieu de 50°C et extension pendant 10 secondes au lieu de 30). Les moustiques du complexe *An. funestus s.l.* ont tous été identifiés comme étant des *An. funestus s.s.* en suivant le protocole de Koekemoer et al. 2002.



**Figure 2 : Cartes du Burkina Faso et du Cameroun** représentant les différences de prévalence de *Plasmodium falciparum* en 2018. Plus le rouge est foncé plus la prévalence est forte. Les points noirs représentent les sites d'échantillonnage ainsi que la position des laboratoires (Bobo Dioulasso et Yaoundé). Modifiées depuis OMS, 2018b, 2018a.

### *Génotypage d'allèles de résistance avec des sondes Taqman*

La détection des mutations liées à la résistance aux antipaludiques a été faite par le laboratoire d'Antoine Berry (CPTP, Toulouse) sur environ 100 échantillons par type (humain ou vecteur) et par site, choisis aléatoirement parmi les échantillons infectés.

Le génotypage des gènes *pfprt*, *pfdhfr* et *pfmdr* a été réalisé sur l'ADN de sang total humain et des moustiques (tête et thorax) à l'aide de PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Pholwat et al. 2017). Les sondes et amorces utilisées dans ces systèmes sont décrites dans le tableau n°1. Brièvement, 1µL d'ADN a été amplifié sur un LightCycler480® (Roche), avec 0.9µM d'amorces, ainsi que 0.25µM de sonde TaqMan et 1µL de 5X HOT FIRE Pol® Probe qPCR Mix Plus (No ROX ; Solis Biodyne), en utilisant les conditions suivantes : 15 min de dénaturation initiale à 95°C suivi de 45 cycles successifs de dénaturation à 95°C pendant 15 sec et d'hybridation/élongation à 59°C pendant 1 min. Chaque expérience incluait des ADN contrôles correspondant aux allèles de *P. falciparum* sauvages et mutés pour les gènes d'intérêt, et de l'eau dépourvue de nucléase comme témoin sans matrice. Les ADN contrôles provenaient d'isolats

géotypés par le Centre National de Référence du Paludisme. L'analyse des résultats obtenus a été effectuée avec le mode Endpoint genotyping du logiciel LightCycler480®.

**Tableau 1 :** Description des amorces et des sondes utilisées pour la détection de des géotypes sauvages (VMNK, C et Y) ou mutés (VIET, R et F).

Gene	Primers/Probes	Sequences(5'-3')
<i>pfprt</i>	73-76-For	TGGTAAATGTGCTCATGTGTTT
	73-76-Rev	AGTTTCGGATGTTACAAAACCTATAGT
	73-76VMNK	YAK-5'-TGTAATGAAT <u>ACA</u> ATTTT-3'-MGB
	73-76VIET	FAM-5'-AWSTGTA <u>ATTGAAACA</u> ATTTTTG-3'-MGB
<i>pfdhfr</i>	59-For	TGAGGTTTTTAATAACTACACATTTAGAGGTCT
	59-Rev	TATCATTTACATTATCCACAGTTTCTTTGTT
	59C	FAM-5'-ACTGC <u>ACA</u> AAAATAT-3'-MGB
	59R	YAK-5'-TAACTGC <u>ACG</u> AAAAT-3'-MGB
<i>pfmdr</i>	184-For	CAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACG
	184-Rev	CATAAATTAACGGAAAAACGCAAG
	184Y	FAM-5'-TTTTAGGTTTAT <u>TAT</u> ATTTGGTCATT-3'-MGB
	184F	YAK-5'-TTTTAGGTTTAT <u>TTT</u> ATTTGGTCATT-3'-MGB

### Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (v3.4.4). Les différents modèles utilisés sont décrits dans le tableau S1. La procédure pour construire les modèles a été la suivante : le site d'échantillonnage, le type d'échantillon (sang ou moustique), l'espèce hôte (homme, *An. gambiae*, *An. funestus* ou *An. coluzzi*) ont été inclus en tant que variables explicatives ainsi que la présence/absence de mutations de résistance dans les autres loci étudiés. Pour cette dernière variable il n'est pas possible de discriminer entre des échantillons porteurs de plusieurs mutations (multi-résistances) et des coinfections avec des parasites porteurs d'allèles de résistance différents. Toutes les espèces ne se trouvant pas sur chaque site, les différences de fréquence des allèles entre espèces ont été réalisées séparément pour chaque site afin d'éviter des problèmes liés à la non-orthogonalité de l'échantillonnage. La plaque sur laquelle se trouvaient les échantillons lors du géotypage Taqman a été utilisée en tant que variable aléatoire. Les modèles maximaux incluent les interactions d'ordre le plus haut et ont ensuite été simplifiés en éliminant l'un après l'autre les termes non significatifs pour obtenir un modèle minimal (Crawley 2007). La significativité des variables explicatives a été établie en utilisant un test de ratio de probabilité (LRT) qui suit approximativement une distribution « chi-square » (Bolker 2008) et en utilisant un p-value = 0.05 comme seuil.

Les prévalences (présence/absence de mutants) ont été analysées avec des modèles linéaires généralisés avec une distribution binomiale.

Les analyses post-hoc sont réalisées avec le package ‘emmeans’ qui permet de comparer deux à deux des conditions avec un test de Tukey.

### Ethique

Tous les échantillons ont été collectés après avoir obtenu un consentement informé des participants et de leur tuteur légal. L’approbation éthique a été fournie par le comité national d’éthique du Cameroun et le comité d’examen éthique du ministère de la santé du Burkina Faso.

## Résultats

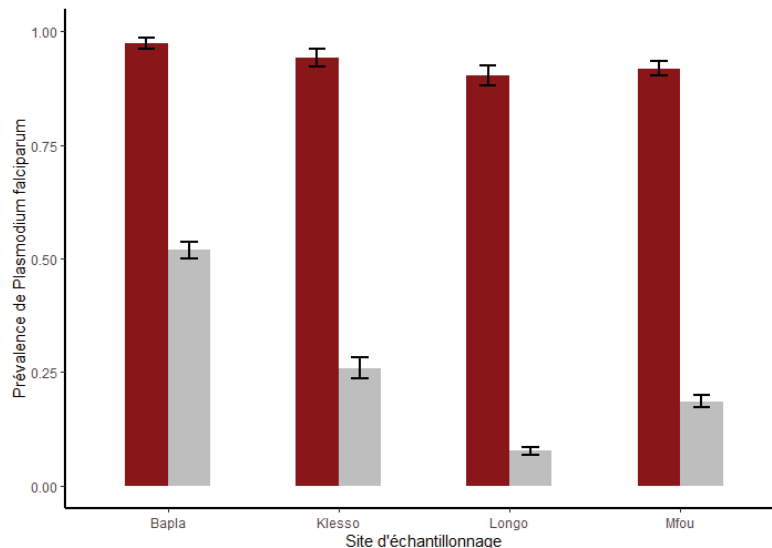
### Echantillonnage

Au total, 1151 échantillons sanguins et 4136 moustiques ont été collectés (Tab. 2).

**Tableau 2 :** Résumé de l’effort d’échantillonnage et des prévalences de *P. falciparum* pour chaque site et type d’échantillons. A Kribi, aucun échantillon n’a été diagnostiqué par qPCR.

Pays	Sites	Echantillons sanguins		Moustiques	
		Nb échantillons	P +	Nb échantillons	P+
Burkina Faso	Bapla	193	97%	775	52%
	Longo	200	88%	947	8%
	Klesso	140	94%	372	24%
Cameroun	Mfou	320	92%	961	18%
	Kribi	298	83%	1081	NA

La majorité des moustiques étaient des *An. gambiae s.s.* sauf à Mfou où il y a eu seulement 144 *An. gambiae s.s.* et une grande majorité d’*An. funestus s.s.*. A Klesso, il n’a pas été possible d’échantillonner les 1000 moustiques prévus. La prévalence d’infection à *P. falciparum* varie suivant les sites et l’hôte (model 1, *Type\*Site* :  $p = 0.0441$ , Fig. 3). Chez l’homme, la prévalence d’infection (moyenne  $\pm$  s.e.) était de  $93 \pm 2\%$  sans différence significative entre sites et chez le vecteur, elle dépend du site et de l’espèce de moustique et était en moyenne de  $26 \pm 9\%$  (Tab. 2). Bapla est le site avec la plus forte prévalence dans les vecteurs, 52%, suivi de Klesso, 26%, puis Mfou, 18,5% et enfin Longo, 8%. Longo est le site où la différence de prévalence entre humains et moustiques est la plus forte, la prévalence étant 11 fois plus forte chez l’homme que chez les vecteurs.



**Figure 3 : prévalence d'infection par *Plasmodium falciparum* dans les humains (rouge) et vecteur (gris) suivant les sites.** Les barres représentent la moyenne de prévalence et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (écart-type/ $\sqrt{\text{effectif total}}$ ).

### Prévalence de la résistance

Parmi les échantillons qui ont pu être génotypés pour les 3 allèles (309 humains, 69 *An. coluzzi*, 179 *An. gambiae*, 76 *An. funestus*), le nombre d'échantillons sans aucun allèle résistant était extrêmement bas, voire inexistant (0.3% chez l'homme, 2.9% *An. coluzzi*, 2.8% *An. gambiae*, et 0% *An. funestus*). Globalement le niveau de multirésistance était très haut : 88% des échantillons humains portait au moins 2 allèles de résistance avec une prédominance d'allèles 184F+59R (79%). Le même patron a été trouvé chez les moustiques : 75% (*An. coluzzi*) 79% (*An. gambiae*) et 76% (*An. funestus*) portaient au moins 2 allèles de résistance, avec également une grande prédominance de la combinaison 184F+59R (65%, 65% et 68% respectivement). Chez *An. funestus*, il y avait plus de moustiques portant la mutation 59R seule (24%) que chez l'homme (9%), *An. coluzzi* (16%) ou *An. gambiae* (13%). La proportion d'échantillons portant les 3 allèles de résistance était de 7.5% chez l'homme, 10.14% chez *An. coluzzi*, 11.7% chez *An. gambiae*, et 7.9% *An. funestus*.

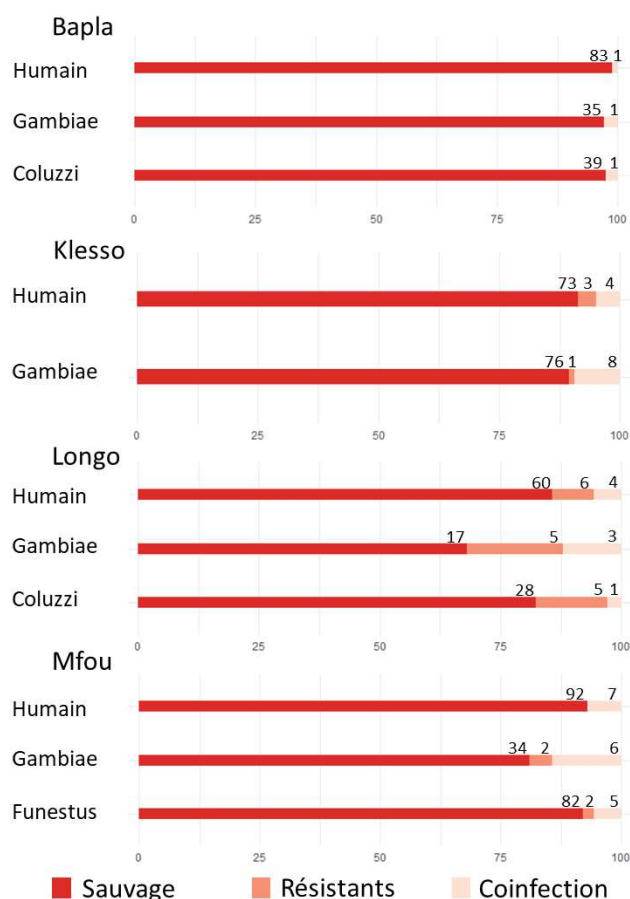
### Résistance à la chloroquine - *pfcr* 73-76

La détection d'allèles liées à la résistance à la chloroquine a eu lieu sur environ 100 échantillons infectés de chaque type par sites. L'analyse par sondes Taqman a permis de discriminer les individus infectés avec des parasites ayant l'allèle sauvage (VMNK), l'allèle de résistance à la chloroquine (VIET) et les infections mixtes avec les deux génotypes. Dans 14% des échantillons nous n'avons pas pu identifier l'allèle présent. Globalement, la prévalence des allèles

résistants était très faible, à la fois chez l'homme que chez le moustique (au total, 63 sur les 800 échantillons étudiés), ce qui réduit la puissance statistique de ces analyses.

La prévalence de l'allèle de résistance varie entre les sites d'échantillonnage (model 2, Site :  $\chi = 29.812$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 4) et est plus forte chez les moustiques que chez l'homme (model 2, Type :  $\chi = 4.583$ ,  $p = 0.0323$ , Fig. 4). Tout hôte confondu, la prévalence de parasites mutants parmi les individus infectés est la plus forte à Longo (19%), puis à Klesso (10%), Mfou (9%) et enfin Bapla (1%). La fréquence avec laquelle l'allèle sauvage et l'allèle de résistance se trouvent sur un même individu (infection mixte) varie suivant les sites (plus fréquent à Longo que à Mfou, model 3, Site :  $\chi = 14.339$ ,  $p = 0.0025$ , Fig. 4), mais est indépendant du type d'hôte (model 3, Type :  $\chi = 0.1167$ ,  $p = 0.7327$ ).

Pour mieux comprendre les différences entre les hommes et les vecteurs, nous avons comparé les prévalences entre espèces d'hôtes (humain, *An. gambiae*, *An. coluzzi*, *An. funestus*) séparément pour chacun des sites. Il n'y a pas de différence entre les espèces hôtes quel que soit le site (Bapla : model 4,  $p = 0.2513$  ; Klesso : model 5,  $\chi = 1.6467$ ,  $p = 0.1994$  ; Longo : model 6,  $\chi = 5.0021$ ,  $p = 0.082$  ; Mfou : model 7,  $\chi = 5.2077$ ,  $p = 0.074$ , Fig. 4).



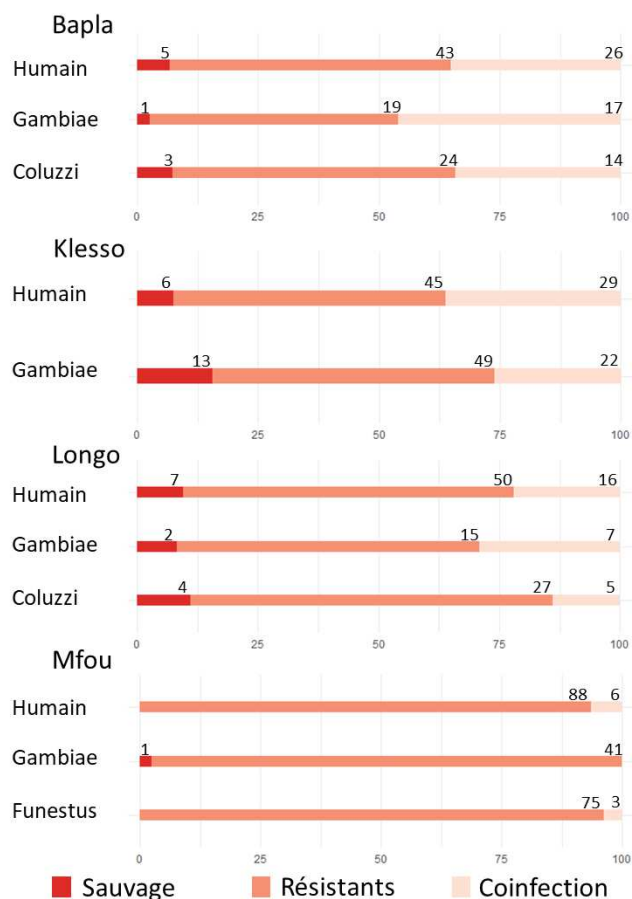
**Figure 4 : Proportion d'individus de chaque espèce hôte infectés par des parasites porteurs des différents allèles (sauvage ou résistants) sur les loci *pfcr73-76* en fonction des sites.** Les sondes Taqman ont permis d'identifier 3 groupes : les mono-infections avec des parasites sauvages ou résistants

et les coinfections quand les deux génotypes sont présents dans un seul individu. Les chiffres au-dessus des barres représentent les effectifs pour chaque génotype.

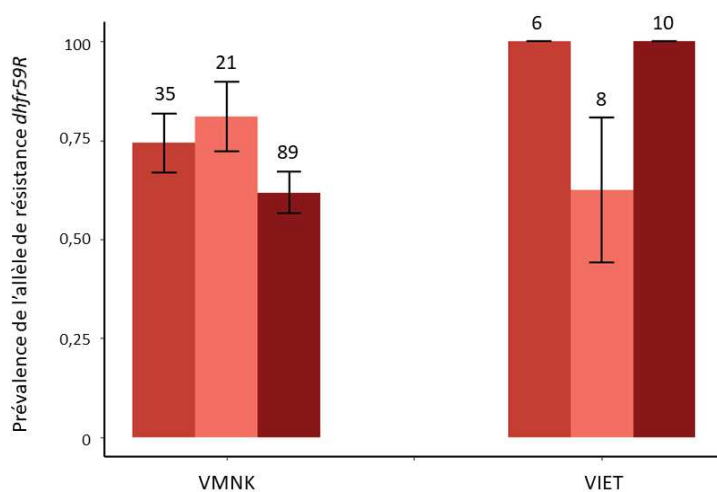
### Résistance aux antifolates – dhfr 59

L'utilisation des sondes Taqman a permis d'identifier les individus infectés par des parasites porteurs de l'allèle sauvage (59C), la mutation liée à la résistance à la pyriméthamine (59R) ou par des infections mixtes. Ici, 17% des échantillons n'ont pas pu être identifiés comme porteurs de l'un des génotypes. La fréquence de la résistance n'est pas significativement différente entre le type d'hôte (model 8,  $\chi = 0.9364$ ,  $p = 0.3332$ ) mais varie entre les sites, étant plus haute à Mfou (88%) que dans les autres sites d'échantillonnage (Bapla = 59%, Klesso = 63% et Longo = 63% ; model 8, Site :  $\chi = 25.876$ ,  $p < 0.01$  ; Fig. 5). La probabilité d'infections mixtes est plus forte à Bapla et Klesso qu'à Longo et Mfou (model 9,  $\chi = 52.537$ ,  $p < 0.01$  ; Fig. 5) quel que soit l'hôte (model 9,  $\chi = 0.0405$ ,  $p = 0.8404$ ).

Toutes les espèces vectrices n'étant pas présentes sur tous les sites, pour identifier les différences de prévalence de résistance entre les espèces hôtes, nous avons fait les analyses site par site. Dans un premier temps, l'analyse a été faite en comptabilisant uniquement la présence/absence de l'allèle de résistance d'intérêt (59R). Il n'y a pas de différence significative entre les espèces hôtes dans aucun des sites : Bapla (model 10,  $\chi = 1.6974$ ,  $p = 0.428$ ), Klesso (model 11,  $\chi = 0.8819$ ,  $p = 0.3477$ ), Longo (model 12,  $\chi = 1.5711$ ,  $p = 0.4559$ ), Mfou (model 13,  $\chi = 4.2924$ ,  $p = 0.1169$ ). Dans un deuxième temps, nous avons ajouté au modèle statistique la présence ou absence des allèles de résistance dans les autres loci (*pfmdr184* : F et *pfcr 73-76* : VIET). De manière intéressante, à Longo les différences de fréquence entre moustiques (*An. coluzzi*, *An. gambiae*) et homme, apparaissent uniquement dans les individus porteurs de l'allèle sensible 73-76 VMNK (model 14,  $p < 0.0001$ , Fig.6).



**Figure 5 : Proportion d'individus de chaque espèce hôte infectés par des parasites porteurs des différents allèles (sauvage ou résistants) sur le locus *dhfr59* en fonction des sites.** Les sondes Taqman ont permis d'identifier 3 groupes : les mono-infections avec des parasites sauvages ou résistants et les coinfections quand les deux génotypes sont présents dans un seul individu. Les chiffres au-dessus des barres représentent les effectifs pour chaque génotype.



**Figure 6 : Prévalence des allèles de résistance sur le gène *dhfr59* à Longo (Burkina Faso) en fonction de la présence (VIET) ou de l'absence (VMNK) de l'allèle de résistance sur pfcrt73-76 chez**



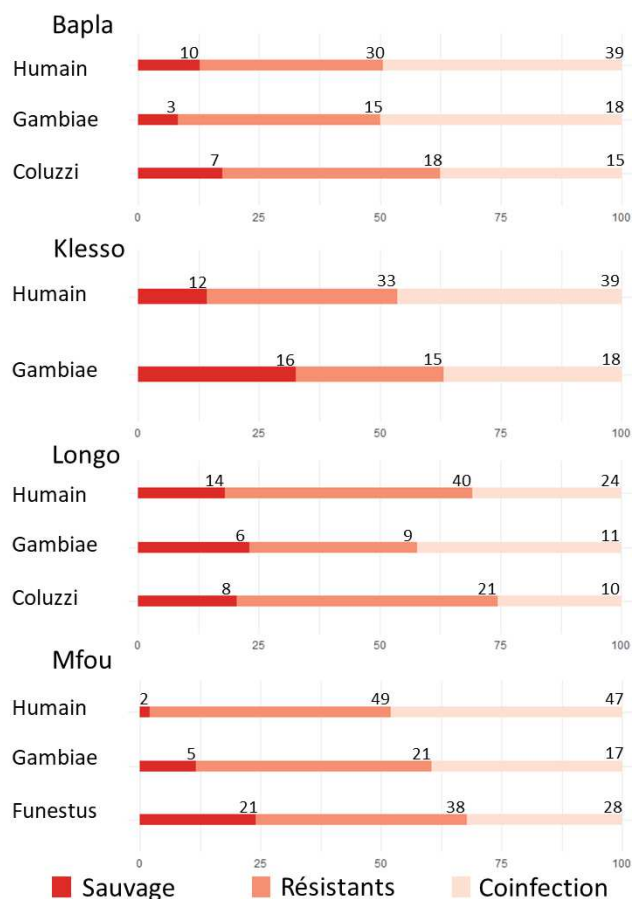
**l'homme et chez les vecteurs, *An. coluzzi* et *An. gambiae s.s.*(rouge du plus foncé au plus clair).** Les barres représentent la prévalence moyenne et les traits l'erreur standard (écart-type/racine du nombre d'échantillon). Les nombres représentent les effectifs de chaque catégorie.

### *Multi-résistance – pfmdr 184*

L'utilisation des sondes Taqman a permis d'identifier les individus infectés par des parasites porteurs de l'allèle sauvage (184Y), l'allèle de résistance (184F) ou par des infections mixtes. Ici, 12% des échantillons n'ont pas pu être identifiés comme porteur de l'un ou l'autre des allèles. Comme pour les autres allèles, dans un premier temps, l'analyse a été faite en comptabilisant uniquement la présence/absence de l'allèle de résistance (184R). La prévalence de l'allèle de résistance ne varie pas entre les sites d'échantillonnages (model 18, *Site* :  $p = 0.4959$ ), mais est plus élevée dans l'homme que dans le vecteur (model 18, *Type* :  $p = 0.0374$ , Fig. 7). Elle est d'environ 89% chez l'homme et 81% chez le moustique. La fréquence d'infections mixtes ne dépend ni du type d'hôte ni du site (model 19, *Type* :  $\chi = 2.0411$ ,  $p = 0.1531$  ; *Site* :  $\chi = 5.3852$ ,  $p = 0.1457$ ).

Dans la première analyse site par site, il n'y a pas de différence entre les espèces hôtes à Bapla (model 20,  $\chi = 1.7129$ ,  $p = 0.4247$ ), à Klesso (model 21,  $\chi = 3.1403$ ,  $p = 0.0764$ ) ni à Longo (model 22,  $\chi = 1.5200$ ,  $p = 0.4677$ ). Cependant, à Mfou, les *An. funestus s.s.* sont significativement moins souvent infectés par l'allèle de résistance 184F que les autres espèces du même site (model 23,  $\chi = 16.34$ ,  $p = 0.0002$ ).

Dans la deuxième analyse site par site, lorsqu'on ajoute la présence ou absence des autres allèles de résistance, il y a une interaction significative entre l'espèce et la présence de la mutation 73-76 VIET à Longo (model 24, *Espèce\*p7376* :  $p = 0.0004$ ) et Mfou (model 25, *Espèce\*p7376* :  $p = 0.0094$ ). Dans ces deux localités, la prévalence de l'allèle résistant 184F est significativement plus élevée chez l'homme que chez le moustique, mais uniquement dans les individus porteurs de l'allèle sensible 73-76 VMNK. Ces résultats doivent être interprétés avec précaution car le nombre d'échantillons porteurs de la mutation 73-76 VIET était très faible.



**Figure 7 : Proportion d'individus de chaque espèce hôte infectés par des parasites porteurs des différents allèles (sauvage ou résistants) sur les loci *pfmdr184* en fonction des sites.** Les sondes Taqman ont permis d'identifier 3 groupes : les mono-infections avec des parasites sauvages ou résistants et les coinfections quand les deux génotypes sont présents dans un seul individu. Les chiffres au-dessus des barres représentent les effectifs pour chaque génotype.

## Discussion

*Plasmodium* a développé une résistance à tous les médicaments antipaludéens qui ont été mis sur le marché, c'est pourquoi il est crucial d'identifier les paramètres favorisant l'émergence et la propagation des parasites résistants. Les cibles des antipaludiques sont des composants primordiaux pour le métabolisme du parasite et on s'attend à ce que des mutations ayant lieu sur les gènes codants pour ces transporteurs ou chaînes métaboliques soient couteuses en absence de traitement. Il y a deux points cruciaux pour comprendre l'évolution des résistances aux antipaludiques : 1) l'identification des coûts associés à la résistance et 2) la méthode de détection, quantification et suivi des parasites résistants.

La prévalence d'infection à *P. falciparum* était très élevée, quel que soit le site et quel que soit l'hôte. Chez l'homme en saison de forte transmission des prévalences dépassant les 70% ont déjà

été répertoriées (Diallo et al. 2017; Gonçalves et al. 2017). Par contre, dans les vecteurs, on s'attendait à des prévalences bien plus faibles que ce que nous avons trouvé (entre 8 et 52%). Dans les études précédentes, la prévalence d'infection à *P. falciparum* dans le moustique est rarement au-dessus de 10% (Dabiré et al. 2007). Ceci peut être le résultat de notre protocole. Nous avons gardé les moustiques 10 jours en laboratoire après leur capture dans des conditions idéales pour le développement des parasites ( $\approx 80\%$  d'humidité et  $\approx 28^\circ\text{C}$ ), ceci pour maximiser les chances d'obtenir des moustiques avec des sporozoïtes. Etant donné la forte prévalence chez l'homme et que les moustiques étaient gorgés lors de la capture, cela a probablement grandement augmenté la prévalence d'infection des vecteurs. Une étude récente réalisée sur les mêmes sites en 2014-2015 et qui a utilisé le même protocole (moustiques gardés entre 3 et 7 jours en laboratoire après la capture) a obtenu des prévalences en oocystes fortes, allant jusqu'à 28% (Bompard et al. 2020). Ensuite, l'espèce de vecteurs majoritaire varie suivant les sites puisque sur tous les sites du Burkina Faso, nous avons trouvé des *An. gambiae s.l.* en majorité alors qu'à Mfou, au Cameroun, les vecteurs étaient surtout des *An. funestus s.l.*

Dans notre échantillonnage, une très grande majorité des échantillons était porteuse d'au moins un allèle de résistance (>95%) avec une grande prédominance de multi-résistances au niveau de l'échantillon qui étaient cependant supérieures chez l'homme (humains : 88%, moustiques : 75%). Ces multirésistance peuvent être dues à des parasites porteurs des deux mutations ou simplement à la présence de plusieurs génotypes de parasites différents, chacun portant un allèle de résistance. Dans notre étude, nous ne pouvons pas faire la différence entre ces deux cas de figure. Ces résultats soulignent l'urgence de la situation quant à trouver des stratégies efficaces pour diminuer la propagation des allèles de résistance.

Des mutations sur le gène *pfmdr1* confèrent une résistance à la chloroquine, l'amodiaquine, la méfloquine et certains dérivés d'artémisinine dont l'arthéméther (Naß and Efferth 2019). La prévalence en mutant sur *pfmdr1* au Burkina Faso a fortement augmenté durant les 15 dernières années. En 2006, la majorité de la population parasitaire dans l'homme portait l'allèle sauvage alors que dans notre étude l'allèle résistant est largement majoritaire (Naß and Efferth 2019). La propagation de l'allèle de résistance dans le pays a probablement été favorisée par l'utilisation d'artésunate associé à de l'amodiaquine (ASAQ) ou de l'arthéméther associé à la luméfantine (AL, OMS 2018a). Au Cameroun, l'allèle de résistance sur le gène *pfmdr184* était déjà majoritaire en 2002 par rapport à l'allèle sauvage (Basco and Ringwald 2002). La prévalence de cette mutation a pu rester élevée dans la population au Cameroun à cause de l'utilisation depuis 2004 de l'ASAQ en première ligne (OMS 2018b). A notre connaissance, ceci est la première étude à avoir quantifié la prévalence de cet allèle de façon concomitante chez l'homme et chez le moustique. A Mfou, au Cameroun, la prévalence de l'allèle de résistance était significativement plus faible chez *An. funestus s.s.* (76%), que dans l'homme (98%) ou dans les *An. gambiae s.s.* (88%), ce qui peut

résulter d'un coût lié à la mutation et portant sur la transmission. Cette observation pourrait être confirmée par des infections expérimentales en laboratoire pour comparer l'infection des espèces vectrices. Il est intéressant de voir que cela dépend de l'espèce vectrice en sachant que dans les zones où on trouve *An. funestus* et *An. gambiae* la transmission est plus forte (Kelly-Hope and McKenzie 2009). L'augmentation de la transmission peut mener à une augmentation de la prévalence d'infections mixtes (allèle sauvage-allèle de résistance) et donc de la compétition dans les hôtes non traités. Nous n'avons pas montré une prévalence plus importante d'infection mixte à Mfou par rapport aux autres sites ni de différence de prévalence d'allèle de résistance entre les humains et les *An. gambiae* de ce site avec les autres. Ceci pourrait être approfondi en augmentant le nombre de sites d'échantillonnage.

Notre étude montre que la proportion de parasites avec des mutations liés à la résistance sur les loci *pfcr73-76* a fortement diminué depuis une étude menée au Cameroun publiée en 2012 (83% entre 2002 et 2009 contre 9% dans notre étude ; Menard et al., 2012). L'arrêt de l'utilisation de la chloroquine comme traitement de première ligne contre le paludisme entraîne une forte diminution de la prévalence en mutations sur le gène *pfcr* (Laufer and Plowe 2004; Ocan et al. 2019). La prévalence en mutations sur ces loci varie entre sites avec une plus forte prévalence à Longo (19%) et presque aucun mutant à Bapla (1%). A l'inverse de ce que nous avons observé avec *pfmdr184*, la prévalence de l'allèle de résistance était plus forte chez les moustiques que chez l'homme. La prévalence de l'allèle de résistance chez *An. gambiae* (14%), était le double de celle chez l'homme (7.5%).

Pour la résistance à la pyriméthamine, les mutations principales associées à la résistance à la pyriméthamine sont sur les loci *dhfr108* et *dhfr51*. Or, il n'a pas été possible de développer des sondes pour *dhfr108* et *dhfr51*. *dhfr59* est forcément associée avec une des deux premières, est au moins en partie compensatoire des coûts induits par les autres mutations (Sirawaraporn et al. 1997; Wongsrichanalai et al. 2002; Roper et al. 2003; Tinto et al. 2007), et seule, elle ne confère pas de résistance au traitement (Sirawaraporn et al. 1997). Toutefois, la prévalence de l'allèle de résistance sur ce locus semble proche de celle de l'allèle de résistance sur *dhf108* (Bazie et al. 2020). La prévalence de l'allèle de résistance a diminué marginalement au Cameroun puisqu'elle était d'environ 98% à Yaoundé en 2010-2011 (Worldwide Antimalarial Resistance Network 2020) et dans notre étude on trouve 88% à Mfou qui est très proche de Yaoundé. Au Burkina Faso, la prévalence de cet allèle n'a pas beaucoup changé depuis 2010 puisqu'elle était de 54% à Bobo Dioulasso entre 2009 et 2010 (Worldwide Antimalarial Resistance Network 2020), tandis que dans notre étude en 2017 elle varie entre 59 et 63%. La sulfadoxine-pyriméthamine est un traitement encore largement utilisé pour traiter les femmes enceintes et les jeunes enfants (WHO 2019). Contrairement à nos résultats où nous ne mettons pas en évidence de différence de prévalence de résistance entre les humains et les vecteurs, une étude en Zambie (2006-2007) a

montré que les parasites résistants à la pyriméthamine, dont ceux porteurs de l'allèle de résistance sur *dhfr59*, se transmettaient moins bien au vecteur (Mharakurwa et al. 2011). Dans notre étude, seulement une différence marginale apparaît entre l'homme et les vecteurs (homme>moustique) dans les individus où il n'y a pas l'allèle de résistance sur *pfcr73-76*. Les liens avec *pfcr73-76* sont à encore à explorer à cause du trop faible nombre d'individus infectés par des parasites mutants dans notre étude. La divergence entre notre étude et celle de Mharakurwa & al (2011) pourrait être due à des différences dans le fond génétique entre les parasites de différents sites.

La différence de prévalence des allèles de résistance entre sites observée pour *dhfr59* et *pfcr73-76* peut être dû aux variations dans les pratiques médicales. En effet, l'OMS recommande des traitements de premières lignes, actuellement les ACTs, mais sur le terrain les populations ne suivent pas toujours ces recommandations. La persistance de *pfcr73-76* malgré la faible utilisation de ce médicament dans les deux pays peut être révélatrice d'une utilisation informelle de ce médicament par certaines sections de la population. La chloroquine reste relativement peu chère par rapport aux ACTs et elle est encore utilisée dans certaines parties d'Afrique (Sayang et al. 2009). Une autre hypothèse quant à la différence entre sites porte sur le choix de l'ACT utilisé localement et donc dans la différence de molécules partenaires du dérivé d'artémisinine. Des mutations sur *pfcr73-76*, dont K76T, sont associées avec la résistance à l'amodiaquine et à la luméfántrine (Holmgren et al. 2006; Haldar et al. 2018), donc le maintien de ces mutants dans la population peut dépendre de l'ACT utilisé.

Les différences entre sites peuvent aussi être dues à des différences environnementales. En effet, les effets pléiotropiques des mutations induisant une résistance à des médicaments varient suivant les conditions environnementales (Paulander et al. 2009; Andersson and Hughes 2010). Le Burkina Faso et le Cameroun sont des pays avec un climat majoritairement tropical avec deux saisons, une saison des pluies et une saison sèche. Au Burkina Faso les 3 sites ont des profils différents : Bapla est un village plutôt rural avec beaucoup de rizières, Klesso est urbain avec un environnement type savane arborée et Longo est plus aride. Au Cameroun, le site de Mfou est constitué de plusieurs villages répartis dans une forêt tropicale. Les différences climatiques entre les sites peuvent influencer les gîtes larvaires, les plantes sur lesquelles les vecteurs se sont nourris ou encore la température, or ce sont des facteurs qui influencent le développement et la transmission de *Plasmodium* (Lefèvre et al. 2013, 2018). Les allèles de résistances pourraient être liés à un coût plus fortement exprimé dans des conditions particulières de température ou de ressources disponibles.

Les résultats que nous avons trouvés ici suggèrent que les moustiques pourraient jouer un rôle de sentinelle de la résistance. En effet, on trouve plus d'individus infectés par des parasites mutants sur *pfcr73-76* parmi les *An. gambiae s.s.* que chez l'homme. Dans un homme non traité,

ils peuvent être encore présents mais en quantité tellement faible par rapport au génotype sauvage qu'ils en deviennent indétectables. L'échantillonnage sur les vecteurs, notamment en se concentrant sur tête-thorax où on trouve les sporozoïtes qui sont transmis à l'homme, aurait une puissance plus forte pour détecter la circulation du parasite dans un site donné.

Pour finir, il y a plusieurs perspectives pour compléter ce chapitre. Nous avons prévu de génotyper les échantillons sur deux nouveaux loci : *dhps437* qui est lié à la résistance à la sulfadoxine (Wang et al. 1997) et *k13-561* qui est lié à la résistance aux dérivés d'artémisinine en Afrique (Uwimana et al. 2020). Des mutations au locus *dhps437* sont trouvées dans 70% des humains infectés à Yaoundé (communication d'Antoine Berry). Quant à *k13-561*, c'est le locus sur lequel a été trouvée une mutation responsable de la résistance à des dérivés d'artémisinine au Rwanda (Uwimana et al. 2020). Des parasites résistants aux dérivés d'artémisinine n'avaient pas été répertoriés en Afrique avant cette découverte, c'est pourquoi il est intéressant de savoir si elle circule chez l'homme et le moustique, au Burkina Faso et au Cameroun et dans quelles proportions. Une autre suite à donner à cette étude pourrait être de reconduire l'échantillonnage en saison à faible transmission pour voir si dans ces conditions les proportions de chaque allèle changent. Si les parasites résistants sont moins compétitifs il est possible que leur proportion chute beaucoup dans la population quand la fréquence de transmission diminue et donc qu'ils soient éliminés par la compétition avec les sensibles (Ord et al. 2007).

Nous avons aussi mis en évidence une différence entre les espèces vectrices. Il y avait une proportion plus faible de parasites mutants sur *pfmdr184* dans les *An. funestus s.s.* que dans les *An. gambiae s.s.* à Mfou. Etant donné que nous n'avons des *An. funestus s.s.* que sur ce site, il est impossible de savoir si ce résultat est généralisable. Un nouvel échantillonnage se concentrant sur les vecteurs et des expériences d'infections expérimentales en laboratoire permettrait d'apporter des connaissances à ce sujet.

Enfin ce projet va être complété par le développement de modèles mathématiques par Sylvain Gandon pour tenter de prédire la propagation et les risques d'émergence de résistance en tenant compte des connaissances acquises grâce à cette étude de terrain. Ces modèles prendront notamment en compte les coûts biologiques de la résistance dans le vertébré et dans le vecteur et la présence de plusieurs allèles de résistance dans un parasite, deux points ayant été largement négligés lors de la construction de précédents modèles sur l'évolution et la propagation de la résistance aux antipaludiques (Dye and Williams 1997; Mackinnon and Hastings 1998; Koella and Antia 2003; Klein et al. 2012; Hansen and Day 2014; Kim et al. 2014).

## Remerciements

L'important travail de terrain a été fait en collaboration avec une équipe de l'IRSS à Bobo Dioulasso au Burkina Faso et une équipe du CPC à Yaoundé au Cameroun. Nous tenons donc à remercier tous ceux qui ont participé à l'échantillonnage et la population qui a accepté de participer à cette étude.

Ces expériences ont été financées grâce à l'ANR-16-CE35-0001-01 ('EVODRUG') accordé à AR.



## Annexe

**Tableau S1 : Description des modèles statistiques utilisés pour analyser les différences d'infection sur les échantillons de terrain.** Les modèles avec une structure d'erreur suivant une loi binomiale nécessitent une variable réponse de la forme succès/échec. N est le nombre d'échantillons inclus dans les analyses. Le modèle maximal représente le modèle qui inclue toutes les variables explicatives et leurs interactions. Le modèle minimal ne contient que les variables explicatives significatives et leurs interactions. Les parenthèses signalent les variables incluent en tant que variables aléatoires. Les crochets indiquent la structure d'erreur des modèles (b : binomiale, quasi-b : quasi-binomiale). Site : site d'échantillonnage, Type : type d'hôte, homme ou vecteur, Plaque : plaque sur laquelle a été fait le génotypage, Espèce : espèce de l'hôte (homme, *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzi* et *An. funestus s.s.*), p : présence/absence de l'allèle muté (p7376 = *pfhcr73-76*, p59 = *dhfr59* et p184 = *pfmdr184*).

Variable d'intérêt	Variable réponse	N° modèle	N	Modèle maximal	Modèle minimal	R subroutine [err struct.]	
Prévalence d'infection	Probabilité d'infection	cbind (infecté, sain)	1	3719	Site*Type	Site*Type	lm [b]
<b><i>pfcr73-76</i></b>							
Prévalence de VIET	Prévalence de l'allèle de résistance VIET	cbind (présent, absent)	2	682	Site*Type+(1  Plaque)	Site+Type+(1  Plaque)	lmer [b]
Infection mixte	Mutants en infection simple vs mixte	cbind (infection simple, infection mixte)	3	63	Site*Type+(1  Plaque)	Site+(1  Plaque)	lmer [b]
Bapla	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	4	196	Espèce	1	lm [b]
Kless0	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	5	188	Espèce	1	lm [b]
Longo	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	6	169	Espèce	1	lm [b]
Mfou	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	7	235	Espèce	1	lm [b]
<b><i>dhfr59</i></b>							
Prévalence de 59R	Prévalence de l'allèle de résistance 59R	cbind (présent, absent)	8	635	Site*Type+(1  Plaque)	Site+(1  Plaque)	lmer [b]
Infection mixte	Mutants en infection simple vs coinfection	cbind (infection simple, coinfection)	9	616	Site*Type+(1  Plaque)	Site+(1  Plaque)	lmer [b]
Bapla	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	10	197	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	15	196	Espèce*p184+Espèce*p7376	1	lm [b]
Kle so	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	11	189	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]

Longo	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	16	188	Espèce*p184+Espèce*p7376	1	lm [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	12	169	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	14	169	Espèce*p184+Espèce*p7376	Espèce*p7376	lm [b]
Mfou	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	13	235	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	17	235	Espèce*p184+Espèce*p7376	1	lm [b]
<b><i>pfmdr184</i></b>							
Prévalence de 184F	Prévalence de l'allèle de résistance 184F	cbind (présent, absent)	18	695	Site*Type+(1  Plaque)	Type+(1  Plaque)	lmer [b]
Infection mixte	Mutants en infection simple vs coinfection	cbind (infection simple, coinfection)	19	574	Site*Type+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
Bapla	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	20	197	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	26	196	Espèce*p59+Espèce*p7376	1	lm [b]
Klesso	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	21	189	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	27	186	Espèce*p59+Espèce*p7376	p7376	lm [b]
Longo	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	22	170	Espèce+(1  Plaque)	1+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	24	169	Espèce*p59+Espèce*p7376	Espèce*p7376	lm [b]
Mfou	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	23	233	Espèce+(1  Plaque)	Espèce+(1  Plaque)	lmer [b]
	Présence de parasites résistants	cbind (présent, absent)	25	233	Espèce*p59+Espèce*p7376	Espèce*p7376	lm [b]

## Références

- Achan, J., A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal, and U. D'Alessandro. 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *BioMed Central*.
- Aikawa, M., and R. L. Beaudoin. 1968. Studies on nuclear division of a malarial parasite under pyrimethamine treatment. *J. Cell Biol.* 39:749–754. The Rockefeller University Press.
- Andersson, D. I., and D. Hughes. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8:260–271.
- Andersson, D. I., and B. R. Levin. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:489–493.
- Basco, L. K., and P. Ringwald. 2002. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. X. Evaluation of *pfmdr1* mutations as genetic markers for resistance to amino alcohols and artemisinin derivatives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:667–671.
- Bazie, V. B., A. K. Ouattara, T. Sagna, T. R. Compaore, S. T. Soubeiga, P. A. Sorgho, A. T. Yonli, and J. Simpure. 2020. Resistance of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine (Dhfr and Dhps) and artemisinin and its derivatives (K13): a major challenge for malaria elimination in West Africa. *J. Biosci. Med.* 08:82–95. Scientific Research Publishing, Inc.
- Bolker, B. M. 2008. Ecological models and data in R.
- Bompard, A., D. F. Da, S. R. Yerbanga, I. Morlais, P. H. Awono-Ambéné, R. K. Dabiré, J. B. Ouédraogo, T. Lefèvre, T. S. Churcher, and A. Cohuet. 2020. High *Plasmodium* infection intensity in naturally infected malaria vectors in Africa. *Int. J. Parasitol.* 50:985–996. Elsevier Ltd.
- Brown, K. M., M. S. Costanzo, W. Xu, S. Roy, E. R. Lozovsky, and D. L. Hartl. 2010. Compensatory mutations restore fitness during the evolution of dihydrofolate reductase. *Mol. Biol. Evol.* 27:2682–2690.
- Coatney, G. R. 1963. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12:121–128.
- Cooper, R. A., M. T. Ferdig, X. Z. Su, L. M. B. Ursos, J. Mu, T. Nomura, H. Fujioka, D. A. Fidock, P. D. Roepe, and T. E. Wellems. 2002. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 61:35–42.
- Crawley, M. J. 2007. The R book. Imperial C. UK.
- Dabiré, K. R., T. Baldet, A. Diabaté, I. Dia, C. Costantini, A. Cohuet, T. R. Guiguemdé, and D. Fontenille. 2007. *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: Bionomics, insecticide resistance status, and role in Malaria transmission. *J. Med. Entomol.* 44:990–997.

- De Roode, J. C., R. Culleton, A. S. Bell, and A. F. Read. 2004. Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar. J.* 3:33.
- Delves, M., D. Plouffe, C. Scheurer, S. Meister, S. Wittlin, E. A. Winzeler, R. E. Sinden, and D. Leroy. 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* 9. Public Library of Science.
- Diallo, A., A. Sié, S. Sirima, K. Sylla, M. Ndiaye, M. Bountogo, E. Ouedraogo, R. Tine, A. Ndiaye, B. Coulibaly, A. Ouedraogo, B. Faye, E. H. Ba, G. Compaore, A. Tiono, C. Sokhna, M. Yé, A. Diarra, E. R. Bahmanyar, M. De Boer, J. Y. Pirçon, and E. A. Usuf. 2017. An epidemiological study to assess *Plasmodium falciparum* parasite prevalence and malaria control measures in Burkina Faso and Senegal. *Malar. J.* 16:1–12. BioMed Central.
- Duraisingh, M. T., and A. F. Cowman. 2005. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 94:181–190.
- Dye, C., and B. G. Williams. 1997. Multigenic drug resistance among inbred malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.* 264:61–67.
- Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidén-Kiamos, and C. Louis. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Mol. Biol.* 10:19–23. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gimode, W. R., D. M. Kiboi, F. T. Kimani, H. N. Wamakima, M. W. Burugu, and F. W. Muregi. 2015. Fitness cost of resistance for lumefantrine and piperazine-resistant *Plasmodium berghei* in a mouse model. *Malar. J.* 14:1–11.
- Gonçalves, B. P., M. C. Kapulu, P. Sawa, W. M. Guelbéogo, A. B. Tiono, L. Grignard, W. Stone, J. Hellewell, K. Lanke, G. J. H. Bastiaens, J. Bradley, I. Nébié, J. M. Ngoi, R. Oriango, D. Mkabili, M. Nyaurah, J. Midega, D. F. Wirth, K. Marsh, T. S. Churcher, P. Bejon, S. B. Sirima, C. Drakeley, and T. Bousema. 2017. Examining the human infectious reservoir for *Plasmodium falciparum* malaria in areas of differing transmission intensity. *Nat. Commun.* 8:1–11. Nature Publishing Group.
- Goodman, C. D., J. E. Siregar, V. Mollard, J. Vega-Rodríguez, D. Syafruddin, H. Matsuoka, M. Matsuzaki, T. Toyama, A. Sturm, A. Cozijnsen, M. Jacobs-Lorena, K. Kita, S. Marzuki, and G. I. McFadden. 2016. Parasite resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit to mosquitoes. *Science (80-. ).* 352:349–353.
- Gouagna, L. C., G. Bancone, F. Yao, B. Yameogo, K. R. Dabiré, C. Costantini, J. Simporé, J. B. Ouedraogo, and D. Modiano. 2010. Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat. Genet.* 42:328–331.
- Haldar, K., S. Bhattacharjee, and I. Safeukui. 2018. Drug resistance in Plasmodium. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:156–170. Nature Publishing Group.
- Hansen, J., and T. Day. 2014. Coinfection and the evolution of drug resistance. *J. Evol. Biol.* 27:2595–2604.

- Hastings, I. M., and M. J. Donnelly. 2005. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist. Updat.* 8:43–50.
- Holmgren, G., J. P. Gil, P. M. Ferreira, M. I. Veiga, C. O. Obonyo, and A. Björkman. 2006. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfprt* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infect. Genet. Evol.* 6:309–314.
- Huijben, S., W. A. Nelson, A. R. Wargo, D. G. Sim, D. R. Drew, and A. F. Read. 2010. Chemotherapy, within host ecology and the fitness of drug resistant malaria parasites. *Evolution (N. Y.)*. 64:2952–2968.
- Kelly-Hope, L. A., and F. E. McKenzie. 2009. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *BioMed Central*.
- Kim, Y., A. A. Escalante, and K. A. Schneider. 2014. A population genetic model for the initial spread of partially resistant malaria parasites under anti-malarial combination therapy and weak intrahost competition. *PLoS One* 9:19–25.
- Klein, E. Y., D. L. Smith, R. Laxminarayan, and S. Levin. 2012. Superinfection and the evolution of resistance to antimalarial drugs. *Proc. Biol. Sci.* 279:3834–42.
- Koekemoer, L. L., L. Kamau, R. H. Hunt, and M. Coetzee. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:804–811.
- Koella, J. C. 1998. Costs and benefits of resistance against antimalarial drugs. *Parasitol. Today* 14:360–364.
- Koella, J. C., and R. Antia. 2003. Epidemiological models for the spread of antimalarial resistance. *Malar. J.* 2:3.
- Kublin, J. G., J. F. Cortese, E. M. Njunju, R. A. G. Mukadam, J. J. Wirima, P. N. Kazembe, A. A. Djimdé, B. Kouriba, T. E. Taylor, and C. V. Plowe. 2003. Reemergence of Chloroquine-Sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after Cessation of Chloroquine Use in Malawi. *J. Infect. Dis.* 187:1870–1875. Oxford University Press (OUP).
- Laufer, M. K., and C. V. Plowe. 2004. Withdrawing antimalarial drugs: Impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist. Updat.* 7:279–288.
- Lefèvre, T., J. Ohm, K. R. Dabiré, A. Cohuet, M. Choisy, M. B. Thomas, and L. Cator. 2018. Transmission traits of malaria parasites within the mosquito: genetic variation, phenotypic plasticity, and consequences for control. *Evol. Appl.* 11:456–469. Wiley-Blackwell.
- Lefèvre, T., A. Vantoux, K. R. Dabiré, K. Mouline, and A. Cohuet. 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9:e1003365.
- Liu, D. Q., R. J. Liu, D. X. Ren, D. Q. Gao, C. Y. Zhang, C. P. Qiu, X. Z. Cai, C. F. Ling, A. H. Song, and X. Tang. 1995. Changes in the resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in Hainan, China. *Bull. World Health Organ.* 73:483–486.

- Mackinnon, M. J., and I. M. Hastings. 1998. The evolution of multiple drug resistance in malaria parasites. *Trans. OFTHE R. Soc. OFTROPICAL Med. Hyg.* 92:188195.
- Marie, A., A. Boissière, M. T. Tsapi, A. Poinsignon, P. H. Awono-Ambéné, I. Morlais, F. Remoue, and S. Cornelie. 2013. Evaluation of a real-time quantitative PCR to measure the wild *Plasmodium falciparum* infectivity rate in salivary glands of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 12:1–7. BioMed Central.
- Martin, R. E., R. V Marchetti, A. I. Cowan, S. M. Howitt, S. Bröer, and K. Kirk. 2009. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science (80-. )*. 325:1680–1682.
- Menard, S., I. Morlais, R. Tahar, C. Sayang, P. I. Mayengue, X. Iriart, F. Benoit-Vical, B. Lemen, J.-F. Magnaval, P. Awono-Ambene, L. K. Basco, and A. Berry. 2012. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* drug susceptibility at the time of the introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaoundé, Cameroon: Implications for the future. *Malar. J.* 11:113.
- Mendes, A. M., T. Schlegelmilch, A. Cohuet, P. Awono-Ambene, M. De Iorio, D. Fontenille, I. Morlais, G. K. Christophides, F. C. Kafatos, and D. Vlachou. 2008. Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. *PLoS Pathog.* 4.
- Mharakurwa, S., T. Kumwenda, M. A. P. Mkulama, M. Musapa, S. Chishimba, C. J. Shiff, D. J. Sullivan, P. E. Thuma, K. Liu, and P. Agre. 2011. Malaria antifolate resistance with contrasting *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (DHFR) polymorphisms in humans and *Anopheles* mosquitoes. *PNAS* 108:18796–18801.
- Naß, J., and T. Efferth. 2019. Development of artemisinin resistance in malaria therapy. *Pharmacol. Res.* 146.
- Nurse, G. T. 1981. Fansidar-resistant falciparum malaria in Papua New Guinea.
- Ocan, M., D. Akena, S. Nsohya, M. R. Kanya, R. Senono, A. A. Kinengyere, and E. A. Obuku. 2019. Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors. *Malar. J.* 18:1–15. BioMed Central Ltd.
- OMS. 2018a. Burkina Faso.
- OMS. 2018b. Cameroon.
- Ord, R., N. Alexander, S. Dunyo, R. Hallett, M. Jawara, G. Targett, C. J. Drakeley, and C. J. Sutherland. 2007. Seasonal carriage of *pfprt* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J. Infect. Dis.* 196:1613–1619.
- Paulander, W., S. Maisnier-Patin, and D. I. Andersson. 2009. The fitness cost of streptomycin resistance depends on *rpsL* mutation, carbon source and RpoS ( $\sigma^S$ ). *Genetics* 183:539–546.
- Peterson, D. S., D. Walliker, and T. E. Wellems. 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:9114–9118.
- Pholwat, S., J. Liu, S. Stroup, S. T. Jacob, P. Banura, C. C. Moore, F. Huang, M. K. Laufer, E. Houpt,

- and J. L. Guler. 2017. The malaria TaqMan array card includes 87 assays for *Plasmodium falciparum* drug resistance, identification of species, and genotyping in a single reaction. , doi: 10.1128/AAC.00110-17.
- Roper, C., R. Pearce, B. Bredekamp, J. Gumede, C. Drakeley, F. Mosha, D. Chandramohan, and B. Sharp. 2003. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet* 361:1174–1181.
- Sanchez, C. P., J. E. McLean, P. Rohrbach, D. A. Fidock, W. D. Stein, and M. Lanzer. 2005. Evidence for a pfcrt-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* 44:9862–9870. American Chemical Society.
- Sanchez, C. P., J. E. McLean, W. Stein, and M. Lanzer. 2004. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 43:16365–16373. American Chemical Society.
- Sayang, C., M. Gausseres, N. Vernazza-Licht, D. Malvy, D. Bley, and P. Millet. 2009. Treatment of malaria from monotherapy to artemisinin-based combination therapy by health professionals in urban health facilities in Yaoundé, central province, Cameroon. *Malar. J.* 8. *Malar J.*
- Scott, J. A., W. G. Brogdon, and F. H. Collins. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:520–529. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- Singh, S. K., and S. Singh. 2014. A brief history of quinoline as antimalarial agents. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 25:295–302.
- Sirawaraporn, W., T. Sathitkul, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong, and D. V Santi. 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:1124–1129.
- Smith-Aguasca, R., H. Gupta, E. Uberegui, M. Maquina, F. Saute, K. P. Paaijmans, A. Mayor, and S. Huijben. 2019. Mosquitoes as a feasible sentinel group for anti-malarial resistance surveillance by Next Generation Sequencing of *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 18:351. BioMed Central Ltd.
- Thaithong, S., L. Suebsaenti, W. Rooney, and G. H. Beale. 1988. Evidence of increased chloroquine sensitivity in thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:37–38.
- Tinto, H., J. B. Ouédraogo, I. Zongo, C. Van Overmeir, E. Van Marck, T. R. Guiguemdé, and U. D’Alessandro. 2007. Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* *DHFR* mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76:608–613.
- Uwimana, A., E. Legrand, B. H. Stokes, J. L. M. Ndikumana, M. Warsame, N. Umulisa, D. Ngamiye, T. Munyaneza, J. B. Mazarati, K. Munguti, P. Campagne, A. Criscuolo, F. Ariey, M. Murindahabi, P. Ringwald, D. A. Fidock, A. Mbituyumuremyi, and D. Menard. 2020. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* *kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* 1–7. Nature Research.



- Veiga, M. I., S. K. Dhingra, P. P. Henrich, J. Straimer, N. Gnädig, A. C. Uhlemann, R. E. Martin, A. M. Lehane, and D. A. Fidock. 2016. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat. Commun.* 7:1–12. Nature Publishing Group.
- Vincke, I. H. 1970. The effects of pyrimethamine and sulphormethoxine on the pre-erythrocytic and sporogonous cycle of *Plasmodium berghei berghei*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* (1920). 50:339–358.
- Wang, P., M. Read, P. F. G. Sims, and J. E. Hyde. 1997. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol. Microbiol.* 23:979–986. Blackwell Publishing Ltd.
- Wargo, A. R., S. Huijben, J. C. De Roode, J. Shepherd, and A. F. Read. 2007. Competitive release and facilitation of drugresistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *PNAS* 104:19914 –19919.
- WHO. 1975. Manual on practical entomology in malaria.
- WHO. 2019. World Malaria Report 2019. Geneva.
- Wongsrichanalai, C., A. L. Pickard, W. H. Wernsdorfer, and S. R. Meshnick. 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria.
2020. Worldwide Antimalarial Resistance Network.

## Discussion Générale

Pendant cette thèse, nous avons étudié les impacts de l'utilisation des médicaments antipaludiques sur la transmission des parasites responsables du paludisme, *Plasmodium sp.*, en utilisant des études de terrain (*P. falciparum*) mais aussi des études en conditions contrôlées en laboratoire avec le modèle de la malaria aviaire (*P. relictum*). Nous nous sommes particulièrement intéressés au vecteur, qui bien qu'il soit le lieu de processus importants pour le parasite, est encore trop souvent négligé lorsqu'on étudie les effets des médicaments sur l'évolution des parasites. Dans cette dernière partie, je discute des résultats des 4 chapitres de ma thèse pour comprendre comment les antipaludiques peuvent influencer la transmission des parasites et donc l'incidence de la maladie, en m'intéressant à l'évolution des résistances et aux effets des médicaments antipaludiques sur le vecteur.

L'interaction entre *Plasmodium*, le vecteur et l'hôte vertébré est une interaction durable définie par l'équilibre coûts/bénéfices pour chacun des participants. La balance coûts-bénéfices apparaît être au centre de nombreux mécanismes évolutifs. En effet, dans une symbiose cette balance va être primordiale, d'autant plus lors de l'apparition d'une innovation, pour déterminer la viabilité de l'interaction et va être le moteur de la course aux armements, chaque participant cherchant à diminuer les coûts subis et à augmenter les bénéfices. En cas de coûts trop élevés par rapport aux bénéfices apportés dans un environnement donné, cette innovation va rapidement disparaître. Par contre si dans cet environnement donné, l'innovation apporte un avantage certain aux individus porteurs, alors elle a des chances de se propager dans la population, voire même au sein de l'espèce. Ainsi, lorsqu'on s'intéresse à l'évolution d'une interaction durable on va être amené à regarder différentes balances s'emboîtant à l'image de poupées russes. L'interaction elle-même va disposer de sa propre balance coûts/bénéfices qui finalement n'est que l'accumulation de toutes les autres qui seront issues de l'évaluation de chaque innovation amenée par un des partenaires de l'interaction. A chaque modification génétique et phénotypique d'un des partenaires, l'équilibre va être modifié et l'autre partenaire va être influencé conduisant à une adaptation ou à une disparition de l'interaction.

L'hôte représente l'environnement direct du symbiote et inclut des facteurs biotiques extérieurs à l'hôte tels que d'autres hôtes potentiels et d'autres symbiotes potentiels, mais aussi des facteurs abiotiques, comme le climat ou la topographie. Par exemple, la nourriture des hôtes va influencer les ressources disponibles pour le symbiote. On comprend facilement que dans le cas du parasitisme, l'hôte n'a pas d'intérêt à combler les besoins de son symbiote. Il peut donc, via son alimentation, tenter de se débarrasser de celui-ci (De Roode et al. 2013). Ainsi, l'interaction avec l'environnement abiotique peut complètement s'inscrire comme une arme de la course aux armements qui sévit entre l'hôte et le parasite. La course aux armements est la théorie selon laquelle des innovations évolutives sont sélectionnées par alternance chez l'hôte ou le parasite pour diminuer les coûts pour le premier et augmenter les bénéfices pour le second. L'homme ne

fait pas exception et est aussi engagé dans une course aux armements face à ses propres pathogènes, dont *Plasmodium*. Le développement des médicaments est une stratégie développée par l'homme pour lutter contre les pathogènes. Le succès de cette stratégie va donc dépendre d'une balance entre ses coûts et ses bénéfices biologiques dont nous allons discuter maintenant.

## Coûts et bénéfices des stratégies médicamenteuses actuelles

Les bénéfices associés à l'utilisation des médicaments sont dans un premier temps évidents puisqu'ils réduisent fortement la mortalité et la morbidité des populations, améliorant leurs conditions de vie et réduisant l'impact économique qu'elles entraînent. Dans le cas du paludisme, les médicaments antipaludiques ont réduit considérablement l'impact du paludisme sur les populations humaines, mais ont dans le même temps exercé une pression de sélection forte menant à l'émergence et la propagation de parasites résistants.

### *Les coûts associés à la stratégie médicamenteuse*

Du fait de la présence de parasites résistants, dans l'état actuel des connaissances les médicaments ont une durée de vie relativement courte. Les parasites sont résistants aux traitements qui deviennent donc inutiles et font retourner la situation sanitaire à l'état de départ. En effet, il a fallu développer successivement des antipaludiques avec des mécanismes d'action différents pour lutter contre les parasites résistants afin de garder la situation sous contrôle. Aujourd'hui il existe des parasites résistants à toutes les thérapies connues, il est donc urgent de comprendre les pressions de sélection qui mènent à leur émergence et leur propagation.

Dans le Chapitre 1, nous avons vu qu'un traitement de l'hôte vertébré peut avoir un impact sur des vecteurs préalablement infectés. Le traitement d'oiseaux à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) a diminué drastiquement la charge et la prévalence en sporozoïte de moustiques infectés depuis 6 jours au moment de la prise du repas sanguin traité. Ceci signifie que la pression de sélection exercée par cet antipaludique a eu lieu non seulement dans le vertébré mais aussi dans le vecteur. Cela participe à expliquer l'apparition et la propagation particulièrement rapide (moins de 10 ans) de parasites résistants à SP. La même expérience avec de l'artésunate (AS) n'a montré aucun effet dans le vecteur. SP reste plusieurs jours dans le sang après le traitement tandis que AS est éliminé en quelques heures de la circulation sanguine. Ainsi, un traitement qui est long à être éliminé de la circulation sanguine augmente le contact de parasites avec des doses inférieures à celles recommandées pour éliminer totalement les parasites dans l'homme, mais aussi dans le vecteur, augmentant grandement les risques d'émergence et de propagation de parasites résistants. Il serait intéressant de répéter cette expérience avec des parasites résistants au traitement pour voir s'ils sont plus compétents que les sensibles pour arriver aux glandes salivaires d'un vecteur ayant pris un repas sanguin traité.

Les mutations induisant une résistance ont lieu sur des zones très conservées du génome de *Plasmodium* car ces gènes aux fonctions primordiales pour la survie et la transmission des parasites (acquisition des ressources, synthèse d'ADN et de protéines) sont ciblés par les médicaments. Pour mieux comprendre l'évolution de la résistance chez *Plasmodium sp.*, il y a deux modèles expérimentaux (*in vitro* et *in vivo*) qui permettent d'effectuer une sélection expérimentale en conditions contrôlées et d'obtenir des parasites résistants à l'antipaludique choisis. Une fois ces parasites résistants obtenus, il est possible de tester leur valeur sélective dans différentes conditions. Pour les expérimentations *in vivo*, les modèles murins et aviaires ont été privilégiés (Greenberg 1956; Beaudoin et al. 1967; De Roode et al. 2005; Walliker et al. 2005; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2011). Dans le Chapitre 3, nous avons mis en place un protocole de sélection expérimentale *in vivo* afin d'obtenir des parasites de l'espèce *Plasmodium relictum* (malaria aviaire) résistants à l'artésunate (AS) et à la pyriméthamine. Après 12 cycles de sélection (infection d'oiseaux – traitement des oiseaux- infection d'oiseaux sains avec les parasites survivants), nous avons dû abandonner la sélection à la pyriméthamine car la sélection ne semblait pas aboutir. Nous avons par contre obtenu 3 lignées de parasites supposés résistants à l'AS, ce qui nous a permis de tester leur développement dans des oiseaux traités, non traités ainsi que dans les vecteurs, *Culex quinquefasciatus*, qui avait été largement négligé jusqu'à présent dans les études des coûts de la résistance. Nous avons donc comparé le phénotype des parasites sélectionnés avec la lignée sensible. Chez *P. relictum*, il y a deux phases dans l'infection des oiseaux. La première est appelée phase aigüe, caractérisée par une parasitémie qui augmente dans le sang jusqu'à atteindre un pic, puis qui diminue. La deuxième est la phase chronique pendant laquelle la parasitémie est toujours présente sans le sang mais à peine détectable. Dans notre expérience, pour les parasites résistants à l'AS, la parasitémie met plus de temps que la lignée non sélectionnée à diminuer après injection du traitement et on observe une recrudescence pour certaines lignées sélectionnées après la fin du traitement, de la même façon que la résistance aux dérivés d'artémisinine du paludisme humain (Witkowski et al. 2013; Mok et al. 2015). De plus, nous n'avons pas mis en évidence de coûts associés à la résistance à l'AS en absence de traitement dans l'hôte vertébré. La parasitémie semble même mettre plus de temps à diminuer après le pic de la phase aigüe. Ceci peut se traduire par une période de transmission optimale (avec beaucoup de gamétocytes dans le sang) plus longue. Ainsi, les parasites résistants pourraient mieux se transmettre au vecteur, même en absence de médicaments. Des parasites résistants à la chloroquine avaient déjà montré un phénotype similaire, c'est-à-dire qu'il n'y avait pas de coûts associés à la résistance et même un avantage sur la transmission au vecteur même en absence de traitement (Koella 1998). Le lien entre virulence et résistance a été discuté déjà plusieurs fois, la résistance aux antipaludiques pourrait être associée à une meilleure capacité de multiplication et donc à une virulence plus élevée (Koella 1998; Schneider et al. 2008; Stein et al. 2009). En effet,

des parasites plus virulents pourraient se transmettre même à partir d'un hôte traité grâce à leur capacité de multiplication plus rapide ou plus efficace. Cependant, dans notre étude nous n'avons pas montré de lien entre résistance et virulence dans l'hôte vertébré. Dans le vecteur par contre, une des lignées sélectionnées était plus virulente (diminution de la fécondité). Il est donc possible que suite à la sélection de parasite résistants aux antipaludiques, ces parasites soient plus virulents engendrant plus de mortalité ou d'handicaps suite à une infection. En effet, c'est l'explosion des globules rouges suite à la multiplication asexuée du parasite qui entraînent les fièvres et les symptômes les plus graves (Trampuz et al. 2003). Ainsi, une augmentation de la vitesse de multiplication des parasites pourrait augmenter le nombre de morts dues à la maladie.

En conclusion, une mauvaise connaissance des molécules utilisées pour traiter le paludisme et de leurs effets sur le parasite et les hôte (humain et vecteur) peut conduire à aggraver la situation à long terme, quand les populations de parasites sont durablement dominées par les parasites résistants. Nous ne disposerions plus de traitement efficace et les parasites résistants aux traitements connus seraient plus virulents donc engendrant plus de mortalité

### *Les bénéfices des stratégies médicamenteuses contre le paludisme*

#### *Les bénéfices à l'échelle individuelle : la guérison*

L'utilisation des médicaments a réduit considérablement l'impact du paludisme sur les populations humaines, notamment en participant à l'éradication de la maladie localement. Le continent européen a été débarrassé du paludisme à partir des années 1960 (Dobson 1999; Hay et al. 2004; Vale et al. 2009). Aujourd'hui, il y a encore plus de 200 millions de cas et 400 000 morts par an à cause du paludisme principalement en Afrique sub-Saharienne (WHO 2019) et les médicaments jouent un rôle essentiel dans la diminution de la mortalité et de la morbidité liée à la maladie.

#### *Les bénéfices à l'échelle de la population : la diminution de la transmission*

Les médicaments antipaludiques ont aussi des bénéfices moins évidents au premier abord. En effet, les médicaments sont développés pour soigner l'humain en premier lieu or, ils ont rapidement montré qu'ils pouvaient avoir d'autres effets pour diminuer l'incidence de la maladie. Ils participent donc à une stratégie de lutte en partie altruiste, se soigner sert aussi à protéger notre entourage de la maladie.

Premièrement, ils permettent de réduire la transmission grâce des effets prophylactiques qui empêchent l'infection (WHO 2019). Cette protection est utilisée, pour empêcher l'infection des jeunes enfants en période de forte transmission (« Seasonal Malaria Chemoprevention », SMC) et pour protéger les femmes enceintes et les nouveaux-nés (« Intermittent Preventive Treatment », IPT). La SMC diminue les risques d'infection pour les jeunes enfants (<5ans) qui sont

particulièrement sensibles au paludisme, et pour leur entourage car ce sont des hôtes particulièrement efficaces pour la transmission de *Plasmodium* (Coalson et al. 2016; WHO 2019).

Deuxièmement, les antipaludiques peuvent aussi réduire la transmission du paludisme en agissant directement soit sur les stades transmissibles des parasites chez l'homme (gamétocytes) soit sur les stades se développant sur le vecteur (Sinden et al. 2012; Wadi et al. 2019). Les effets de certains antipaludiques sur les stades sexués sanguins ont été particulièrement étudiés (Ruecker et al. 2014; Delves et al. 2018), tandis que les effets des antipaludiques sur les stades dans le vecteur ont été négligés. Pourtant, dans le Chapitre 1, nous avons montré que la SP réduit drastiquement la prévalence et la charge en sporozoïtes des moustiques qui se nourrissent de sang traité, diminuant ainsi les chances de transmission des parasites. Avec la mise en place des chimio-préventions sur les enfants avec SP, on peut espérer une diminution de la transmission encore plus forte qu'attendu car les moustiques ont plus de chances de se nourrir sur des individus traités avec SP. Il est donc important de connaître les mécanismes qui entraînent une telle diminution de prévalence et charge parasitaire suite à l'ingestion de sang traité. Dans le Chapitre 2, nous avons cherché à mieux comprendre cet effet notamment en nous intéressant à l'effet de SP sur le microbiome du moustique. En effet, les bactéries contenues dans le microbiome du tube digestif ont généralement un rôle dans la digestion des repas ainsi que dans la protection de leur hôte contre des pathogènes. On peut donc imaginer qu'un traitement dans le sang humain capable de faire varier la charge bactérienne d'*Elizabethkingia sp.*, *Serratia sp.* ou *Wolbachia* augmenterait l'efficacité des moyens de lutte dont nous disposons déjà. Ces 3 genres bactériens étaient majoritaires dans l'étude du microbiome de *C. quinquefasciatus* nourris sur des oiseaux traités avec SP dans le Chapitre 2. Ces bactéries ont déjà montré qu'elles pouvaient interagir avec *Plasmodium sp.* en augmentant le succès d'infection ou au contraire en protégeant le vecteur contre le parasite (Zélé et al. 2012; Gomes et al. 2017; Wang et al. 2017; Bai et al. 2019).

Dernièrement, les parasites résistants aux traitements représentent un enjeu majeur en santé publique puisqu'avec la propagation des parasites résistants aux traitements actuels la maladie devient incontrôlable. Les mutations liées à la résistance aux antipaludiques sont supposées coûteuses car elles interviennent sur des zones fortement conservées car impliquées dans des fonctions majeures dans le métabolisme des parasites. L'hypothèse des coûts biologiques associés à la résistance est appuyée par des observations de terrain. En effet, lorsqu'on cesse d'utiliser une molécule antipaludique, la prévalence de parasites mutants diminue. L'exemple le plus marquant a été l'arrêt de l'utilisation de la chloroquine au Malawi en 1993 qui a entraîné une forte diminution de la prévalence de l'allèle de résistance sur le gène *pfcr1* (Laufer and Plowe 2004; Ocan et al. 2019). Nos propres données (Chapitre 4) ont montré une très faible prévalence (9%) des allèles de résistance de *pfcr173-76* au Cameroun en 2018 alors que l'utilisation de la chloroquine au Cameroun a cessé en 2002 (Djeutchuang Sayang 2010). Cette prévalence allait



jusqu'à 83% entre 2002 et 2009 dans la même région (Menard et al., 2012). De façon contre intuitive, des résultats du Chapitre 3 suggèrent que malgré les allèles de résistance, l'utilisation des antipaludiques a pu sélectionner des parasites avec une moins bonne transmission, diminuant ainsi l'incidence de la maladie dans les populations humaines. Nous avons observé que les moustiques infectés par les lignées résistantes à l'AS avaient une charge en oocystes (stade de *Plasmodium* enkysté dans la paroi du tube digestif du moustique) et en sporozoïtes (stade dans les glandes salivaires, transmissible au vertébré) plus faible que la lignée contrôle. Ceci est soutenu par nos observations sur le terrain (Chapitre 4) car on voit qu'il y a moins d'allèle de résistance sur *pfmdr184* dans les vecteurs que dans l'homme. Ceci suggère un coût sur la transmission au moustique. De plus, dans le Chapitre 3, une des deux lignées résistantes à l'AS utilisée dans ce chapitre était plus virulente pour les vecteurs, entraînant une diminution de la fécondité des moustiques. Même si ce dernier effet devra être très marqué pour avoir une réelle importance épidémiologique et ne s'est pas retrouvé dans la deuxième lignée testée, ces deux points peuvent amener à une diminution de la transmission du paludisme d'abord par une diminution de la charge parasitaire des vecteurs qui peut altérer les chances des parasites de se transmettre à l'humain, mais aussi en diminuant la capacité vectorielle par une baisse de la densité en vecteur. Ainsi, malgré la présence de parasites résistants l'utilisation des traitements pourrait tout de même permettre de diminuer l'incidence de la maladie.

Ainsi, l'analyse de l'effet des antipaludiques chez l'humain mais aussi chez le vecteur est primordiale pour que la stratégie médicamenteuse de lutte contre le paludisme soit optimale. La stratégie optimale permettrait de diminuer la mortalité et l'incidence en guérissant les hommes atteints et en diminuant la transmission par les moustiques.

### Implications de ces résultats sur le terrain

L'analyse des coûts et des bénéfices des stratégies médicamenteuses utilisées dans le présent ou dans le passé peut mettre en avant de nouvelles stratégies plus optimisées. Dans le Chapitre 1, nous montrons que certains antipaludiques peuvent avoir un effet sur le vecteur et les stades parasitaires dans le vecteur. Cela signifie que la pression de sélection exercée par certains médicaments comme la SP peut agir non seulement dans l'hôte vertébré mais aussi dans le vecteur. On peut imaginer que l'émergence et la propagation de parasites résistants à la SP, qui a été particulièrement rapide (Nurse 1981), a bénéficié de cette double pression de sélection. Celle-ci ne semble pas être présente avec l'AS. Or, une différence majeure entre les deux molécules est la demi vie dans le sang : SP a une demi vie longue dans le sang (plusieurs jours) tandis que l'AS ne reste dans le sang que quelques heures (1 à 2 heures) donc la probabilité qu'un moustique infecté se nourrisse de sang traité à l'AS est plus faible que sur du sang traité à SP. Pour mieux

comprendre les risques d'émergence de parasites résistants, il paraît donc primordial de s'intéresser à l'effet du médicament envisagé sur le moustique, et sur le parasite dans le moustique et ce jusqu'aux stades sporozoïtes. Pour des raisons pratiques, la plupart des études qui mesurent la transmissibilité des parasites résistants quantifient uniquement les stades oocystes dans le tube digestif. Or, nous avons montré que l'effet sur les oocystes peut être opposé à l'effet sur les sporozoïtes, qui sont capable d'infecter l'humain. Ceci peut être particulièrement important lors du développement de vaccins altruistes, visant à bloquer la transmission du paludisme.

Les effets du médicament sur le parasite dans le vecteur ou sur le vecteur peuvent être dus à une interaction avec le microbiome du moustique. La médecine commence à s'intéresser de près au microbiome et à son interaction avec les pathogènes et les traitements utilisés (Burgess et al. 2017). En effet, un traitement qui élimine aussi certaines bactéries du tube digestif, ou qui en favorise d'autres dans le vecteur peut fortement influencer la transmission du paludisme en diminuant les défenses naturelles du vecteur face à ce pathogène. Bien que n'ayant pas les résultats finaux du Chapitre 2, nous voyons un effet potentiel de SP sur le microbiome du vecteur qui pourrait être en lien avec la transmission du paludisme. SP semble favoriser la prolifération de *Serratia sp.* dans le tube digestif de *C. quinquefasciatus*. Or, certaines souches de cette bactérie diminuent le succès d'infection de *Plasmodium* (Bando et al. 2013; Chen et al. 2017; Bai et al. 2019). Lors du développement des prochains antipaludiques, les tests pourraient être fait sur le vertébré mais aussi sur le vecteur infecté et non infecté pour prendre en compte toutes les conséquences possibles du médicament sur la transmission et mieux appréhender l'ampleur de la pression de sélection menant à l'émergence de parasites résistants.

Pour améliorer les stratégies de lutte, il semble important de tenir compte des variabilités entre les zones d'endémicité. Dans le chapitre 4, nous avons mis en évidence des différences de prévalence des allèles de résistance entre les sites étudiés. Ceci peut résulter des différences dans les stratégies de lutte utilisées, notamment les traitements choisis. Cela peut aussi représenter l'impact de l'environnement et des différences génétiques entre les populations humaines et de vecteurs. La stratégie de lutte contre le paludisme ne peut donc pas être décidée au niveau global mais il faut étudier les stratégies localement pour trouver celle qui sera optimale pour une région donnée. En effet, il est possible que suivant le climat certains génotypes de résistance aient plus de mal à se transmettre. On sait que *P. falciparum* a une fourchette de températures lui permettant de se développer dans le moustique (Lefèvre et al. 2013). Il serait intéressant de répéter l'expérience du Chapitre 3 (caractérisation phénotypique de parasites résistants à l'AS) avec différentes températures de maintien des moustiques. De plus, le vecteur majoritaire diffère suivant les zones et ceci peut avoir un impact sur la propagation des parasites résistants. L'allèle de résistance sur *pfmdr184* est moins souvent présent dans les *An. funestus s.s.* à Mfou, au Cameroun, que dans les *An. gambiae s.s.* sur le même site. Les *An. funestus s.s.* pourraient être de

moins bons vecteurs de parasites résistants, cela nécessite une confirmation avec des infections expérimentales pour comparer l'infection d'*An. gambiae* et *An. funestus* dans des conditions identiques. Il serait aussi intéressant d'étendre notre échantillonnage pour avoir plusieurs sites avec des *An. gambiae* s.s. et *An. funestus* s.s. en même temps. Cet échantillonnage peut aussi être réalisé sur plusieurs années consécutives pour savoir si cet effet se maintient avec le temps et potentiellement faire partie du suivi de la propagation des allèles de résistance étant donné que les vecteurs pourraient agir comme des sentinelles, notamment quand la prévalence chez le vecteur est supérieure à celle chez l'homme, comme c'est le cas avec *pfprt* (cf discussion chapitre 4). La différence entre les sites peut aussi être due à des pratiques culturelles ou à l'environnement social et médical. En effet, on peut observer à quel point les différences culturelles peuvent influencer les pratiques face à une maladie en observant la différence de gestion de la pandémie COVID19 dans le monde occidental. Certains pays ont fait le choix de mettre la population en confinement quand d'autres ont choisis de miser sur l'immunité de groupe. Il peut se passer la même chose dans les pays touchés par le paludisme, qui vont chacun utiliser les recommandations de l'OMS et les adapter dans leur pays, potentiellement de façon différente. Il y a aussi un questionnement quant à l'éloignement vis-à-vis des centres de soins et le développement du système de santé. Plus un village est loin d'un centre de soins officiel plus les villageois pourront avoir tendance à se tourner vers le marché noir et donc une mauvaise médication qui favorise l'émergence de parasites résistants et leur propagation.

Finalement, on voit que l'efficacité des traitements antipaludiques dépend des coûts biologiques associés aux mutations induisant la résistance aux médicaments dans l'hôte non traité. En effet, les coûts vont influencer la transmission des parasites résistants et donc l'incidence de la maladie. Plus ces coûts seront forts, plus les allèles de résistance auront tendance à disparaître dans les populations de parasite après l'arrêt du traitement auquel ils sont résistants. A l'inverse, si ces mutations sont peu ou pas coûteuses alors les allèles de résistances peuvent persister dans la population même en absence de traitement. Ce traitement ne serait donc plus utilisable dans l'avenir. Il est primordial de connaître les coûts associés à la résistance aux antipaludiques utilisés ou envisagés mais aussi d'avoir un suivi précis de la circulation des allèles de résistance dans les populations de parasite sur le terrain (Chapitre 4).

## Perspectives

Les travaux menés durant cette thèse apportent des éléments qui mettent en avant l'importance d'étudier les pressions de sélection exercées sur les parasites et qui mènent à l'émergence et la propagation des parasites résistants aux antipaludiques connus. En effet, étudier le système entier (parasite – vecteur – homme) permet de mieux appréhender les risques

d'émergence et de propagation de parasites résistants à l'antipaludique étudié car, comme démontré dans cette thèse, certains médicaments antipaludéens peuvent aussi avoir des effets dans le vecteur, pas seulement dans l'humain.

Pour compléter les informations fournies par les expériences de cette thèse, il serait utile de recommencer une sélection artificielle avec la malaria aviaire pour obtenir des parasites résistants à l'AS et d'autres à la pyriméthamine. Les premiers nous permettraient de répliquer l'expérience du chapitre 3 pour confirmer ou infirmer les effets pléiotropiques liés à la résistance à l'AS observés et d'aller plus loin (variation de température). Les deuxièmes nous permettraient de procéder au même type d'expérience que dans le chapitre 3 avec un antipaludique encore très important aujourd'hui mais avec un fonctionnement très différent de l'AS. Les parasites résistants à la pyriméthamine étudiés jusqu'à présents ont tous une mutation sur le gène *dhfr* (Carlton et al. 2001; Gregson and Plowe 2005; Petersen et al. 2011). Bien que cela n'ait jamais été fait sur *P. relictum* on s'attend à ce que la mutation liée à la résistance soit sur le même gène, facilement identifiable. Ceci permettrait d'avoir un marqueur génétique de la résistance, pour pouvoir différencier les parasites mutés et sauvages donc, de suivre les proportions de chacun dans différentes conditions expérimentales et d'en déduire l'issue de la compétition entre ces deux génotypes. Dans des études précédentes, il a été montré que les coûts associés à la résistance sont détectables principalement en condition de compétition avec des parasites avec l'allèle sauvage (De Roode et al. 2004; Wargo et al. 2007; Huijben et al. 2011).

Dans le chapitre 4, nous avons mis en évidence des différences de prévalence d'allèles de résistance entre les *An. gambiae s.s.* et *An. funestus s.s.*. Pour confirmer cette différence, il faudrait procéder à des infections expérimentales avec des parasites résistants et poursuivre l'échantillonnage pour avoir plus de sites avec les deux espèces vectrices concomitantes. En effet, les vecteurs sont de ce fait nourris sur la même population d'hôtes et dans les mêmes conditions environnementales. On peut aussi envisager un échantillonnage sur plusieurs années pour savoir si cela se maintient dans le temps.

Pour finir, étant donné la très récente émergence de parasites résistants aux dérivés d'artémisinine au Rwanda en Afrique (Uwimana et al. 2020), il est prévu de génotyper les échantillons de terrain (chapitre 4) sur le locus *k13 R561H*, car il est urgent de comprendre les mécanismes impliqués dans la propagation de ces parasites résistants, qui menacent de nous désarmer face à la maladie.

## Références

- Bai, L., L. Wang, J. Vega-Rodríguez, G. Wang, and S. Wang. 2019. A gut symbiotic bacterium *Serratia marcescens* renders mosquito resistance to *Plasmodium* infection through activation of mosquito immune responses. *Front. Microbiol.* 10:1580. Frontiers Media S.A.
- Bando, H., K. Okado, W. M. Guelbeogo, A. Badolo, H. Aonuma, B. Nelson, S. Fukumoto, X. Xuan, N. Sagnon, and H. Kanuka. 2013. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Sci. Rep.* 3:1–9. Nature Publishing Group.
- Beaudoin, R. L., C. P. A. Strome, and C. G. Huff. 1967. Persistence of pyrimethamine resistance in the exoerythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Exp. Parasitol.*, doi: 10.1016/0014-4894(67)90034-3.
- Burgess, S. L., C. A. Gilchrist, T. C. Lynn, and W. A. Petri. 2017. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. *Infect. Immun.* 85:e00101-17.
- Carlton, J. M. R., K. Hayton, P. V. L. Cravo, and D. Walliker. 2001. Of mice and malaria mutants: Unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models.
- Chen, S., J. Blom, and E. D. Walker. 2017. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. *Front. Microbiol.* 8:1483. Frontiers Media S.A.
- Coalson, J. E., J. A. Walldorf, L. M. Cohee, M. D. Ismail, D. Mathanga, R. J. Cordy, M. Marti, T. E. Taylor, K. B. Seydel, M. K. Laufer, and M. L. Wilson. 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. *Malar. J.* 15:1–17. BioMed Central.
- De Roode, J. C., R. Culleton, A. S. Bell, and A. F. Read. 2004. Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar. J.* 3:33.
- De Roode, J. C., T. Lefevre, and M. D. Hunter. 2013. Self-medication in animals. American Association for the Advancement of Science.
- De Roode, J. C., R. Pansini, S. J. Cheesman, M. E. H. Helinski, S. Huijben, A. R. Wargo, A. S. Bell, B. H. K. Chan, D. Walliker, A. F. Read, and N. A. Moran. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *PNAS* 102:7624–7628.
- Delves, M. J., F. Angrisano, and A. M. Blagborough. 2018. Antimalarial transmission-blocking interventions: past, present, and future. *Trends Parasitol.* 34:735–746. Elsevier Ltd.
- Djeutchuang Sayang, C. 2010. Intérêt de l'utilisation des tests de diagnostic rapide du paludisme sur le coût et l'efficacité de la prise en charge des patients fébriles à Yaoundé, Cameroun.
- Dobson, M. J. 1999. The malariology centenary. *Parassitologia* 41:21–32.
- Gomes, F. M., B. L. Hixson, M. D. W. Tyner, J. L. Ramirez, G. E. Canepa, T. L. Alves e Silva, A. Molina-

- Cruz, M. Keita, F. Kane, B. Traoré, N. Sogoba, and C. Barillas-Mury. 2017. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae s.l.* mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:12566–12571.
- Greenberg, J. 1956. Mixed lethal strains of *Plasmodium gallinaceum*: drug-sensitive, transferable (SP) × drug-resistant, non-transferable (BI). *Exp. Parasitol.* 5:359–370.
- Gregson, A., and C. V Plowe. 2005. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57:117–145.
- Hay, S. I., C. A. Guerra, A. J. Tatem, A. M. Noor, and R. W. Snow. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future. Elsevier.
- Huijben, S., D. G. Sim, W. A. Nelson, and A. F. Read. 2011. The fitness of drug-resistant malaria parasites in a rodent model: multiplicity of infection. *J. Evol. Biol.* 24:2410–2422.
- Koella, J. C. 1998. Costs and benefits of resistance against antimalarial drugs. *Parasitol. Today* 14:360–364.
- Laufer, M. K., and C. V. Plowe. 2004. Withdrawing antimalarial drugs: Impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist. Updat.* 7:279–288.
- Lefèvre, T., A. Vantoux, K. R. Dabiré, K. Mouline, and A. Cohuet. 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog.* 9:e1003365.
- Menard, S., I. Morlais, R. Tahar, C. Sayang, P. I. Mayengue, X. Iriart, F. Benoit-Vical, B. Lemen, J.-F. Magnaval, P. Awono-Ambene, L. K. Basco, and A. Berry. 2012. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* drug susceptibility at the time of the introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaoundé, Cameroon: Implications for the future. *Malar. J.* 11:113.
- Mok, S., E. A. Ashley, P. E. Ferreira, L. Zhu, Z. Lin, T. Yeo, C. Chotivanich, M. Imwong, S. Pukrittayakamee, S. Suon, H. T. Tran, Y. Htut, M. A. Faiz, M. Onyamboko, M. Mayxay, P. N. Newton, R. Tripura, C. J. Woodrow, O. Miotto, D. P. Kwiatkowski, F. Nosten, N. P. J. Day, P. R. Preiser, N. J. White, A. M. Dondorp, R. M. Fairhurst, and Z. Bozdech. 2015. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science (80-. ).* 347:431–435.
- Nurse, G. T. 1981. Fansidar-resistant falciparum malaria in Papua New Guinea.
- Ocan, M., D. Akena, S. Nsohya, M. R. Kanya, R. Senono, A. A. Kinengyere, and E. A. Obuku. 2019. Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors. *Malar. J.* 18:1–15. BioMed Central Ltd.
- Petersen, I., R. Eastman, and M. Lanzer. 2011. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* 585:1551–1562. Federation of European Biochemical Societies.
- Ruecker, A., D. K. Mathias, U. Straschil, T. S. Churcher, R. R. Dinglasan, D. Leroy, R. E. Sinden, and



- M. J. Delves. 2014. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:7292–7304.
- Schneider, P., B. H. Chan, S. E. Reece, and A. F. Read. 2008. Does the drug sensitivity of malaria parasites depend on their virulence? *Malar. J.* 7:257. BioMed Central.
- Sinden, R. E., R. Carter, C. Drakeley, and D. Leroy. 2012. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar. J.* 11:1–11.
- Stein, W. D., C. P. Sanchez, and M. Lanzer. 2009. Virulence and drug resistance in malaria parasites. *Trends Parasitol.* 25:441–443.
- Trampuz, A., M. Jereb, I. Muzlovic, and R. M. Prabhu. 2003. Clinical review: severe malaria. *Crit. Care* 7:315–323. BioMed Central.
- Uwimana, A., E. Legrand, B. H. Stokes, J. L. M. Ndikumana, M. Warsame, N. Umulisa, D. Ngamiye, T. Munyaneza, J. B. Mazarati, K. Munguti, P. Campagne, A. Criscuolo, F. Ariey, M. Murindahabi, P. Ringwald, D. A. Fidock, A. Mbituyumuremyi, and D. Menard. 2020. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* *kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* 1–7. Nature Research.
- Vale, N., R. Moreira, and P. Gomes. 2009. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 44:937–953. Elsevier Masson SAS.
- Wadi, I., M. Nath, A. R. Anvikar, P. Singh, and A. Sinha. 2019. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Med. Chem.* 11:3047–3088.
- Walliker, D., P. Hunt, and H. Babiker. 2005. Fitness of drug-resistant malaria parasites.
- Wang, S., A. L. A. Dos-Santos, W. Huang, K. C. Liu, M. A. Oshaghi, G. Wei, P. Agre, and M. Jacobs-Lorena. 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* (80-. ). 357:1399–1402. American Association for the Advancement of Science.
- Wargo, A. R., S. Huijben, J. C. De Roode, J. Shepherd, and A. F. Read. 2007. Competitive release and facilitation of drugresistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *PNAS* 104:19914 –19919.
- WHO. 2019. World Malaria Report 2019. Geneva.
- Witkowski, B., N. Khim, P. Chim, S. Kim, S. Ke, N. Kloeung, S. Chy, S. Duong, R. Leang, P. Ringwald, A. M. Dondorp, R. Tripura, F. Benoit-Vical, A. Berry, O. Gorgette, F. Ariey, J. C. Barale, O. Mercereau-Puijalon, and D. Menard. 2013. Reduced artemisinin susceptibility of plasmodium falciparum ring stages in western cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:914–923.
- Zélé, F., A. Nicot, O. Duron, and A. Rivero. 2012. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes



against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. J. Evol. Biol. 25:1243–1252.



## **Impact de l'utilisation des médicaments antipaludiques sur la transmission de *Plasmodium sp.***

Le paludisme a encore aujourd'hui une incidence importante dans les populations humaines, notamment en Afrique sub-Saharienne, malgré le développement de médicaments antipaludiques. Ces derniers diminuent la mortalité et la morbidité liée à la maladie et peuvent impacter la transmission des parasites dans l'humain ou dans le vecteur. Les études sur les effets des médicaments antipaludiques sur la transmission du paludisme se sont pour le moment concentrées sur l'homme. Dans cette thèse, nous nous intéressons aux effets de deux antipaludiques majeurs, l'artésunate (AS) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), sur la transmission du paludisme non seulement dans l'hôte vertébré mais aussi dans le vecteur. Grâce à un modèle de laboratoire, la malaria aviaire (*Plasmodium relictum*), nous avons montré que la SP diminue fortement la charge et la prévalence en sporozoïtes de moustiques infectés nourris sur des oiseaux traités et nous sommes en train d'étudier le lien avec le microbiome et le transcriptome dans le tube digestif du moustique. Ce médicament influence la transmission du paludisme en agissant directement sur les parasites dans le vecteur et de ce fait peut exercer une pression de sélection non seulement dans les humains traités (comme c'est largement accepté) mais aussi dans les vecteurs prenant un repas sanguin traité. Nous n'avons pas observé d'effet d'AS dans le vecteur. Par contre, lors d'une expérience au laboratoire utilisant des lignées de *P. relictum* sélectionnées pour être résistantes à l'AS, nous avons observé que les coûts biologiques associés à la résistance à l'AS s'expriment dans le vecteur (diminution de l'intensité d'infection) mais pas dans le vertébré non traité. De plus, nous avons comparé la prévalence d'allèles de résistance sur les gènes *pfcr*, *dhfr* et *pfmdr* de *Plasmodium falciparum* entre les hommes et les vecteurs dans 4 sites d'Afrique de l'Ouest. Nous avons mis en évidence une différence de prévalence d'allèles de résistance entre les hommes et les vecteurs, et même entre espèces vectrices. Ces différences peuvent représenter des coûts associés à la résistance ou mettre en lumière le rôle de sentinelle de la résistance des vecteurs pour des allèles de résistance en faible prévalence dans l'homme. Le vecteur est donc un maillon important dans l'étude de l'émergence et la propagation des allèles de résistance aux médicaments et de l'impact des antipaludiques sur la transmission du paludisme.

**Mots-clefs :** antipaludiques, transmission, résistance, vecteur, *Plasmodium falciparum*, *P. relictum*

### **Antimalarial drugs consequences on malaria transmission**

Malaria incidence still is high especially in sub-Saharan Africa. Antimalarial drugs reduce the disease mortality and morbidity but could also impact the parasite's transmission. Current knowledge about the impact of drugs on malaria transmission come mainly from studies quantifying the transmissible blood stages of the parasite (gametocytes) in the vertebrate host.

Our knowledge of how these drugs may impact the vector stages of the parasite is still very limited. In this thesis, I investigated the effects of two main antimalarial drugs, artesunate (AS) and sulfadoxine-pyrimethamine (SP), on parasite transmission through a series of laboratory experiments and field studies.

Our laboratory experiments (with the avian malaria parasite, *Plasmodium relictum*) showed that SP decreases drastically sporozoite prevalence and burden and in infected vectors fed on SP-treated birds. We are currently studying the mechanistic underpinnings of these results by exploring the effect of the drug on the mosquito gut microbiome and transcriptome. Our results suggest that SP could exert a selection pressure not only in treated humans (as has been widely reported) but also in the vector feeding on treated humans. Our experiments didn't show such an effect in mosquitoes fed on an AS-treated bloodmeal. In a separate experiment, where we selected for AS resistance in *P. relictum*, we were able to establish the existence of fitness costs linked to AS-resistance in the vector (lower intensity of infection) but not in the untreated vertebrate host.

We have also compared the prevalence of 3 key drug resistance alleles (in the *pfprt*, *dhfr* and *pfmdr* loci) between humans and vectors infected with the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* across 4 different sites in West Africa. We show allele-dependent differences in prevalence both between humans and vectors, and between vector species. These differences may not only be indicative of the costs of drug resistance being different for vectors and humans but also highlight the potential role of the vectors as sentinels for the detection of drug resistant mutations that are rare in humans. In sum, our results show the importance of investigating the effect of drugs on the vector stages of *Plasmodium* parasites for understanding the emergence and spread of drug resistance mutations on malaria transmission.

**Key-words:** antimalarial drugs, transmission, resistance, vector, *Plasmodium falciparum*, *P. relictum*