HAL
open science

Influence des piqûres de moustiques sur les réponses anticorps spécifiques aux antigènes de Plasmodium falciparum

Kakou Ghislain Aka

To cite this version:

Kakou Ghislain Aka. Influence des piqûres de moustiques sur les réponses anticorps spécifiques aux antigènes de Plasmodium falciparum. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT094 . tel-03635594

HAL Id: tel-03635594

https://theses.hal.science/tel-03635594

Submitted on 8 Apr 2022

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 Biologie Santé

École doctorale CBS2 n°188 – Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche MIVEGEC – Maladies Infectieuses et vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

Titre de la thèse

INFLUENCE DES PIQÛRES DE MOUSTIQUES SUR LES REPONSES ANTICORPS SPECIFIQUES AUX ANTIGENES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Présentée par Kakou Ghislain AKA
Le 13 Décembre 2021

Sous la direction de Vincent CORBEL

Devant le jury composé de

Florence Migot-Nabias, Directrice de Recherche, IRD	Rapportrice
Emmanuel Hermann, Maitre de Conférence, Université de Lille	Rapporteur
Rachel Bras Goncalves, Directrice de Recherche, IRD	Examinatrice
Jean-Pierre Dedet, Professeur Emérite, Université de Montpellier	Examinateur
Ronald Perraut, Directeur de Recherche, Institut Pasteur	Examinateur
Lionel Almeras, Chargé de Recherche	Invité
Anne Poinsignon, Chargée de Recherche, IRD	Invitée
Vincent Corbel, Directeur de Recherche, IRD	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

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

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 n°188 – Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche MIVEGEC – Maladies Infectieuses et vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

Titre de la thèse

INFLUENCE DES PIQÛRES DE MOUSTIQUES SUR LES REPONSES ANTICORPS SPECIFIQUES AUX ANTIGENES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Présentée par Kakou Ghislain AKA
Le 13 Décembre 2021

Sous la direction de Vincent CORBEL

Devant le jury composé de

Florence Migot-Nabias, Directrice de Recherche, IRD	Rapportrice
Emmanuel Hermann, Maitre de Conférence, Université de Lille	Rapporteur
Rachel Bras Goncalves, Directrice de Recherche, IRD	Examinatrice
Jean-Pierre Dedet, Professeur Emérite, Université de Montpellier	Examinateur
Ronald Perraut, Directeur de Recherche, Institut Pasteur	Examinateur
Lionel Almeras, Chargé de Recherche	Invité
Anne Poinsignon, Chargée de Recherche, IRD	Invitée
Vincent Corbel, Directeur de Recherche, IRD	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

En premier lieu, mes remerciements vont à l'endroit :

Du Docteur Anne POINSIGNON, une géniale et superbe encadrante. Je ne saurais, à vrai dire, exprimer suffisamment ma reconnaissance tellement elle est grande et risquerait d'être limitée par mes maigres mots. Merci de m'avoir choisi, fait confiance, guidé et faire profiter de ton expérience en faisant preuve de grandes qualités scientifiques et humaines. Tu as toujours été présente pour moi, et su trouver les mots justes et réconfortant pour m'encourager, me « secouer parfois, mais gentiment » surtout dans ces derniers moments. La larme à l'œil, je suis bien conscient de la chance que j'ai eu à apprendre et à travailler à tes côtés. Merci pour ton amitié et pour les bons moments qu'on a eu a partagé depuis un peu plus de 5 ans maintenant, aussi bien à Bouaké, qu'à Montpellier.

Je voudrais ensuite adresser mes sincères remerciements au Docteur Vincent Corbel, qui a accepté d'être le directeur de cette thèse. Vos conseils avisés aux différents comités de thèses et observations lors de la rédaction des articles soumis m'ont été une grande aide.

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. De vos critiques et suggestions, une meilleure valorisation de cette thèse ne pourra qu'en découler.

Docteur Franck REMOUE, "le formateur des formateurs". Hé oui il a eu l'occasion de former mon encadrante, et aujourd'hui c'est elle qui me forme et encadre. Indirectement j'ai aussi reçu ton encadrement. Ta rigueur scientifique, tes critiques constructives pour la rédaction des articles forcent mon admiration. Merci aussi pour tes précieux conseils et ton oreille attentive. Je t'en suis très reconnaissant.

Ces travaux n'auraient pu être menés sans le concours, le soutien et la compréhension de nombreuses personnes à travers les différents instituts et Laboratoires dans lesquels j'ai été accueilli. Aussi, me plait-il d'adresser mes sincères remerciements :

Au Directeur de l'unité MIVEGEC-IRD de Montpellier, Frédéric SIMARD et à travers lui à toute l'unité, de l'équipe administrative (Katia, Julie, Valérie) à l'ensemble des chercheurs, ingénieurs et techniciens.

Au Responsable de l'équipe ESV, Christophe PAUPY ; à tous les membres de notre équipe IHVEC à Montpellier (Denis BOULANGER, Françoise MATHIEU DAUDE, ZAMBLE bi Hubert). Merci infiniment à tous, pour l'accueil, pour avoir facilité mon intégration et pourvue un cadre idéal qui m'a permis de travailler dans de très bonne condition.

Docteur KABA Dramane, Directeur de l'Institut Pierre Richet. Et à travers lui, à l'ensemble du personnel de cet institut de m'avoir intégré dans leur famille d'"IPRiens" et pour les bons moments partagés à jouer à la pétanque à nos heures de détente.

Docteur Maurice Akré ADJA, pour mon intégration au sein de l'unité Transrisk qu'il dirige. Merci pour vos précieux conseils et apport dans mon encadrement pédagogique. Vous m'avez permis de travailler sur les différents projets dont vous aviez la direction.

Merci au Docteur André SAGNA (My Brother comme je me plais à l'appeler) mon deuxième encadrant dans l'ombre pour son humilité, sa grande disponibilité, ces conseils, orientations et commentaires scientifiques pertinents. Merci aussi pour ces moments de convivialité, de partage et fous rire dans les bons coins de Bouaké et Montpellier où j'ai eu beaucoup de plaisir à être. Que DIEU te garde.

Mes remerciements s'adressent également à François (mon ami et grand-frère) pour son soutien et ses précieux conseils, Mme Sadia (notre maman à tous), Kone Migaborond (tantie Miga), Céline, Danielle, Assouho, Nadia, Didier, Arsène pour tous ces bons moments d'échanges et de partage au laboratoire Transrisk. Merci pour tous nos fous rires et de m'avoir supporté et encouragé tout au long de de ces travaux. On sera toujours ensemble.

Merci à tous les amis étudiants de Montpellier et d'ailleurs : Michelle, Dachèle, Yogom, Dorgeles, Branly, Amadou, Céline Montazeau, Marlène Dupraz, Marie, Manon et à tous les membres du groupe BlackExellence (ils se reconnaîtrons) … j'en n'oubli surement, avec qui j'ai partagé de bons moments d'échange scientifiques pertinent, mais pas que…Il y avait aussi les Afterwork pour décompresser.

Je terminerai en remerciant un ensemble d'individus qui compte au monde pour moi plus que tout, je veux parler des membres de ma famille.

Mon oncle, Docteur Djouka Laurent et sa femme Francine Djouka. Mes plus fervents admirateurs. Vous portez bien les attributs de père et de mère que je porte à votre égard. Vous m'avez recueilli, éduquer, accompagner et soutenue dans cette vie et tout au long de mes études, jusqu'à cette consécration. Je ne serai jamais arrivé jusqu'au bout et traverser toutes ces épreuves sans votre soutien sans faille. Papa, maman, merci d'avoir été toujours été là pour moi et d'avoir fait de moi l'homme que je suis. Je vous dédie cette thèse. Puisse Dieu vous bénir toute la vie.

Maman, merci pour tes prières, pour tes précieux conseils et tes encouragements. Tu t'es toujours battue pour que je ne manque de rien depuis mon jeune âge. Si j'en suis là c'est en partie grâce à toi. Puisse Dieu te garder longtemps parmi nous pour que tu puisses enfin jouir de ces dures années de labeur.

Ma femme Imene, qui m'a soutenue et supportée (surtout ces dernières semaines de rédactions durant lesquelles, j'ai pas été très ….). Merci pour ta compréhension, ta patience et ton attention. Pour les moments qui rendent mon quotidien unique et moins monotone… pour les moments moins agréables aussi, qui en n'en point douter nous forgent et font prendre conscience de la sincérité de nos sentiments.

Enfin j'aimerai terminer ces remerciements en exprimant toutes ma gratitude aux autres membres de ma famille et belles familles pour leurs soutiens et prières.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3

TABLE DES MATIERES 5

LISTE DES ABREVIATIONS 8

Liste des figures 11

Liste des tableaux 12

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS 13

1. Le Paludisme : généralités et épidémiologie dans le monde, en Afrique subsaharienne et en Côte d'Ivoire 13

1.2- Paludisme en Afrique subsaharienne et dans le reste du monde 13
1.3- Paludisme en côte d'Ivoire. 16

2- Paludisme : agents pathogènes, vecteurs et stratégies de lutte 18

2.1- Les plasmodiums humains, agents du paludisme 18
2.1.1 Cycle de développement de *Plasmodium* 20
2.1.1.1- Phase asexuée chez l'homme 20
2.1.1.2- Phase sexuée chez les moustiques femelles *Anopheles* 21
2.2- *Anopheles gambiae*, principal vecteur en Afrique subsaharienne 22
2.2.1-Position systématique des anophèles 22
2.2.2- Les complexes *Anopheles* 24
2.3-Physiopathologie du paludisme : symptomatologie, diagnostic et traitements des infections à *P. falciparum* chez l'homme 26
2.3.1- Symptomatologie du paludisme. 26
2.3.2- Diagnostic 27
2.3.2.1- Les techniques de diagnostic standard 27
2.3.2.2- Les techniques de laboratoire 28
2.3.3- Traitements 30
2.4- Stratégies de prévention de la transmission et de l'infection 32
2.4.1- Réduction des populations d'*Anopheles* et du contact homme-vecteur : lutte antivectorielle ... 32
2.4.1.1-La pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide 32
2.4.1.2- Les moustiquaires imprégnées d'insecticide 32
2.4.1.3-Nouvelles méthodes de lutte antivectorielle 34
2.4.2- La lutte contre le parasite *Plasmodium falciparum* 37
2.4.3- Stratégies vaccinales : Candidats vaccins, avancées et difficultés dans le développement d'un vaccin efficace 38
2.4.3.1-Vaccin contre les stades pré-érythrocytaires de *P. falciparum* 40
2.4.3.2-Vaccins contre les stades sanguins de *P. falciparum* 43
2.4.3.3-Vaccin contre les stades sexués de *P. falciparum* 48
2.4.4- Concepte de lutte intégrée 49

3- Réponses immunes anti-*Plasmodium falciparum* 51

3.1 Réponse innée 51
3.2- Réponse cellulaire 55
3.3- Réponse humorale et immunité de prémunition 58
3.4 Facteurs de variation de l'immunité anti *Plasmodium* 63
3.4.1 Facteurs intrinsèques 63

3.4.1.1 Facteurs liés à l'hôte 63
3.4.1.2. Facteurs parasitaires 66
3.4.2 Facteurs extrinsèques 69

4- Piqûres de moustiques et réponses immunes de l'homme : implications de la salive dans la transmission du paludisme 71

4.1- Propriétés pharmacologiques et rôles des protéines salivaires 71
4.1.1 Rôle pharmacologique de la salive des arthropodes 72
4.1.1.1 Inhibition de l'agrégation plaquettaire 72
4.1.1.2 Inhibition de la coagulation sanguine 73
4.1.1.3 Rôle vasodilatateur des protéines salivaires 74
4.2 Propriétés immunologiques de la salive : modulation du système immunitaire de l'homme par la salive 75
4.3. Salive des insectes vecteurs, transmission des pathogènes et développement de l'infection chez l'hôte vertébré 78
4.4 Composants salivaires des arthropodes comme antigènes vaccinaux 82
4.5 Modulation de la réponse immune anti pathogène de l'homme par la salive 84
4.6 Réponses anticorps spécifiques aux protéines salivaires 86
4.7 Réponses humorales anti-salive comme biomarqueur d'exposition aux piqûres : Nouvel outil immunologique pour évaluer le contact hôtes-vecteurs 87
4.8. Peptides salivaires marqueurs immunologiques d'exposition aux piqûres de moustiques 89

DEUXIEME PARTIE 95

OBJECTIFS ET CADRE DE TRAVAIL DE LA THÈSE 95

1. Objectifs 96

1.1 Objectif Général 96
1.2 Objectifs spécifiques 96

2. Cadre de travail de la thèse et Financement 96

3. Financements 100

TROISIEME PARTIE 101

RESULTATS 101

Chapitre I : Influence de l'exposition des moustiques *Anopheles* sur la réponse anticorps anti-*Plasmodium falciparum* : analyse transversale. 102

Pattern of antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens in individuals differentially exposed to *Anopheles* bites 102

Chapitre 2 : Influence de l'exposition aux moustiques *Anopheles* et *Aedes* sur la dynamique de la réponse anticorps anti-*Plasmodium* : analyse longitudinale. 115

Influence of Host-Related Factors and Exposure to Mosquito Bites on the Dynamics of Antibody Response to *Plasmodium falciparum* Antigens 116

QUATRIEME PARTIE : Discussion générale, conclusion et perspectives 135

1. Réponses Ac IgG anti- anti-peptide salivaire comme biomarqueurs d'exposition individuelle aux piqûres de moustiques et pertinence de leur utilisation 136
2. Influence de l'exposition aux piqûres de moustiques sur la réponse Ac anti-*Plasmodium* naturellement acquise 139
2.1 Influence de l'exposition aux piqûres des *Anopheles* sur les profils de la réponse anticorps anti-*P. falciparum* 140

2.2 L'exposition aux autres insectes hématophages modulerait-elle la réponse anti-*Plasmodium* ? 143
2.3 Influence de l'exposition aux piqûres de moustique et d'autres facteurs sur la dynamique de la réponse anticorps anti-*Plasmodium falciparum* acquise après une infection. 144
3. Implication des résultats dans la lutte contre le paludisme 146

CONCLUSION GENERALE 150

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 151

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	: Anticorps
AcII	: Anticorps secondaire
ACT	: Artemisinin-based Combination Therapy
ADCC	: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCI	: Antibody Dependent Cellular Inhibition
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADP	: Adénosine Di Phosphate
Ag	: Antigène
AMA-1	: Apical Membrane Antigen 1
AMP	: Adénosine Mono Phosphate
ATBS	: Appât Toxique attractif à Base de Sucre
ATP	: Adénosine Tri Phosphate
BMI	: Bâche Murale Imprégnée d'insecticide
CD	: Cellule Dendritique
CHIKV	: Chikungunya Virus
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNER	: Comité National d'Ethique pour la Recherche
CPA	: Cellule Présentatrice d'Antigènes
CSH	: Capture Sur Homme
CSP	: CircumSporozoite Protein
DDT	: Dicloro-Diphenyl-Trichloroéthane
DI, II, III	: Domaine I, II, III
DP	: Densité Parasitaire
EBA	: Erythrocyte Binding Antigen
EIR	: Entomological Innoculation Rate
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Eshz	: Schizonte Extract
G6PD	: Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
GE	: Goutte Epaisse
GLURP	: GLUtamate Rich Protein
GPI	: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

gSG6	: gambiae Salivary Gland 6
gSG6-P1	: gambiae Salivary Gland 6-Peptide 1
Hb	: Hemoglobin
HHV	: Human Herpes Virus
HHV8	: Human Herpes Virus 8
HRP2	: Histidin Rich Protein 2
IC	: Intervalle de Confiance
IFN-γ	: Interferon γ
Ig	: Immunoglobuline
IGR	: Insect Growth Regulators
IL	: Interleukine
IP	: Indice Plasmodique
kDa	: kilo Dalton
LAMP	: Loop-mediated isothermal Amplification
LAV	: Lutte Anti Vectorielle
LDH	: lactate deshydrogénase
LSA	: Liver Stage Antigen
LT	: Lymphocyte T
MAX	: Maxadilan
MBC	: Memory B cell
MII	: Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MILDA	: Moustiquaire Imprégnée d'insecticide à Longue Durée d'Action
MSP	: Merozoite Surface Protein
MSP-1	: Merozoite Surface Protein 1
MSP3	: Merozoite Surface Protein 3,
NIH	: National Institute of Health
NK	: Natural Killer
NO	: Nitric Oxyde
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
P.	: Plasmodium
PBMC	: Cellules Mononucléées du Sang Péripherique
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction

PfEMP1	: *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1
PHN	: Piqûres/Homme/Nuit
PID	: Pulvérisation Intra Domiciliaire
PiHan	: Piqûres infectantes/Homme/an
PNLP	: Programme National de la Lutte contre le Paludisme
qPCR	: quantitative Polymerase Chain Reaction
SP	: Sulfadoxine-Pyriméthamine
TDR	: Test de Diagnostic Rapide
Th	: T helper
TIE	: Taux d'Inoculation Entomologique
TIS	: Technique d'Insecte Stérile
TMB	: Tétra méthyle benzydine
TNF-γ	: Tumor necrosis Factor γ
TNFα/β	: Tumor Necrosis Factor α/β
TPI	: Traitement Préventif Intermittent
TXAE	: Thromboxane A2
VPE	: Vaccin Pré-Erythrocytaire
VSA	: Variant Surface Antigen
WHO	: World Health Organization

Liste des figures

Figure 1: Pays où la transmission du paludisme est active d'après l'OMS en 2019 15

Figure 2: Distribution spatiale mondiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2019 chez les 2-10 ans 15

Figure 3: Distribution spatiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2019 en Côte d'Ivoire 17

Figure 4: Répartition géographique des espèces de *Plasmodium* 20

Figure 5: Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* 22

Figure 6: Répartition géographique des vecteurs majeurs du paludisme 23

Figure 7: *An. gambiae* et *An. funestus* lors d'une prise de repas sanguin 25

Figure 8: Distribution de la résistance aux molécules antipaludiques dans le monde 31

Figure 9: Représentation simplifiée de l'approche Eave Tube (a) ; Maison avec insert EaveTube(b) 35

Figure 10: Candidats vaccins contre le paludisme en cours d'essais cliniques. 40

Figure 11: Représentation schématique de l'antigène AMA-1 de *P. falciparum* 45

Figure 12: Représentation schématique de la protéine MSP-1 de P. falciparum adapté de 46

Figure 13: Représentation schématique GMZ2 de *P. falciparum* 48

Figure 14: Mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale dirigée contre les stades érythrocytaires. 59

Figure 15: Effets des protéines salivaires des arthropodes vecteurs sur la réaction hémostatique de l'homme 74

Figure 16: Mécanismes de modulation de la réponse immune des vertébrés par des protéines salivaires des arthropodes 75

Figure 17: séquences des protéines gSG6 de *Anopheles* 89

Figure 18: Représentation schématique des 5 peptides de la protéine gSG6 d'*An. gambiae* 90

Figure 19: site d'étude du projet JEAI-EvaPalCI 98

Liste des tableaux

Tableau 1: rôle de la salive de différents vecteurs au cours de l'infection 81

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS

1. Le Paludisme : généralités et épidémiologie dans le monde, en Afrique subsaharienne et en Côte d'Ivoire

Le paludisme ou malaria est une parasitose due à la présence dans le sang d'un parasite du genre *Plasmodium*. Autrefois attribuée à la présence d'un poison des marais transmis par des moustiques qui inoculeraient « les mauvaises humeurs dans le sang », ce n'est qu'en 1881 que Alphonse Laveran démontrait la nature parasitaire de la maladie en détectant « des éléments pigmentés dans les globules rouges des malades atteints de fièvres palustres, qui se présentent sous forme de croissant, de sphère, de flagelle». Il appela ces protozoaires parasites *Oscillaria malariae* (1881). Il introduisit le terme paludisme en 1893 en se référant à l'étymologie latine du mot "Palud" qui signifie marais. Entre 1895 et 1898, Ronald Ross bactériologiste britannique montra que ces parasites plasmodiums sont transmis par les moustiques femelles.

1.2- Paludisme en Afrique subsaharienne et dans le reste du monde

Le paludisme constitue la première des endémies pour lesquelles l'humanité paye un lourd tribut. Près de 102 pays sont exposés à cette maladie (**Figure 1**).

Les derniers chiffres du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2020 sont toujours aussi alarmants. On estime à 229 millions le nombre de cas en 2019, et le nombre estimé de décès s'élevait à 409 000. Les enfants de moins de 5 ans constituent le groupe le plus vulnérable représentant ainsi environ deux tiers de tous les décès dus au paludisme dans le monde.

La Région Afrique de l'OMS porte une part disproportionnée du fardeau mondial. En 2019, la région abritait 94 % des cas et des décès. Dix-neuf pays d'Afrique subsaharienne concentrent près de la totalité des cas dans le monde. Six pays, à eux seuls, ont enregistré plus de la moitié des décès : le Nigéria (27%), la République démocratique du Congo (12%), l'Ouganda (5%), ainsi que la Côte d'Ivoire, le Mozambique et le Niger (4% chacun). Dans cette partie de l'Afrique, le paludisme représente environ 40% des dépenses de santé publique et 10% des dépenses annuelles des ménages (WHO, 2020). *Plasmodium (P.) falciparum* est le parasite du paludisme le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS ; il est en effet à l'origine de 99,7% des cas de paludisme estimés en 2019, tout comme dans les régions Asie du Sud-Est (50%), Méditerranée orientale (71%) et Pacifique occidental (65%) **(Figure 2).**

Cependant, l'incidence du paludisme dans le monde a reculé entre 2010 et 2018, passant de 71 cas pour 1000 habitants exposés au risque de paludisme à 57 pour 1000 en 2014. Cette baisse a considérablement ralenti entre 2014 et 2018, l'incidence ayant diminué à 57 pour 1000 en 2014 pour rester à un niveau similaire jusqu'en 2018.

Comme les années précédentes, la région africaine a supporté plus de 90 % de la charge de morbidité totale. Depuis 2000, le nombre de décès dus au paludisme dans la Région a diminué de 44 %, passant de 680 000 à 384 000 par an, selon les estimations. Toutefois, les progrès ont ralenti ces dernières années, en particulier dans les pays où la charge de morbidité est élevée.

Dans la région Asie du Sud-Est de l'OMS, l'incidence du paludisme continue à baisser, de 17 cas pour 1000 habitants exposés au risque de paludisme en 2010 à 5 pour 1 000 en 2018 (soit une baisse de 70%). De même, l'incidence du paludisme a diminué dans la région Afrique de l'OMS, avec 294 cas pour 1000 en 2010 contre 229 en 2018 (-22%). Toutes les autres régions de l'OMS ont enregistré des progrès très modestes, voire une hausse de l'incidence. Dans la région Amériques de l'OMS, l'incidence du paludisme a augmenté, principalement à cause d'une transmission accrue au Venezuela.

Aussi 27 pays ont signalé moins de 100 cas autochtones de la maladie en 2019, contre 6 pays en 2000 **(Figure 1).**

Les sommes consacrées au paludisme pour la recherche-développement et surtout pour la prévention ont permis des progrès considérables notamment dans l'accessibilité aux moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) au cours des vingt dernières années.

On estime qu'en 2019, 68 % des ménages d'Afrique subsaharienne étaient en possession d'une MII. Cependant les programmes de pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides (PID) à effet rémanent qui ont connu un développement très important en Afrique subsaharienne jusqu'à la fin de la dernière décennie, a vu un recul de 5%.

En Afrique, où surviennent la plus grande majorité des cas des infections à *P. falciparum*, l'objectif est de contrôler le paludisme par des approches intégrées combinant le diagnostic, un traitement efficace et précoce, la lutte anti vectorielle et la chimioprophylaxie (notamment par le traitement préventif intermittent (TPI) des enfants et des femmes enceintes.

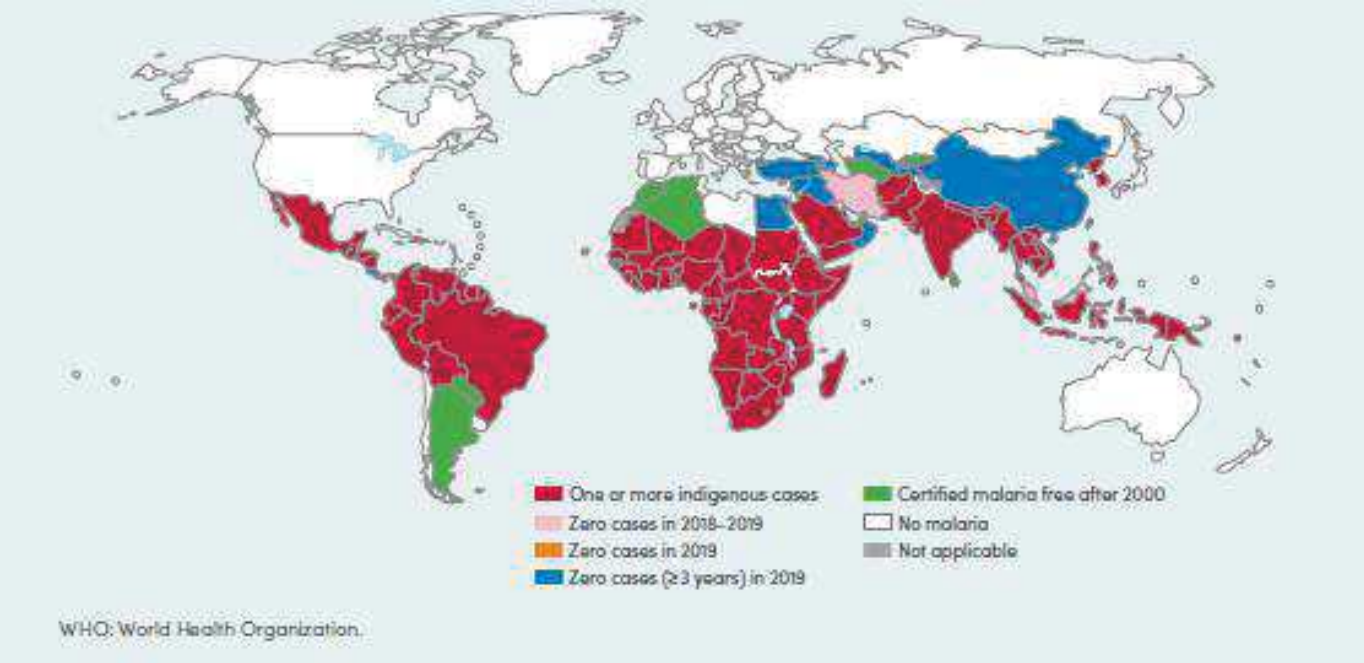


Figure 1: Pays où la transmission du paludisme est active d'après l'OMS en 2019

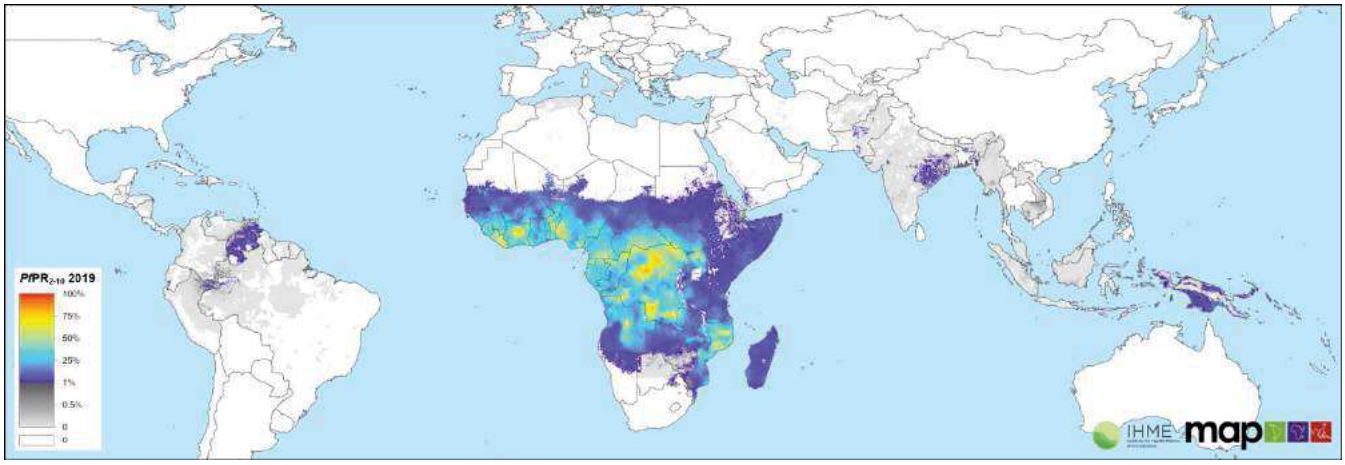


Figure 2: Distribution spatiale mondiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2019 chez les 2-10 ans

Source : https://malariaatlas.org/trends/region/MAP/GLOBAL consulté en Juillet 2021

1.3- Paludisme en côte d'Ivoire.

En Côte d'Ivoire, la situation est tout aussi préoccupante bien qu'on ait recensé une nette amélioration par rapport à la décennie précédente. Le paludisme constitue la première cause de mortalité et de morbidité, d'hospitalisation et de consultation clinique dans les services pédiatriques régionaux ; soit 10% de toutes les causes de mortalité (PNLP, 2018). En 2018, on estimait à près de 3,5 millions (soit près de la moitié des cas par rapport à 2008), le nombre de cas de paludisme, soit 4% de tous les cas signalés en Afrique (WHO, 2020). Les statistiques du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) indiquent que dans les formations sanitaires locales, environ 33% des motifs de consultation sont liés au paludisme. La maladie sévit sur toute l'étendue du territoire ; il s'agit d'un paludisme stable avec recrudescence en saison des pluies. Les études épidémiologiques sur le paludisme ont montré des indices plasmodiques très élevés (45 à 98 %), et l'implication de trois espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale* (Nzeyimana et al., 2002; Henry et al., 2003; Coulibaly et al., 2016; Toure et al., 2018). La dominance de *P. falciparum* fut signalée sur toute l'étendue du territoire à plus de 95 % (**Figure 3**). Les études sur la transmission ont montré que le paludisme est transmis par trois espèces vectorielles : *An. gambiae s.s.*, *An. funestus s.s.* et *An. nili s.s.* (Adja et al., 2006; Koudou et al., 2007; Koffi et al., 2013; Assouho et al., 2020). Sur toute l'étendue du territoire, *An. gambiae s.s.* est observé, et représente souvent la seule espèce vectrice. *An. funestus s.s.* et *An. nili s.s.* sont plus localisés, avec une aire de répartition plus restreinte pour *An. nili s.s.*.

En milieu urbain, le paludisme a une prévalence de 30 à 40% (Dossou-Yovo et al., 1998; Koudou et al., 2009). En milieu rural, le paludisme constitue la première cause de morbidité et sa prévalence varie entre 60 et 80% (Dossou-Yovo et al., 1998; Koudou et al., 2007). Le paludisme constitue également la cause d'absentéisme scolaire et sur les périmètres agricoles.

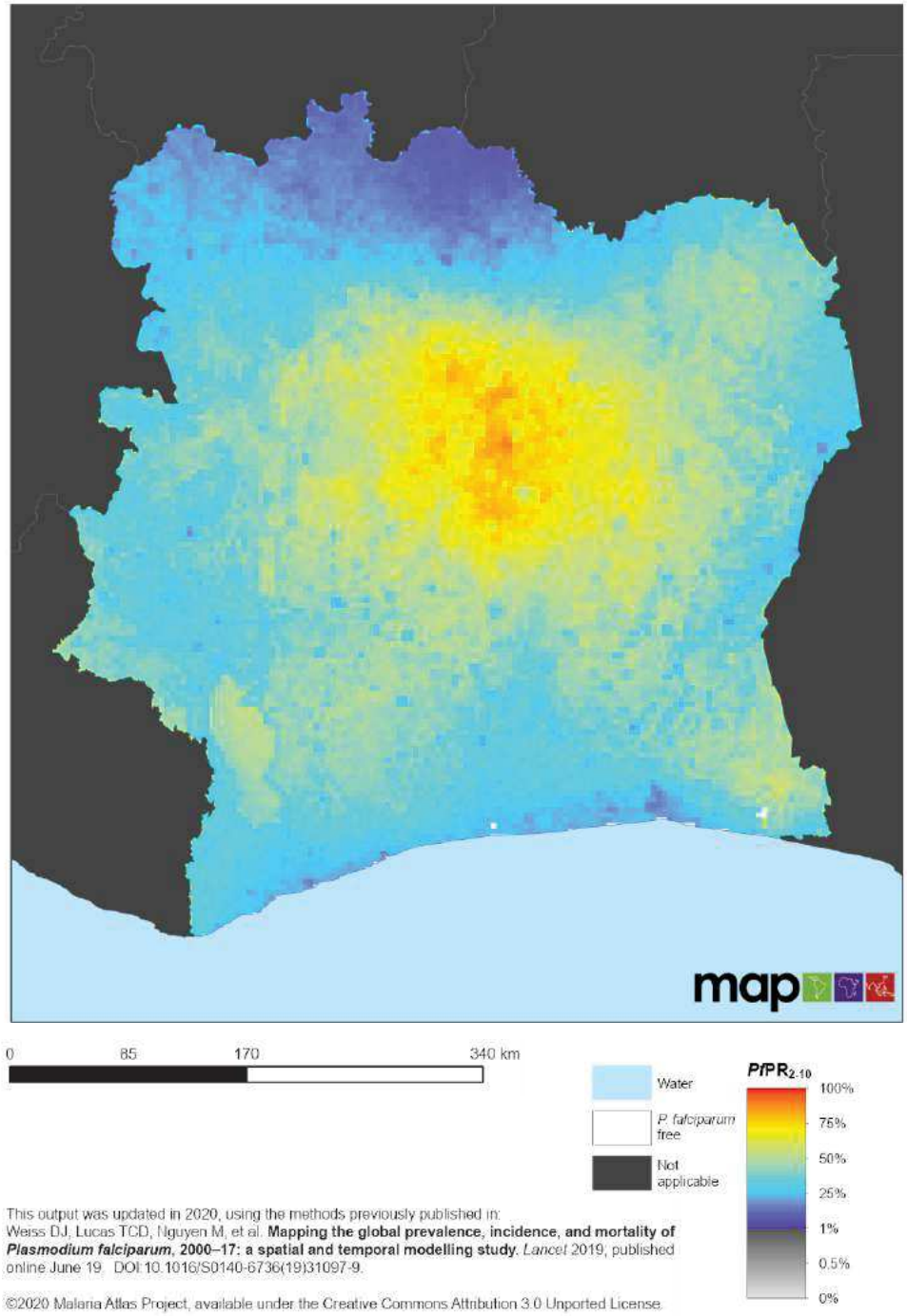


Figure 3: Distribution spatiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2019 en Côte d'Ivoire

Source : https://malariaatlas.org/trends/country/CIV *consulté en Juillet 2021*

2- Paludisme : agents pathogènes, vecteurs et stratégies de lutte

2.1- Les plasmodiums humains, agents du paludisme

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire appartenant au genre des *Plasmodium*. Ce genre regroupe environ une centaine d'espèces parasitant batraciens, reptiles, oiseaux ou mammifères (Antinori et al., 2012). Cinq espèces de *Plasmodium* peuvent infecter l'homme, *P. falciparum*, *P. malariae, P. vivax*, *P. ovale et P. knowlesi*. Ces cinq espèces sont biologiquement distincts et possèdent une répartitions géographique différentes (**Figure 4).**

- *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue en Afrique tropicale. On la rencontre chez 80 à 90 % des sujets infectés. Ce parasite est responsable des formes cliniques graves du paludisme. Il est à l'origine des formes cérébrales et d'anémies sévères, souvent mortelles. Les complications pendant la grossesse et le faible poids des nouveau-nés des femmes primipares, sont souvent associés à cette espèce plasmodiale (Mouchet et al., 2004).

- *P. malariae* est relativement moins dangereux (Collins & Jeffery, 2007). Il peut néanmoins être responsable de certains cas d'insuffisance rénale. On le rencontre en Afrique subsaharienne, dans une grande partie de l'Asie du Sud-Est, en Indonésie, dans de nombreuses îles du Pacifique occidental et dans les régions du bassin amazonien d'Amérique du Sud (Sutherland, 2016; Rutledge et al., 2017)

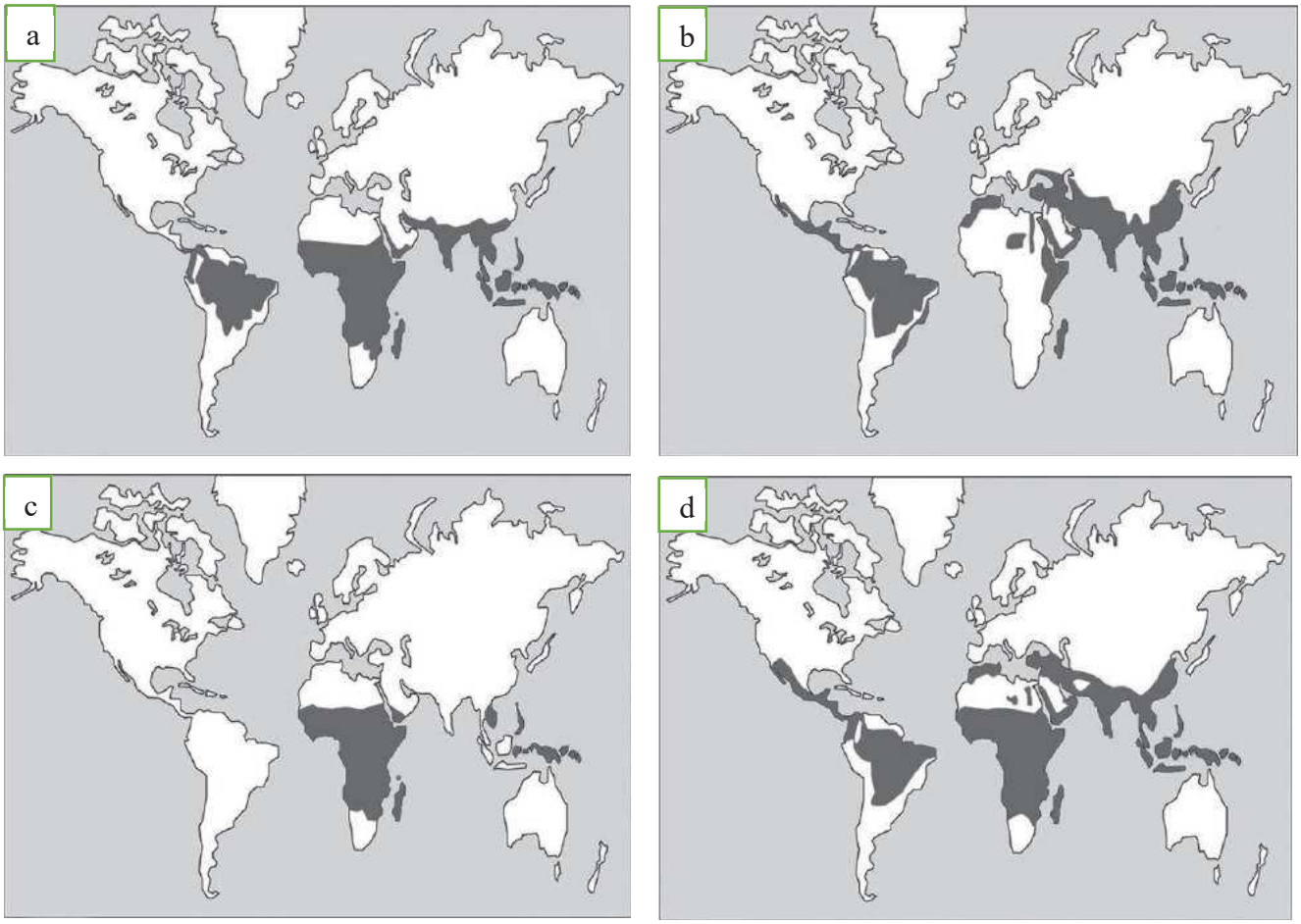
Cette espèce peut persister pendant longtemps dans le sang circulant avec un record de 40 ans à 70 ans (Vinetz et al., 1998). Elle est souvent associée à *P. falciparum,* ce qui rend difficile l'étude de sa pathogénicité propre.

- *P. vivax*, est très rare en Afrique , mais à une répartition plus étendue en Asie, en Amérique centrale et du Sud (Howes et al., 2015) (**Figure 4**). Cette espèce a des stades de dormance ("hypnozoïtes") qui persistent dans le foie et provoquent des rechutes en envahissant la circulation sanguine au bout de quelque semaines voir des années plus tard après la piqûre de moustique infecté (White & Imwong, 2012). Dans certains cas, des « hot spots » de transmission à *P. vivax* peuvent persister pendant des années avec un risque de résurgence important (Iwagami et al., 2013; Kaneko et al., 2014). La principale raison est l'incapacité à assurer une guérison, efficace et acceptable des personnes considérées comme réservoir des formes hypnozoïtes en raison du risque d'hémolyse induite par la primaquine (seul médicament actuellement disponible pour éliminer les formes hypnozoïtes) chez les patients déficients en glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Baird et al., 2012).

- *P. ovale*, se retrouve essentiellement en Afrique et dans les îles d'Asie pacifique (**Figure 4**). *P. ovale* est biologiquement et morphologiquement similaire à *Plasmodium vivax*. Cette espèce possède également des stades hépatiques latents et peut infecter les individus qui sont négatifs pour le groupe sanguin Duffy contrairement à *P. vivax* (Collins & Jeffery, 2005)

- *P. knowlesi* est proche génétiquement de *P. vivax*, et microscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert ces dernières années chez l'Homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe) (Cox-Singh, 2018)(**Figure 4**). Toutefois il est responsable de cas de paludisme grave chez l'homme en Indonésie, aux Philippines, au Cambodge, en Thaïlande du Sud, au Myanmar du Sud et au Vietnam (Fornace et al., 2019; Singh & Daneshvar, 2013; Moyes et al., 2014)

D'autres espèces, *P. cynomolgi* et *P. simium*, qui infecte généralement les singes et dans de très rares cas des hommes, partagent d'importantes caractéristiques biologiques avec *P. vivax* (Camargos Costa et al., 2015; Sutton et al., 2016). *P. cynomolgi* a été découvert chez l'homme en Malaisie (Ta et al., 2014).



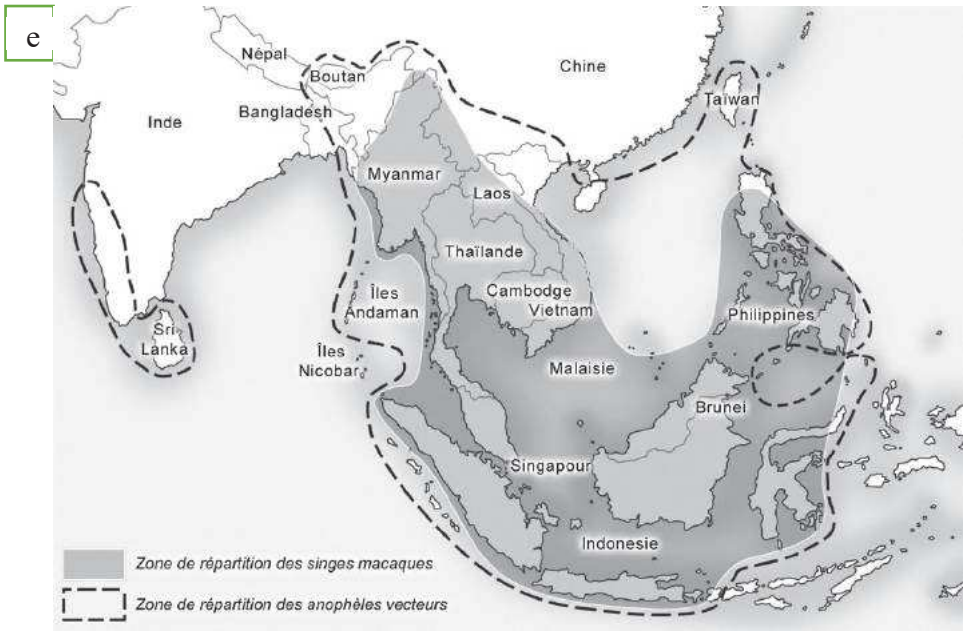


Figure 4: Répartition géographique des espèces de *Plasmodium*
a :P.falciparum ; b :P.vivax; c: P.ovale; d: P. malariae ; e : *P. knowlesi*
(UMVF, 2016)

Le cycle de développement de tous les *Plasmodium* humains se déroule chez deux hôtes successifs. Il se décompose en une phase sexuée chez les moustiques du genre *Anopheles* (hôte définitif et vecteur du paludisme) et en une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire) où il provoque le paludisme.

2.1.1 Cycle de développement de *Plasmodium*

2.1.1.1- Phase asexuée chez l'homme

Le cycle asexué comporte deux phases : une phase hépatique et une phase sanguine (**Figure 5**). Au cours d'une piqûre, le moustique femelle dont les glandes salivaires sont infestées pique l'homme et lui injecte dans le derme, les parasites sous forme de sporozoïtes en même temps que de la salive. Ces derniers sont soit détruits par les macrophages du derme, soit drainés dans les ganglions lymphatiques (Ménard et al., 2013). Très peu atteignent les capillaires sanguins. Une fois dans la circulation sanguine, ces sporozoïtes migrent jusqu'au foie où ils vont se loger dans les hépatocytes. A l'intérieur de ces cellules, les sporozoïtes s'arrondissent et donnent des trophozoïtes hépatiques lesquels se divisent plusieurs fois pour

donner un schizonte hépatique contenant plusieurs mérozoïtes. Ces derniers sont libérés par éclatement du schizonte et gagnent la circulation sanguine. Chaque schizonte libère environ 40000 mérozoïtes pour *P. falciparum,* 15000 pour *P. ovale*, 10000 pour *P. vivax* et 2000 pour *P. malariae* (Mouchet et al., 2004). Pour une partie des sporozoïtes injectés, une étude chez les rongeurs a révélé qu'ils étaient capable de se développer dans la peau et de se différencier en mérozoïtes (Gueirard et al., 2010).

Certains trophozoïtes qui restent sous forme dormante (hypnozoïtes) sont responsables des rechutes tardives du malade qui peuvent survenir jusqu'à 4 ans après l'infection (*P. vivax* et à *P. ovale*). Cette phase hépatique ou exo-érythrocytaire ou pré-érythrocytaire du cycle asexué dure 8 à 10 jours.

Les mérozoïtes gagnent le courant sanguin et parasitent les hématies. Ils deviennent des trophozoïtes sanguins. Après multiplication des parasites, ces derniers forment des schizontes érythrocytaires ou corps en rosace dont chacun comporte 16 à 32 noyaux-fils. A maturité, les hématies parasitées éclatent et libèrent les mérozoïtes, ce qui provoque chez le malade les symptômes cliniques tels que, le froid et la fièvre, fatigue et céphalées. Les mérozoïtes parasitent d'autres hématies saines. On parle de crises épisodiques. Les mérozoïtes, après plusieurs cycles asexués, se transforment en gamétocytes mâles et femelles. C'est la phase sanguine ou érythrocytaire.

2.1.1.2- Phase sexuée chez les moustiques femelles *Anopheles*

L'infestation d'un anophèle femelle commence lors d'un repas sanguin pris sur un hôte parasité porteur de gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes mâles subissent le processus d'exflagellation ou microgamétocytogénèse pour donner les microgamètes tandis que les gamétocytes femelles évoluent en macrogamètes ou ovules. La fécondation ou conjugaison des macrogamètes par les microgamètes donne un œuf mobile, l'ookinète qui, traverse l'épithélium stomacal. Ce passage se fait par la voie intercellulaire. Les ookinètes s'immobilisent entre la couche cellulaire épithéliale et la basale puis pénètrent dans la cavité générale et se transforment en oocystes. L'oocyste, par le processus d'oocystogénèse, donne des sporocystes à l'intérieur desquels s'individualisent de nombreux sporozoïtes. Les sporocystes éclatent à maturité et libèrent les sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires du moustique qui devient infestant ; c'est le cycle sporogonique du parasite.

Une seule glande salivaire d'un anophèle infesté peut héberger en moyenne 2000 à 4000 sporozoïtes (Mouchet et al., 2004).

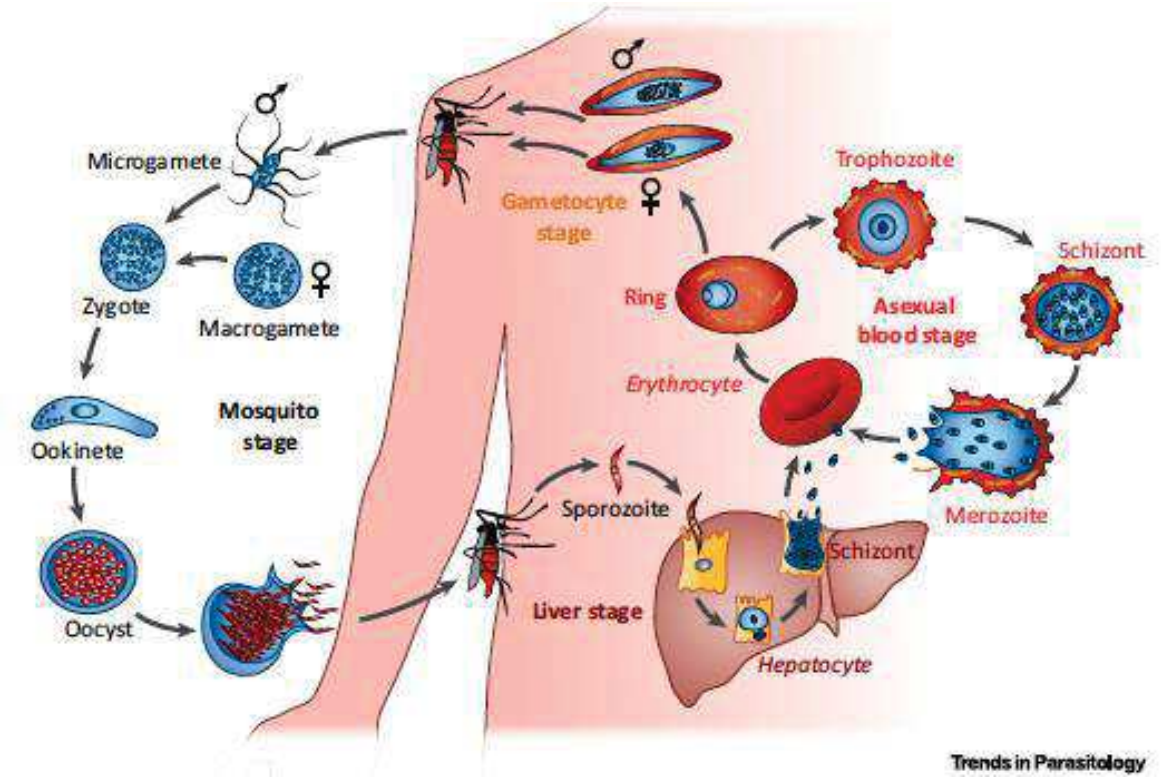


Figure 5: Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*
(Maier et al., 2019)

2.2- *Anopheles gambiae*, principal vecteur en Afrique subsaharienne

2.2.1-Position systématique des anophèles

Les moustiques *Anopheles* sont des Arthropodes de la classe des Insectes. Ils appartiennent à l'ordre des Diptères, à la famille des *Culicidae*, et à la sous-famille des *Anophelinae*. Cette sous-famille regroupe trois genres : *Bironella*, *Chagasia* et *Anopheles*. Les deux premiers ne sont pas médicalement importants. Le genre *Anopheles* comprend 469 espèces formellement reconnues. Environ 70 de ces espèces sont capables de transmettre les parasites du paludisme chez l'homme et 41 sont considérées comme des espèces vectrices dominantes, capables de transmettre les *Plasmodiums* à un niveau préoccupant pour la santé publique (**Figure 6**) (Sinka et al., 2012) . Les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et celles des groupes *Anopheles funestus* et *Anopheles nili* appartiennent respectivement aux séries *Pyretophorus*, *Myzomyia* et *Neomyzomyia* (Gillies & De Meillon, 1968; Gillies & Coetzee, 1987).

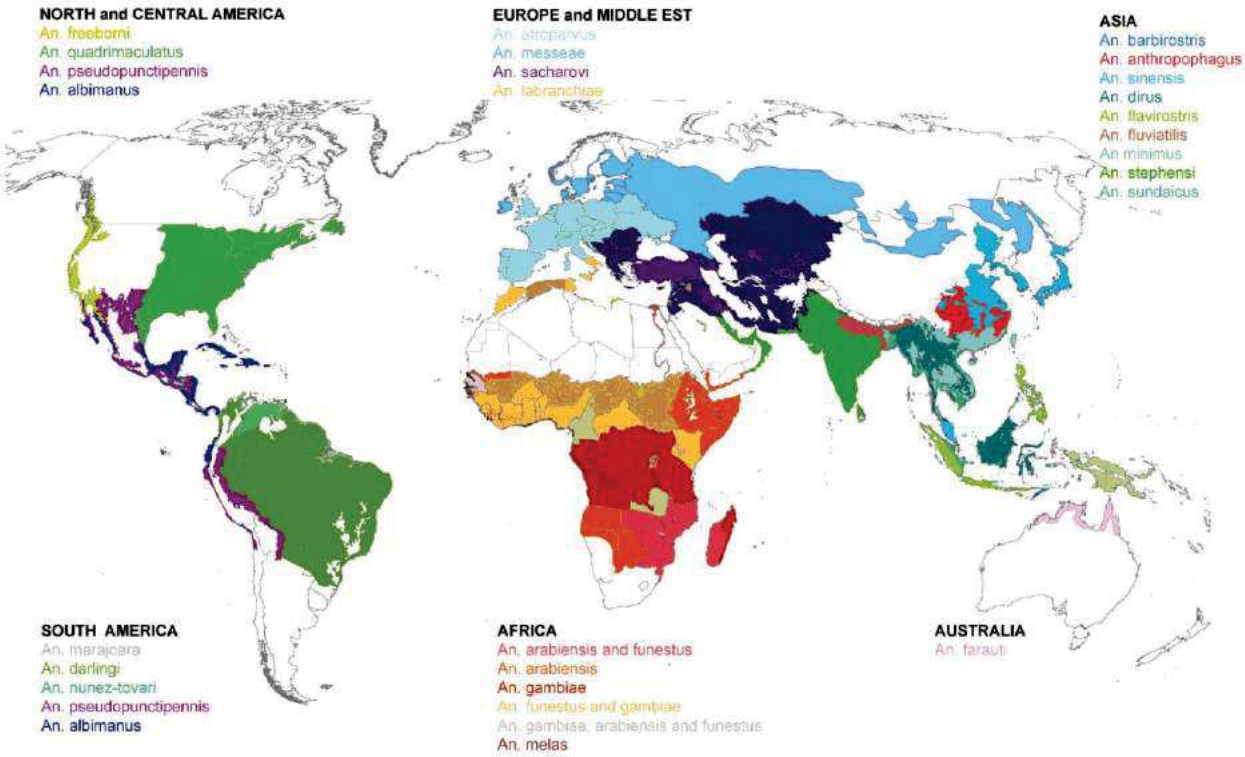


Figure 6: Répartition géographique des vecteurs majeurs du paludisme (Rossati et al., 2016)

Pour qu'un anophèle puisse être considéré comme vecteur potentiel du paludisme, il lui faut :

i) être compatible génétiquement avec le parasite (compétence vectorielle),

ii) avoir une longévité au moins égale au cycle extrinsèque du parasite, pour atteindre l'âge épidémiologiquement dangereux, et

iii) être anthropophile. Une anthropophilie stricte constitue la situation la plus favorable, car les espèces à régime mixte (homme/animal) diminuent leurs chances de s'infecter puis de transmettre les parasites en changeant de sources d'alimentation.

En Afrique sub-saharienne, les vecteurs du paludisme appartiennent à une douzaine d'espèces avec une compétence vectorielle très variable. Ainsi, Hamon et Mouchet (1961) ont proposé de distinguer trois grandes catégories de vecteurs :

- les vecteurs majeurs du paludisme, qui ont une large répartition géographique, une grande capacité vectorielle et des indices sporozoïtiques supérieurs à 1 %. Ces espèces sont

capables de maintenir, à elles seules, l'endémicité palustre. Ce sont les espèces *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* (Mouchet et al., 2004).

- les vecteurs majeurs, mais d'importance locale, qui assurent une transmission importante, mais qui ont une aire de distribution très limitée. Dans ce groupe, on retrouve *An. nili s.s.* et *An. moucheti* qui apparaissent comme des vecteurs majeurs dans certaines zones rurales forestières situées le long des cours d'eau en Afrique occidentale, équatoriale et centrale (Hamon & Mouchet, 1961; Fontenille et al., 2003; Adja et al., 2006).
- les vecteurs secondaires, qui ne jouent qu'un rôle infime dans la transmission du paludisme, l'essentiel de celle-ci étant assuré par les vecteurs majeurs. Ces vecteurs ont, généralement, un indice sporozoïtique faible (inférieur à 0,1 %). Dans cette catégorie, on classe les espèces comme *An. melas*, *An. merus*, *An. pharoensis*, *An. coustani*, *An. paludis*.

2.2.2- Les complexes *Anopheles*

Les anophèles du complexe *An. gambiae* sont les plus répandus et ceux qui assurent la plus grande partie de la transmission du paludisme en Afrique. Ce complexe est constitué de 8 espèces d'importance épidémiologique très variable (Fontenille et al., 2003; Coetzee et al., 2013). Dans la région ouest-africaine, seules les espèces *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. melas* ont été reportées (Mouchet & Carnevale, 1991). En Côte d'Ivoire, les seules espèces qui ont été identifiées sont *An. gambiae s.p* . et *An. melas*.

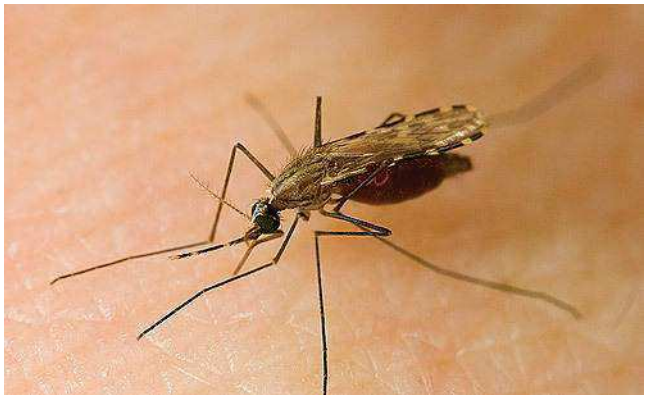
An. gambiae s.s. (**Figure 7**) a la plus grande aire de répartition dans la région Afrotropicale, à l'exclusion de la corne de l'Afrique et de la péninsule arabe (Gillies & Coetzee, 1987). La présence d'inversions chromosomiques polymorphes a permis de diviser cette espèce en cinq formes chromosomiques Forêt, Bamako, Savane, Mopti, et Bissau en Afrique de l'Ouest (Coluzzi et al., 1985). Sur le plan moléculaire, cette espèce a été divisée en deux formes moléculaires, qui dans certaines régions coïncident avec les formes Mopti, Forêt, Bamako et/ou Savane (della Torre et al., 2001). En Côte d'Ivoire, *An. gambiae s.s.* est présent sur toute l'étendue du territoire (Koffi et al., 2013; Camara et al., 2018; Assouho et al., 2020). Au sein de ces populations de *An. gambiae s.s.*, on retrouve les formes moléculaires *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson, *sp* et *An. gambiae* Giles (Coetzee et al., 2013).

An. melas étend son aire de répartition sur la côte ouest-africaine, depuis l'embouchure du fleuve Sénégal jusqu'au Golfe de Guinée. En Côte d'Ivoire, son rôle vecteur a été confirmé dans la zone du littoral.

Le complexe *Anopheles funestus* (**Figure 7**) se compose de neuf espèces : *An. funestus, An. leesoni* Evans, 1931, *An. fuscivenosus* Leeson, 1930, *An. rivulorum* Leeson, 1935, *An. confusus* Evans et Leeson, 1935 et *An. brucei* Service, 1960. *An. funestus* forme, lui-même, un sous-groupe composé de quatre espèces identifiables par de petites différences morphologiques chez les adultes. À l'exception d'*An. funestus s.s.*, les différentes espèces du groupe sont toutes zoophiles. Cependant, *An. rivulorum* a été trouvé infecté par *P. falciparum* en Tanzanie (Wilkes et al., 1996). *An. funestus s.s.* est un excellent vecteur, à capacité vectorielle élevée, qui occupe pratiquement toute l'Afrique tropicale, sauf les parties sèches du nord, du sud et de l'est du continent. En Afrique de l'Ouest, il est associé, avec *An. gambiae s.s.*, à des paludismes stables. En Côte d'Ivoire, *An. funestus s.s.*, présent sur tout le territoire, est un vecteur majeur de la transmission du paludisme (Koudou et al., 2005; Adja et al., 2006).

Le complexe *Anopheles nili* est largement répandu en Afrique tropicale. Il se compose de quatre espèces : *An. nili sensu stricto* Theobald, 1909, *An. somalicus* Rivola et Holstein, 1957, *An. carnevalei* Brunhes *et al.*, 1999 et *An. ovengensis* Awono-Ambene *et al.*, 2004. Excepté l'espèce *An. somalicus* qui parait exophile et zoophile, les autres espèces sont toutes vectrices de plasmodies humaines (Fontenille et al., 2003). *An. nili s.s.* est un excellent vecteur du paludisme, mais reste localisé à certaines zones rurales forestières bordant les rives de rivières et de fleuves. En effet, des taux d'infestation des glandes salivaires dépassant 1 % et des taux d'inoculation entomologique importants (21.2 piqûres infectantes/homme/année) ont été signalés en Côte d'Ivoire (Assouho et al., 2020).

An. gambiae



An. funestus

Figure 7: *An. gambiae* et *An. funestus* lors d'une prise de repas sanguin

Source: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors.html

2.3-Physiopathologie du paludisme : symptomatologie, diagnostic et traitements des infections à *P. falciparum* chez l'homme

2.3.1- Symptomatologie du paludisme.

Les symptômes du paludisme se manifestent généralement au bout de quelque jours (habituellement entre 10 à 15 jours) après la piqûre d'un moustique infecté. Ils sont liés au malade (niveau d'immunité acquise) et au parasite (espèce plasmodiale, stade parasitaire et virulence). Pour toutes les espèces de *Plasmodium* seul le stade érythrocytaire engendre des symptômes. On distingue deux grandes catégories de paludisme : l'accès palustre non compliqué et l'accès palustre grave.

L'accès palustre non compliqué (accès simple) est diagnostiqué lorsque des symptômes sont présents, mais qu'aucun signe clinique ou biologique n'indique une affection grave ou un dysfonctionnement d'organes vitaux. Cliniquement, la suspicion du paludisme par les praticiens hospitaliers repose sur la présence d'un d'état fébrile ou d'antécédents de fièvre chez le patient. La fièvre est due à la libération dans le sang du pigment malarique (pyrogène) lors de l'éclatement des schizontes matures. Les accès de fièvre dûs à l'infection à *P. falciparum* interviennent de manière intermittente toutes les 36-48 heures ou peuvent être continus. Des céphalées intenses, malaise, fatigue, hépatomégalie, splénomégalie et divers troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée etc…) en particulier chez les enfants sont décrits. Tous ces symptômes sont facilement confondus avec d'autres maladies comme la grippe et la gastro-entérite, dont la conséquence immédiate est un retard dans le diagnostic. Si le traitement est retardé, les personnes souffrant de cette forme peuvent éventuellement développer des complications graves du paludisme.

L'accès palustre grave (paludisme grave généralement causé par *P. faciparum)*, se définit par la présence de signe clinique ou biologique de dysfonctionnement des organes vitaux. La plupart des complications graves du paludisme surviennent chez les individus non immunisés et concernent le système nerveux central dans le cas l'accès cérébral (convulsions multiples et troubles de la conscience), le système pulmonaire (difficulté respiratoire), le système rénal (insuffisance rénale aiguë) et/ou le système hématopoïétique (anémie sévère) (Bartoloni & Zammarchi, 2012). Une parasitémie élevée semble être une composante nécessaire à la gravité de l'infection. Pour un individu présentant une parasitémie avec des formes asexuées de *P. falciparum*, la présence d'une ou de plusieurs des manifestations cliniques citées plus haut, indique qu'il souffre de paludisme grave. En Afrique le coma, les dysfonctionnements rénaux et l'acidose hépatique sont des facteurs prédictifs de la mortalité

chez les adultes et les enfants atteints de paludisme grave à *P. falciparum* (Sypniewska et al., 2017; von Seidlein et al., 2012; Dondorp et al., 2008).

2.3.2- Diagnostic

La différenciation entre une fièvre palustre et un état fébrile ayant une autre origine est délicate, c'est pourquoi l'OMS recommande désormais que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés par un test de diagnostic préalablement à tout traitement.

Les méthodes de diagnostic des infections à *Plasmodium* peuvent être divisées en deux principaux groupes, les méthodes de gestion de cas (microscopie et test de diagnostic rapide TDR) et les méthodes de surveillance en laboratoire (Tangpukdee et al., 2009).

2.3.2.1- Les techniques de diagnostic standard

La microscopie demeure la méthode standard et recommandée par l'OMS, en raison de sa capacité de diagnostic et de ses avantages économiques et opérationnels.

Toutefois, la qualité d'un tel diagnostic dépend de la disponibilité et des compétences de techniciens bien formés. Aussi, elle possède une sensibilité analytique environ 10 fois inférieure à celle des tests moléculaires (Hofmann et al., 2015).

Le diagnostic microscopique à partir du traitement par coloration d'une goutte de sang (la goutte épaisse et le frottis sanguin) permet un diagnostic direct et permet d'identifier les espèces de *Plasmodium spp*. qui parasitent l'homme. Ces 2 examens évaluent la parasitémie (nombre de globules rouges infectés ou de parasites par unité de volume de sang), indice indispensable pour une bonne prise en charge.

Un autre test, le Quantitative Buffy Coat (QBC), a une sensibilité équivalente à celle de la goutte épaisse (Salmani et al., 2011) voire plus sensible que les TDR dans certaines régions (Kochareka et al., 2012; Kocharekar et al., 2014; Ifeorah et al., 2017). Le QBC repose sur le principe de la stratification centrifuge des composants du sang périphérique. Ce test consiste à l'observation de parasites fluorescents au microscope ultraviolet, dont l'ADN a été au préalable coloré dans un tube (en verre) à hématocrite avec l'acridine orange (Pinto et al., 2001). Cette technique bien qu'elle soit moins fastidieuse et plus rapide que celle de la microscopie classique, est très couteuse et a l'inconvénient de ne pas pouvoir déterminer les espèces et le nombres de parasites (Vaidya & Sukesh, 2012).

Les tests de diagnostic rapide (TDR) permettant la détection indirecte d'Ag (Ag) plasmodiaux. Ces tests sont présentés sous forme de bandelette immuno chromatographique. Ils consistent en une chromatographie sur papier où sont fixés des anticorps (Ac) dirigés contre

la protéine HRP2 (Histidin Rich Protein 2) de *P. falciparum* et/ou contre la pLDH (lactate deshydrogénase) de *Plasmodium* (Pham et al., 2018). Ils ont l'avantage d'être simples d'utilisation et surtout de fournir des résultats rapides (15-20 minutes). Bien qu'il ait une bonne spécificité, la performance des TDR varie considérablement d'une marque à l'autre et d'un lot à l'autre, en particulier pour les échantillons ayant une faible densité de parasites (<200 parasites /microlitre). A cela s'ajoutent les inconvénients d'ordre opérationnels tels que le manque de sensibilité pour la détection des faibles parasitémies, l'incapacité à quantifier la densité parasitaire et le manque de stabilité thermique lors du stockage dans les zones endémiques. En outre la délétion et le polymorphisme au niveau du gène *PfHRP2* observé en particularité dans les régions amazonienne et d'Afrique de l'ouest conduit à des résultats faussement négatifs (Bosco et al., 2020; Kozycki et al., 2017; Koita et al., 2012).
La performance des TDR dépend de deux facteurs principaux la sensibilité et la spécificité des combinaisons Ac-Ag, et la capacité à faciliter une migration fiable du liquide sur la membrane de nitrocellulose.

2.3.2.2- Les techniques de laboratoire

Le diagnostic des infections palustres peut également être réalisé de manière indirecte par des techniques de biologie moléculaire hautement sensibles (Polymerase Chain Reaction (PCR) et Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP), ou par Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tout en présentant une ultra sensibilité (moins de 2 parasites/µL pour *Pf*-LAMP) sur le terrain (Cook et al., 2015) ces approches bien que plus précises, demeurent plus coûteuses, nécessitent une formation et un équipement plus poussé et par conséquent restent aujourd'hui des outils destinés au milieu hospitalier et à la recherche. De nouvelles technologies sont mises en œuvre pour améliorer les techniques de diagnostic actuelles (Pham et al., 2018). Pour les besoins de cette thèse nous ne décrirons que les deux techniques les plus communes (la technique ELISA et la PCR).

- *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

L'ELISA est un test immuno-enzymatique dont les étapes ont été décrites pour la première fois en 1971 par deux groupes de chercheurs indépendants (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971). C'est une méthode analytique, quantitative de la réaction entre un Ag et un Ac révélée par le changement de couleur obtenu en utilisant un conjugué lié à une enzyme et un substrat enzymatique qui servent à identifier la présence et la concentration de molécules telles que les antigènes (Ags) (protéines, hormone etc…) et Ac dans des

échantillons biologiques (sérums plasma etc..). Il existe différentes variantes de l'ELISA (direct, indirect, sandwich ou compétition) selon que les Ags sont fixés directement au fond d'un puit d'une plaque ELISA 96 puits ou indirectement via un Ac qui a été préalablement fixé au fond du puit.

En général le diagnostic de l'infection palustre par ELISA repose sur la recherche d'Ac dirigés contre des Ags plasmodiaux. Ainsi la quantité d'Ac dirigés contre de multiples Ags serait proportionnelle à l'intensité du contact avec le parasite (Bruce-Chwatt et al., 1975) et pourrait être utilisée comme des marqueurs sérologiques du risque d'exposition (individuel et communautaire) au *Plasmodium* (Helb et al., 2015).

Le test ELISA a la réputation d'être très sensible et spécifique. Il permet de tester un grand nombre d'échantillons et donc est moins chronophage que les tests microscopiques. Couplé à la microscopie, elle a atteint une sensibilité et une spécificité similaire à celle de la PCR (Ya-Umphan et al., 2017). Toutefois l'apparition tardive des Ac anti-*Plasmodium* par rapport à l'émergence des parasites dans le sang, ne fait pas de l'ELISA une méthode idéale pour le diagnostic du paludisme dans les zones d'endémie. Néanmoins, elle est indiquée dans le diagnostic de certaines formes cliniques telles que le paludisme viscéral évolutif et la splénomégalie palustre hyper-immune au cours desquelles les Ac sont à des taux élevés alors que les recherches parasitologiques sont le plus souvent négatives (Camara et al., 2009). Cette technique reste par ailleurs, très utilisée dans les centres de transfusion sanguine dans le cadre de la prévention du paludisme post-transfusionnel et dans les enquêtes épidémiologiques (Candolfi, 2005).

- *Diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Décrite pour la première fois en 1984 (Franzén et al., 1984), la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) s'est imposée dans le diagnostic du paludisme. C'est en 1990 que le premier diagnostic de l'infection à *Plasmodium* à partir d'oligonucléotides spécifiques de l'ARN ribosomal pour la détection de *P. falciparum* et de *P.vivax* a été réalisé. Depuis lors, la PCR s'est imposée comme étant la méthode la plus sensible et la plus spécifique pour détecter les infections à *Plasmodium*, notamment dans le cas des infections mixtes et celles à très faible niveau de parasitémie (Morassin et al., 2002). De nombreux protocoles comprenant aussi bien la PCR conventionnelle et PCR en temps réél (qPCR), ont été développés en laboratoire pour le diagnostic de l'infection aussi bien chez le vecteur que chez l'hôte (Speers et al., 2003; Rougemont et al., 2004; Mangold et al., 2005; Chaumeau et al., 2016). Ainsi par la PCR on peut détecter 1 à 5 parasites parasites/µL de sang contre 50 à 100 parasites/µL dans le cas de la

microscopie ou du TDR. De plus, une méthode de qPCR haut débit basée sur la détection de l'ARN ribosomique 18S de *Plasmodium spp*, s'est révélée être très sensible et spécifique pour la détection des faibles parasitémies (Imwong et al., 2014), notamment retrouvées lors des infections submicroscopiques (réservoir asymptomatique d'individus parasités, atteints d'infections chroniques à *Plasmodium*). Cette méthode permet également d'identifier les différentes espèces plasmodiales.

Bien que le test basé sur la PCR se soit avéré plus sensible que les méthodes citées auparavant, son utilité est limitée pour le diagnostic de patients gravement malades dans les centres de santé en zone d'endémie palustre. Cette méthode nécessite du matériel spécifique et très coûteux (Berry et al., 2005).

2.3.3- Traitements

L'OMS recommande pour toutes infections à *Plasmodium* confirmées, un traitement rapide et efficace dans les 24 heures où surviennent les premiers symptômes du paludisme dans le but d'éviter des formes grave du paludisme (WHO, 2020).

Le traitement du paludisme dépend de nombreux facteurs tels que le type d'infection (espèce plasmodiale en présence), l'état général du patient et les affections ou maladies associées.

Diverses molécules antipaludiques sont utilisées pour le traitement. Il s'agit des molécules de synthèse telles que : la primaquine, la chloroquine, la méfloquine, la sulfadoxine, la pyriméthamine, l'amodiaquine, et la quinine pour le traitement des cas graves de paludisme chez les jeunes enfants et les adultes non immuns. Actuellement le traitement des cas de paludisme repose sur le concept de la thérapie combinée, qui a pour avantage de réduire les risques d'échec thérapeutique et surtout le développement de résistance observée dans le cas des monothérapies. Ainsi, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont utilisées et recommandées comme traitement de première intention dans les cas de paludisme simple à *P. falciparum*. Cette recommandation de l'OMS a favorisé la production de plusieurs molécules dérivées de l'artémisinine dont les plus connues sont l'artésunate, l'artéméther, et la dihydroartémisinine. Les combinaisons les plus répandues pour le traitement des cas de paludisme simple comprennent soit artéméther + luméfantrine, l'association artésunate + amodiaquine/méfloquine ou encore sulfadoxine et dihydroartémisinine + pipéraquine. Ces CTA associent ainsi deux principes actifs qui ont des modes d'action différents et sont à ce jour les antipaludiques les plus efficaces. Ils sont peu toxiques et tolérés par les malades, ils réduisent le portage de gamétocytes jouant ainsi un rôle important dans la baisse de la transmission du

paludisme (WWARN Gametocyte Study Group, 2016; Ippolito et al., 2017). Pour le cas du paludisme grave, l'OMS recommande de traiter les adultes et les enfants avec de l'artésunate par voie intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 heures jusqu'à ce que le patient puisse tolérer un traitement oral (WHO, 2019).

Le choix des traitements CTA diffère selon les pays. En Côte d'Ivoire les combinaisons artésunate + amodiaquine et artémether + luméfantrine (toutes les deux administrées pendant 3 jours) sont les plus usitées dans les cas d'infection palustre simple à *P. falciparum*.

Les CTA sont très largement utilisés pour le traitement. Cependant, l'émergence à travers le monde de résistances multiples pourrait sérieusement menacer les progrès réalisés à ce jour (**Figure 8**) (Guerra et al., 2016; Dondorp et al., 2009; Noedl et al., 2008; Talman et al., 2019).

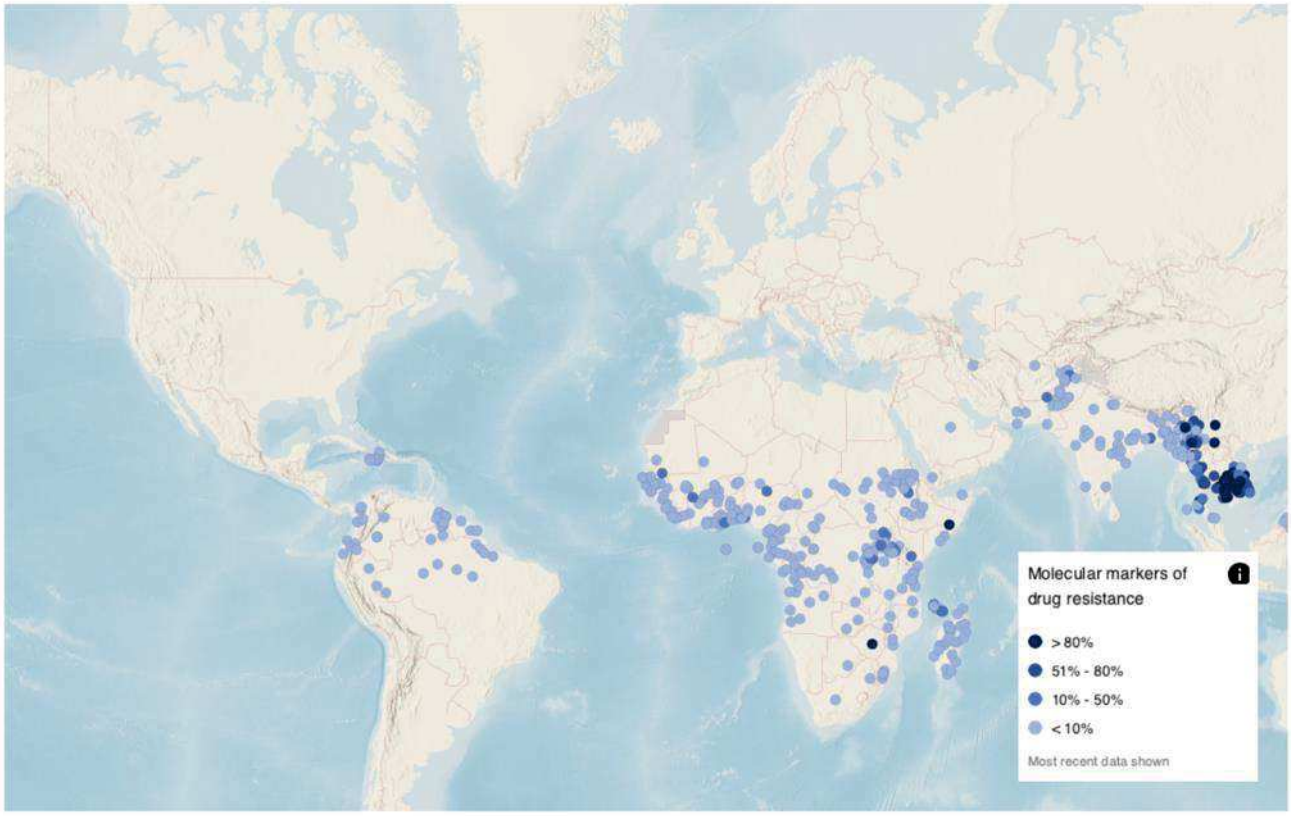


Figure 8: Distribution de la résistance aux molécules antipaludiques dans le monde

(WHO, 2020)

2.4- Stratégies de prévention de la transmission et de l'infection

Les stratégies de lutte contre la transmission du paludisme reposent sur deux axes complémentaires : celle de la lutte contre le vecteur visant à réduire le contact homme-vecteur et celle de la lutte contre le parasite par des mesures curatives et préventives.

2.4.1- Réduction des populations d'*Anopheles* et du contact homme-vecteur : lutte antivectorielle

Le principal objectif épidémiologique de la lutte antivectorielle (LAV) est la réduction de la morbidité et de la mortalité palustre. Mais le choix des méthodes doit tenir compte de la bio-écologie des espèces d'*Anopheles* visées, de leur comportement et du contexte épidémiologique de la transmission de la maladie (2009).

A ce jour deux formes d'intervention sont appliquées à grande échelle pour réduire la transmission du paludisme (Enayati & Hemingway, 2010) et des études ont suggéré que ces deux outils ont contribué fortement à la réduction des cas du paludisme observée au début du 21ème siècle (Bhatt et al., 2015) : la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides (PID) et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII).

2.4.1.1-La pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide

Grâce à son impact direct, la pulvérisation d'insecticides rémanents (deltaméthrine, bifenthrine, benbiocard, malathion, DDT, etc) à l'intérieur des maisons (plafonds, murs, rideaux, portes et fenêtres) pour tuer les moustiques femelles adultes, reste le moyen de lutte le plus puissant pour réduire et interrompre la transmission du paludisme (WHO, 2019). Cette technique permet ainsi de lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An gambiae* et *An funestus*. L'avantage essentiel de la PID est qu'elle réduit non seulement l'abondance des moustiques, mais plus important encore, leur durée de vie. La rémanence des composés actuels utilisés dans la PID est de 2 à 6 mois.

2.4.1.2- Les moustiquaires imprégnées d'insecticide

Les MII constituent à la fois une barrière mécanique et chimique visant à réduire la transmission des *Plasmodium* et la population d'anophèles (De La Cruz et al., 2006). Leur utilisation au niveau individuel protège l'utilisateur contre les piqûres de moustiques. Au niveau de la communauté toute entière, elles tuent suffisamment de moustiques pour diminuer le nombre de piqûres chez les personnes non protégées (Hawley et al., 2003; Hill et al., 2007).

Cet effet communautaire des MII sur les populations de moustiques vecteurs ne peut toutefois se manifester que si la majorité (80% au moins) des personnes de la communauté ciblée les utilisent. Dans les régions où la densité des anophèles est forte, cette méthode est moins efficace et nécessite une association avec d'autres moyens de protection tel que la PID. Depuis plus d'une vingtaine d'années, une nouvelle génération de MII est mise sur le marché : les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA). Ces MILDA présentent l'avantage de ne nécessiter aucun retraitement durant leur durée de vie estimée entre 4 et 5 ans (Guillet et al., 2001). Leur utilisation pourrait réduire de moitié la fréquence de cas chez les femmes enceintes et le nombre de mort dues au paludisme (Namusoke et al., 2010; Gamble et al., 2007) .

La distribution massive de MILDA récemment réalisées dans plusieurs pays africains a permis d'obtenir en peu de temps une couverture élevée et une répartition équitable des moustiquaires. Des progrès substantiels ont été réalisés au cours de ces dernières années sur la couverture des MILDA et leur utilisation par les populations vulnérables, telles que les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans (Kumar et al., 2020). Bien que des résultats mitigés aient été observés (Abdella et al., 2009; Louis et al., 2015), en général les études ont révélé des réductions importantes de l'incidence des fièvres palustres (environ 50%) et de la mortalité générale infantile (environ 20%) au point de prédire l'élimination totale du paludisme si 75% de la population mondiale utilise ces moustiquaires imprégnées (Agusto et al., 2013). Toutefois, l'utilisation effective des moustiquaires par les populations reste encore un enjeu car tous ceux qui possèdent une moustiquaire ne l'utilisent pas régulièrement (Kinde-Gazard et al., 2012).

A cela s'ajoute le développement de phénomènes de résistance des *Anopheles* aux insecticides d'imprégnation (Zoh et al., 2018; Camara et al., 2018; Aïkpon et al., 2013) et l'effet négatif des MII sur l'immunité anti-palustre de l'Homme (Müller et al., 2006) ont remis en discussion leur efficacité comme stratégie unique de lutte contre le paludisme. En effet la résistance aux pyréthrinoïdes, la seule classe d'insecticides actuellement utilisés dans les MII, est répandue. Elle a été détectée chez au moins un des vecteurs du paludisme sur plus des deux tiers des sites testés et s'est avérée la plus élevée dans les régions Afrique et Méditerranée orientale de l'OMS (WHO, 2019).

Pour une meilleure gestion des phénomènes de résistance, de nouvelles méthodes d'imprégnation ont été mises en place. Il s'agit notamment de la bi-imprégnation (Pennetier et al., 2008; Corbel et al., 2002) et de l'utilisation d'autres insecticides telle la bifenthrine (Chouaibou et al., 2006).

2.4.1.3-Nouvelles méthodes de lutte antivectorielle

- Technique de l'appât sucré

Les moustiques adultes ont besoin pour leur survie, de sucres et d'hydrates de carbone dérivés de plantes. Ainsi ce besoin quasi quotidien de source essentielles de sucre dans leur environnement, offre l'opportunité d'une nouvelle forme de lutte antivectorielle à partir d'Appât toxique attractif à base de sucre (ATBS).

La méthode ATBS utilise l'odeur d'un fruit ou d'une fleur comme attractif, une solution sucrée comme stimulant alimentaire et une toxine orale (l'ivermectine, l'acide borique et le Spinosad) pour tuer les moustiques (Müller et al., 2010; Beier et al., 2012). Les solutions ATBS sont soit pulvérisées sur la végétation, soit suspendues dans un appât, et les moustiques qui ingèrent les solutions toxiques sont tués.

Cette intervention est simple d'un point de vue technologique et opérationnel, sans danger pour l'environnement et bon marché, ce qui la rend appropriée pour le contrôle du paludisme dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Tizifa et al., 2018). De nombreux essais sur le terrain suggèrent que l'ATBS a la capacité de réduire les densités de populations des *Anopheles*. En effet une étude menée en Israël a montré une réduction de 95 % des populations de *Anopheles sergentii* femelles, tout en éradiquant complètement les mâles, réduisant la capacité vectorielle des moustiques adultes de 11,5 avant traitement à 1,0 (Beier et al., 2012). Dans une tout autre étude au Mali le traitement ATBS a réduit les densités d'*An. gambiae s. l.* d'environ 90%. avant de se stabiliser à un faible niveau (Müller et al., 2010). Ces résultats soulignent l'importance de l'ATBS en tant que nouvel outil prometteur pour la lutte antivectorielle; toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour démontrer son impact sur la morbidité et la mortalité (Tizifa et al., 2018).

- **Modification de l'habitat : Eave Tube**

La technologie Eave Tube est une innovation récente qui offre une nouvelle approche pour l'administration d'insecticides aux vecteurs du paludisme (Knols et al., 2016). Celle-ci exploite le comportement naturel des moustiques vecteurs, qui à la recherche de leurs hôtes pour leurs repas de sang, pénètrent de préférence par les espaces d'aération compris entre le toit et les murs des maisons. L'approche consiste à obstruer les bouches d'aération et à insérer des morceaux de tuyau en PolyChlorure de Vinyle (PVC) afin de canaliser les odeurs humaines que les moustiques utilisent pour localiser leurs hôtes **(Figure 9)**. les moustiques en entrant

rencontrent un filet électrostatique traité avec de la poudre d'insecticide notamment les pyréthrinoïdes) (Oumbouke et al., 2018).

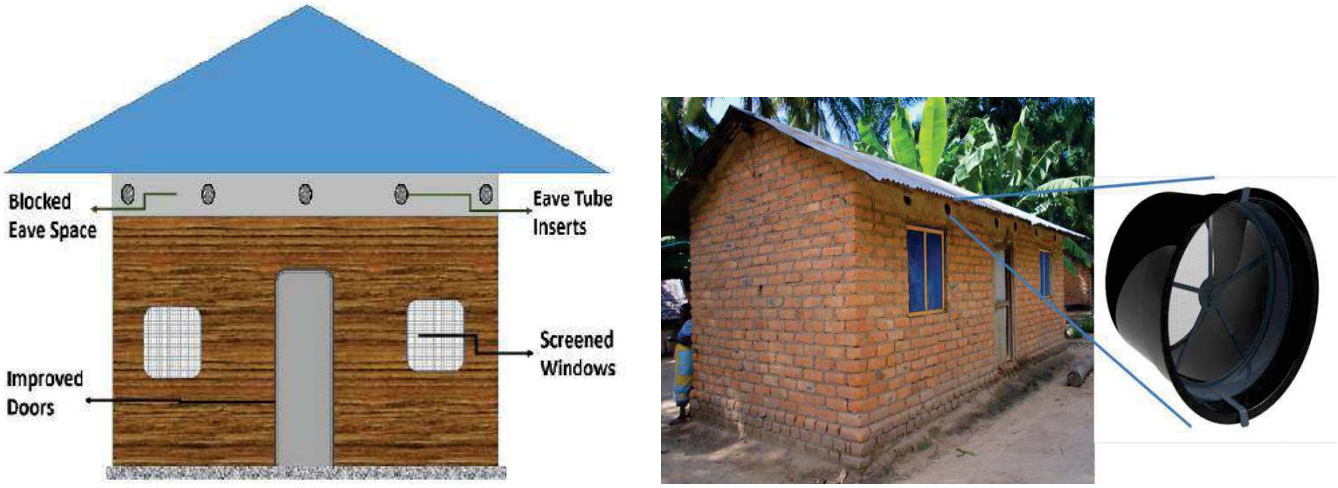


Figure 9: Représentation simplifiée de l'approche Eave Tube (a) ; Maison avec insert EaveTube(b)

Selon les spécifications publiées, l'approche EaveTube comprend bien plus que les inserts. Au lieu de cela, les espaces entre les murs et le toit sont également bloqués de sorte que les seuls espaces restants soit ceux pour insérer les tubes. De plus, toutes les fenêtres sont également sont équipé de moustiquaire grillagé, les fissures des murs scellées et les portes renforcées pour sceller toutes les ouvertures. Adapté de (Okumu, 2017)

Les études suggèrent que lorsqu'elles sont combinées au calfeutrage des portes et des fenêtres, il y a une réduction de l'entrée des moustiques et une augmentation de leur mortalité de plus de 50% (Barreaux et al., 2018; Oumbouke et al., 2018). De plus les inserts traités à la bêta-cyfluthrine sont capables de conserver une efficacité résiduelle élevée, tuant 100 % d'*An. gambiae* (résistants aux pyréthrinoïdes) au cours du premier mois et plus de 80 % au cours des 8 mois suivants. Une autre étude réalisée dans un contexte épidémiologique différent en Tanzanie a observé une réduction de 85% des *Anopheles* adultes et de 93% des larves par rapport aux habitats témoins non équipés des inserts traités (Sternberg et al., 2016). Globalement ces Eave tubes semblent clairement montrer leur efficacité sur les vecteurs en quête d'un hôte lorsqu'ils tentent d'entrer dans les maisons, réduisant ainsi le risque de transmission à la fois au niveau des ménages et au niveau communautaire (Knols et al., 2016; Spitzen et al., 2016; Sternberg et al., 2016; Snetselaar et al., 2017).

Cependant toutes ces différentes techniques utilisent des insecticides qui ont certes montré leur efficacité, mais l'apparition croissante des mécanismes de résistance multiple aux insecticides menace d'annuler tous les progrès réalisés jusqu'à présent pour l'élimination ou le contrôle des principales maladies transmises par les moustiques en général et particulièrement

le paludisme (Wilke & Marrelli, 2015; Alout et al., 2017). Dans ce contexte, une attention particulière est apportée à une tout autre approche dite biologique (*wolbachia*, technique de l'insecte stérile) qui consiste à cibler différentes étapes du cycle de vie des moustiques afin de réduire la dépendance actuelle aux insecticides.

- . **Lutte biologique**

- *Wolbachia*

Wolbachia, est une bactérie endosymbiotique dominante de nombreux insectes, transmise de la mère à sa descendance via le cytoplasme des ovocytes. Elle a la particularité d'infecter les organes reproducteurs des moustiques, mais aussi les tissus somatiques où se développent les pathogènes, réduisant ainsi la reproduction de leurs hôtes, et par conséquent la propagation de nombreux pathogènes humains.

L'utilisation de *Wolbachia* pour le contrôle du paludisme nécessite une infection stable des organes reproducteurs (pour être transmise verticalement à la descendance) soit naturellement, soit par micro-transfection. A cet effet, une infection stable d'une souche de *Wolbachia* a été établie chez *An. stephensi* (Bian et al., 2013) et des infections naturelles par *Wolbachia* ont été retrouvées chez des populations sauvages de deux importants vecteurs du paludisme, *An. gambiae* et *An. coluzzii*, au Burkina Faso un pays situé dans une zone de forte transmission palustre (Baldini et al., 2014). Toujours dans cette même zone Afrique de l'OMS d'autres études ont montré que la souche *wAnga* infecte de manière stable les ovaires, et les tissus somatiques où se développe *Plasmodium*. Cette souche pourrait entrer en compétition pour les ressources ou réguler la réponse immunitaire pour éliminer le parasite du paludisme (Shaw et al., 2016; Gomes et al., 2017). De manière intéressante, l'infection expérimentale a montré que *wAnga-Mali* a un fort impact sur les stades tardifs des sporozoïtes et réduit la transmission du paludisme (Gomes & Barillas-Mury, 2018). Globalement ces études ont montré le potentiel du lâcher de moustiques infectés par *Wolbachia* en tant que stratégie prometteuse pour réduire la transmission du paludisme, mais ont également soulevé de grandes limites dues aux difficultés intrinsèques du transfert de *Wolbachia* dans les embryons des *Anopheles* et au manque de compatibilité cytoplasmique (Walker & Moreira, 2011; Shaw et al., 2016).

La découverte récente d'infections natives par *Wolbachia* chez des espèces de *Anopheles* d'Afrique (vectrice et non vectrices du paludisme), confirme que l'infection naturelle par *Wolbachia* chez les moustiques anophéliens est plus répandue que prévu (Baldini et al., 2018; Jeffries et al., 2018; Ayala et al., 2019) . Cela offre une opportunité de mieux étudier la diversité des souches *Wolbachia* de *Anopheles* et incite à poursuivre les recherches sur l'utilisation

possible des associations naturelles *Wolbachia-Anopheles* pour limiter la transmission du paludisme (Baldini et al., 2014; Niang et al., 2018).

- Technique de l'Insecte Stérile (TIS)

La technique d'insecte stérile (TIS) est une stratégie de lutte antivectorielle qui consiste à la production et la libération d'un nombre important de moustiques mâles stérilisés (irradiation par rayons X ou γ) afin de réduire et/ou éliminer les populations de moustiques ciblées par l'accouplement improductif de femelles moustiques sauvages (Baxter, 2016; Benelli et al., 2016). Des modifications génétiques peuvent également conduire à des mâles stériles (Burt et al., 2018). En Afrique, l'étude de faisabilité de la TIS comme méthode de contrôle du vecteur du paludisme a été démontrée (Munhenga et al., 2016; Bouyer & Vreysen, 2020; Kaiser et al., 2021), notamment au Soudan (Ageep et al., 2014; Hassan et al., 2014) et à Mamfene dans la province du KwaZulu-Natal (Afrique du sud) bien qu'un nombre faible de *An. arabiensis* irradiés ait été identifié dans les essaims d'accouplement où se trouve des *An. arabiensis* sauvages (Kaiser et al., 2021). Cependant la compétitivité pour l'accouplement sur le terrain, des mâles de laboratoire reste inconnue. Bien que l'utilisation de cette méthode soit limitée en raison de la performance réduite des mâles stérilisés (dispersion par exemple) et des difficultés liées à la réduction préalable des densités de population sauvage, le développement de la TIS contre les moustiques a progressé rapidement ces dernières années avec des avancées significatives dans le développement de souches génétiques (Papathanos et al., 2018; Ndo et al., 2014), les conditions d'élevage en masse au laboratoire (Mamai et al., 2017, 2018), la séparation des sexes (Zacarés et al., 2018), l'irradiation (Yamada et al., 2019) et le contrôle qualité (Culbert et al., 2018, 2020).

2.4.2- La lutte contre le parasite *Plasmodium falciparum*

La lutte contre le parasite regroupe à la fois toutes les stratégies curatives et de prévention de la maladie qui prend en compte la chimio-prévention et les stratégies vaccinales potentielles.

La chimio-prévention englobe la chimioprophylaxie incluant le traitement préventif intermittent (TPI) pour les femmes enceintes et enfants de moins de 5 ans vivant en zones d'endémie) : la chimioprophylaxie doit être envisagée, de manière systématique, pour tout sujet non immun se rendant en zone impaludée. C'est un moyen de prévention de la maladie basé sur l'utilisation de molécules chimiques. Il n'existe pas de schéma prophylactique idéal. Le

choix de la chimio-prophylaxie doit être discuté et son application adaptée à chaque voyageur et dépend de la zone d'endémie visitée (intensité de transmission et niveau de résistance des *Plasmodium* aux antipaludiques), de la saison et du sujet concerné (âge, femme enceinte, mode de vie, antécédents médicaux …) (Greenwood et al., 2005). Mais d'une manière générale, l'arsenal thérapeutique de la chimio-prophylaxie se limite à la chloroquine, au proguanil, à l'association pyriméthamine-dapsone, à la méfloquine et à la doxycycline (Kafai & Odom John, 2018).

Chez les femmes enceintes, le traitement préventif intermittent (TPI) consiste à administrer 3 doses de Sulfadoxine- Pyriméthamine (SP) durant les deuxièmes et troisième trimestres de la grossesse. Des études ont montré que ce TPI réduit le risque d'insuffisance pondérale (Wilson et al., 2011) et d'anémie infantile au cours des premières années de vie. Globalement les TPI ont une efficacité protectrice contre les formes clinique de 27% (Esu et al., 2019). Au cours de cette dernière étude, les auteurs ont observé une variabilité de l'efficacité des TPI selon la période d'observation et/ou le type de médicament administré. La SP a probablement fait peu ou pas de différence (toutes causes confondues) dans la mortalité infantile ; toutefois elle a entrainé moins d'anémie, de parasitémie et d'admission à l'hôpital. La Sierra Leone est le seul pays à ce jour à avoir pleinement expérimenté les TPI (Audibert & Tchouatieu, 2021).

En plus de la chimioprohylaxie et des autres méthodes de lutte contre le paludisme dans la région de l'Afrique subsaharienne, l'OMS recommande depuis 2012 la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants de moins de 5ans dans la zone du sahel. La CPS consiste en l'administration mensuelle d'une dose curative de SP + Amodiaquine (AQ) pendant 4 mois (WHO, 2012). L'objectif étant de maintenir des concentrations thérapeutiques de ces molécules antipaludiques dans le sang, tout au long de la période où le risque de paludisme est élevé. L'analyse de métadonnées issu d'essai clinique suggère que près des trois quarts des cas de paludisme pourraient être évité, et des études de modélisation montrent que des dizaines de milliers de décès seraient évité grâce au déploiement à grande échelle du CPS (Cairns et al., 2012; Meremikwu et al., 2012). L'adoption de la CPS à grande échelle dans 7 pays du sahel (Niger, Mali, Burkina faso, Tchad, Guinée, Gambie et Nigeria) a montré une efficacité protectrice contre le paludisme de 85% (ACCESS-SMC Partnership, 2020).

2.4.3- Stratégies vaccinales : Candidats vaccins, avancées et difficultés dans le développement d'un vaccin efficace

Depuis plus de 50 ans, le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme

demeure un des objectifs qui mobilise bon nombre d'acteurs de la communauté scientifique. Divers vaccins ou candidats vaccins ayant pour cible les Ag issus des différents stades du cycle parasitaire ont été développés (**Figure 10**) (Frimpong et al., 2018). Actuellement, plus d'une centaine de candidats vaccins, dérivés seulement d'une vingtaine d'Ag, sont en développement (de Almeida et al., 2021; Cockburn & Seder, 2018; Draper et al., 2018; Epstein et al., 2017; Beeson et al., 2016). A cet effet des progrès constants sont réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui assurent la protection dans les modèles animaux et humains. Pour qu'un vaccin contre le paludisme soit considéré comme efficace, la nouvelle feuille de route technologique qui fixe les objectifs d'éradication et d'élimination du paludisme à l'horizon 2030, prévoit désormais qu'il atteigne une efficacité de 75% sur deux ans contre *P. falciparum* et *P. vivax* (Moorthy et al., 2013; Draper et al., 2018) tout en conservant son objectif de 2015, qui est celui d'un vaccin de première génération offrant une efficacité protectrice d'au moins 50% sur une période de un an. Trois phases de test clinique (Phase I, II, III) sont nécessaires pour une mise en conformité et l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché. Ces essais cliniques qui se déroulent chez l'Homme, évaluent l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité du vaccin (Singh & Mehta, 2016).

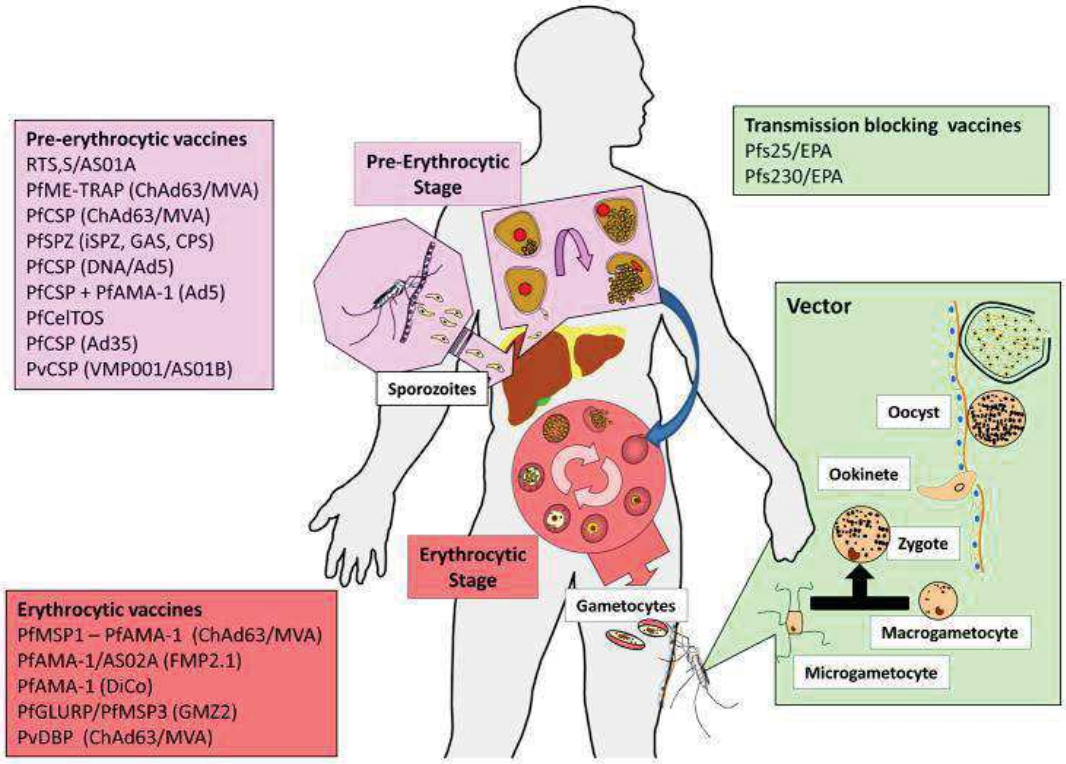


Figure 10: Candidats vaccins contre le paludisme en cours d'essais cliniques.
(Moreno & Joyner, 2015)

2.4.3.1-Vaccin contre les stades pré-érythrocytaires de *P. falciparum*

Les vaccins qui ont cours actuellement ont pour but d'éliminer tout sporozoïte et d'empêcher toute libération dans le sang de mérozoïtes provenant de schizontes hépatiques. A ce jour, seul le vaccin RTS/AS01 (RTS,S), constitué de 18 copies du domaine central et de la région C-terminale de la protéine de surface de la *CircumSporozoite Protein* (CSP) de *P. falciparum*, présentant également des épitopes de lymphocytes T couplés à l'Ag de surface de l'AgHBs de l'hépatite B a démontré une efficacité protectrice dans les essais cliniques de phase III (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015). Ce vaccin dirige la réponse immunitaire contre la principale protéine CSP qui recouvre la surface des sporozoïtes. La protection est partielle, s'estompe avec le temps et l'âge (protection plus faible chez les nourrissons de moins de 12 semaines que chez les jeunes enfants de 5 à 17 mois). Chez ces derniers l'incidence du paludisme clinique a été réduite de 51% [IC95, 48%-55%] au cours des 12 premiers mois de suivi pour les enfants ayant reçu 3 doses de vaccins. Sur 48 mois de suivi, l'efficacité était plutôt de 26% [IC95, 21%-31%], et chez les enfants recevant une quatrième dose (18 mois après la

troisième dose), l'efficacité était de 39% [IC95, 34%-43%]. Une récente étude réalisée toujours chez des enfants (109 nourrissons âgés de 6 à 12 semaines et 86 enfants âgés de 5 à 17 mois) dont certains ont encore des Ac (IgG) maternels, a révélé que la vaccination avec RTS,S/AS01E était capable de générer des Ac dirigés contre un groupe spécifique d'Ag pré érythrocytaires et du stade sanguin. De manière intéressante les auteurs ont montré qu'il existe une association entre les niveaux d'Ac IgG anti *Pf*MSP1 , *Pf*MSP5, *Pf*MSP1 bloc 2, *Pf*RH4.2, *Pf*EBA140 et *Pf*SSP2/TRAP et la protection clinique après vaccination, dans deux différents lieux d'endémicité (Dobaño et al., 2019).

Malgré sa relative faible efficacité probablement due à la spécificité de la souche vaccinale, car les infections naturelles *à P. falciparum* présentent une forte variation antigénique (Neafsey et al., 2015; Ouattara et al., 2015) et les rapports d'effets indésirables, le RTS,S est le premier vaccin qui aurait un impact significatif sur la santé des jeunes enfants en contribuant efficacement à la réduction du taux de paludisme grave et des hospitalisations chez ceux-ci (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015). Actuellement il est connu sous le nom commercial de Mosquirix™ et a reçu une décision favorable de l'Agence Européenne des Médicaments et l'autorisation de l'OMS (WHO, 2021). En octobre 2021, l'OMS a recommandé que le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 soit utilisé pour la prévention du paludisme à *P. falciparum* chez les enfants vivant dans les régions où la transmission est modérée à élevée. Le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 doit être administré à raison de 4 doses aux enfants à partir de l'âge de 5 mois pour réduire la charge de la maladie. Cette décision fait suite aux tests pilotes qui sont en cours dans trois pays d'Afrique subsaharienne (Ghana, Kenya et Malawi) pour évaluer son potentiel pour une utilisation systématique à grande échelle chez les enfants.

Le candidat vaccin, R21/Matrix-M, également basé sur la protéine CSP, a démontré une efficacité jusqu'ici inégalée de 77% lors d'essais de phase 2 au Burkina Faso, suscitant l'espoir d'une avancée majeure dans la lutte (Datoo et al., 2021). Il est le premier à atteindre l'objectif d'efficacité de 75% fixé par l'OMS.

D'autres candidats vaccin prometteurs contre les stades pré-érythrocytaire en cours de développement n'ont pas encore dépassé la phase II. Ces vaccins qui incluent un ou plusieurs Ags comme TRAP (*Thrombospondin-Related Adhesine Protein*), LSA-1 (*Liver Stage Antigen-1*), LSA-3 (*Liver Stage Antigen 3*), STRAP (*Sporozoite Threonine and Asparagine Rich Protein*) ou EXP-1 (*EXported Antigen-1*) sont administrés sous forme de protéines recombinantes, de particules protéiques ou de vecteurs d'expression viraux (amorçage et renforcement viral) (Sebastian & Gilbert, 2016; Draper & Heeney, 2010; Hill, 2006). Seul le vaccin ChAd63-MVA/ME-TRAP a été testé en zone endémique du paludisme au Sénégal et en

Gambie. Il a présenté un fort taux d'immunogénicité chez des adultes, induisant à la fois des cellules T CD4+ et T CD8+ multifonctionnelles, ainsi qu'une immunité humorale (Mensah et al., 2017, 2016; Kimani et al., 2014; Bliss et al., 2017), mais aucune preuve de son efficacité n'a été révélée bien que des essais similaires aient montré une réduction de 67% de l'infection (Ogwang et al., 2015). L'évaluation de ce vaccin chez les enfants (âgés de 5-17 mois) révèle une immunogénicité beaucoup plus importante que chez les adultes (Bliss et al., 2017).

D'autres vaccins induisant aussi des cellules T contre les schizontes hépatiques, sont les vaccins à base de sporozoïtes entiers. Les plus prometteurs sont les vaccins issus des sporozoïtes atténués de *P. falciparum*. Des nombreuses études ont révélé que les sporozoïtes atténués par irradiation (*Pf*SPZ), par chimioprophylaxie (*Pf*SPZ-CVac) et génétiquement (*Pf*SPZ-GA1) pourraient induire une immunité protectrice stérilisante contre des infections hétérologues et homologues de *P. falciparum* chez l'homme et l'animal (Epstein et al., 2017, 2011; Mordmüller et al., 2017; Bijker et al., 2013; Seder et al., 2013; Roestenberg et al., 2009; Mueller et al., 2005). Cette protection serait médiée par la production d'Ac et des cellules T (CD4+ et CD8+) effectrices et mémoires (Behet et al., 2018; Bijker et al., 2013; Spring et al., 2013; Weiss & Jiang, 2012; Hoffman et al., 2002; Krzych et al., 1995). Bien que prometteurs, de par de récentes études dans des pays endémiques du paludisme en Afrique (Mali et Guinée) qui ont confirmé qu'ils sont extrêmement bien tolérés et apportent une protection significative chez des adultes (Sissoko et al., 2017; Roestenberg et al., 2020), il n'en demeure pas moins qu'ils sont confrontés à des difficultés logistiques et financières. En effet les sporozoïtes ne peuvent être développés que chez les moustiques, et la nécessité d'un approvisionnement de sporozoïtes purifiés et cryoconservés limite considérablement l'application de cette stratégie à une plus large échelle (Wilson et al., 2019; Prinz et al., 2018). A cela s'ajoute la complexité d'une administration sûre et viable, notamment dans le cas de la co-formulation de sporozoïtes vivants et d'agents chimioprophylactiques à longue durée d'action, indispensables pour une chimio-atténuation complète in vivo et une limitation des risques de développement de résistances.

Aucun de des candidats vaccins n'a atteint l'objectif de 100% de protection contre l'infection dans le cas d'infections hétérologues. Toutefois ces vaccins contre les stades pré-erythrocytaires qui visent à induire à la fois des réponses médiées par les lymphocytes T et des Ac contre les schizontes hépatiques, pourraient offrir des niveaux d'efficacité initiale supérieurs à celui du RTS,S, à condition qu'ils ne soient pas confrontés à une diminution de leur efficacité dans le temps, à la spécificité liée à la souche et à la nature hautement polymorphe des régions

épitopiques spécifiques des lymphocytes T des Ag pré-érythrocytaires. (Flanagan et al., 2016; Barry & Arnott, 2014; Flanagan et al., 2006).

2.4.3.2-Vaccins contre les stades sanguins de *P. falciparum*

Les vaccins des stades érythrocytaires (stades sanguins asexués) visent soit à inhiber l'invasion des hématies dans le but de contrôler la densité parasitaire, soit à empêcher l'évolution de l'infection vers des formes cliniques de la maladie. Les principales cibles de vaccins contre les stades sanguins asexués sont les Ags situés sur la membrane cellulaire des érythrocytes infectées et les protéines situées à la surface des mérozoïtes libérés par les schizontes hépatocytaires ou érythrocytaires pendant l'invasion des érythrocytes. Ce type de vaccin réduirait les symptômes de la maladie (Good & Stanisic, 2020), en imitant une immunité naturellement acquise (Sutherland et al., 2007). Des expériences de transfert passif d'Ac d'immunoglobulines (Ig) purifiées provenant d'individus immunisés d'Afrique de l'Ouest à d'autres individus démontraient déjà que les IgG peuvent inhiber la réplication de différentes souches de *P. falciparum* et ainsi jouer un rôle dans l'acquisition de l'immunité adaptative contre les stades sanguins de *P. falciparum* (Sabchareon et al., 1991; Cohen et al., 1961a). De plus les études récentes portant sur l'immunité naturellement acquise ont révélé des informations importantes sur les réponses Ac contre ces Ag candidats vaccins de *P. falciparum*, y compris leur développement et leur maintien, les mécanismes moléculaires et immunologiques clés de l'inhibition du parasite dans la réponse protectrice (Gonzales et al., 2020).

Les Ags de stades sanguins ayant atteint les stades de développement de vaccin (Phase I et/ou II) sont AMA1 (*Apical membrane Antigen 1*), MSP1 (*Merozoite Surface Protein 1*), MSP2 (*Merozoite Surface Protein 2*), MSP3 (*Merozoite Surface Protein 3*), MSP5 (*Merozoite Surface Protein 5*) , EBA175 (*Erythrocyte Binding Antigen* 175) , GLURP (*Glutamate Rich Protein*), et SERA5 (*Serine Repeat Antigen 5*). Bien que plusieurs d'entre eux aient fait l'objet d'études poussées, nous nous limiterons à ceux qui ont été utilisés dans le cadre de cette thèse.

- -*Pf*AMA-1

L'Ag *Pf*AMA-1 est une protéine micronémique retrouvée à la surface des sporozoïtes lors de la phase hépatique et des mérozoïtes érythrocytaires. Seule la phase érythrocytaire sera développée dans cette partie. Cette protéine, d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur de 83 kDa (AMA-183) puis convertie en AMA-166, peut être subdivisée en trois domaines

(DI, DII et DIII) reliés entre eux par huit ponts disulfures (Hodder et al., 1996) (**Figure 11**). L'Ag *Pf*AMA-1 joue un rôle majeur dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *P. falciparum* en interagissant avec des protéines de la famille RON (Rhoptry Neck Protein) (Vulliez-Le Normand et al., 2012; Tonkin et al., 2011; Richard et al., 2010; Anders et al., 2010; Coley et al., 2007; Henderson et al., 2007). Ainsi les Ac dirigés contre cet Ag ont la capacité de bloquer l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes (Woehlbier et al., 2010). Cependant un important polymorphisme génétique (Healer et al., 2004, 2018) représente un obstacle majeur pour développer un vaccin à base de *PfAMA*-1. Toutefois, des études sérologiques menées dans les pays où le paludisme est endémique suggèrent que des titres élevés d'Ac cytophiliques IgG3 et IgG1 sont associés à la protection contre le paludisme (Dolo et al., 2012; Kangoye et al., 2016; Stanisic et al., 2015; Richard et al., 2010; Nebie et al., 2008; Roussilhon et al., 2007), laissant apparaître l'espoir d'avoir un vaccin mimant ces taux Ac protecteurs.

Bien que des études prometteuses chez l'animal immunisé, révèlent une protection clinique médiée par la production d'Ac qui inhibent l'invasion des mérozoïtes (Mahdi Abdel Hamid et al., 2011; Stowers et al., 2002; Dutta et al., 2009), la question est de savoir si les vaccins dérivés de ce candidat vaccin peuvent tout autant conférer une protection chez l'Homme. A cet effet un vaccin combinant deux allèles de AMA-1 (3D7 et FVO) et un adjuvant a démontré une bonne immunogénicité et innocuité chez des adultes et enfants en zone d'endémie palustre (Mali) (Dicko et al., 2008, 2007). Malheureusement, les essais de phase II, n'ont pas pu démontrer une réduction de la fréquence des épisodes cliniques (Ouattara et al., 2010). Tout comme le précédent, le vaccin FMP2.1/AS02 (combinant la souche recombinante 3D7 de AMA-1 et l'adjuvant AS02), s'est avéré peu efficace et n'a pas démontré une protection globale significative contre les phases cliniques (Thera et al., 2011), mais des preuves d'une efficacité substantielle de 64% spécifique à la souche 3D7subsistent (Laurens et al., 2013).

Chez l'homme, le manque d'efficacité des vaccins à base de l'Ag AMA-1 seul ou couplé avec un adjuvant ne peut être dû uniquement au polymorphisme. Une autre raison pourrait résider dans le fait que les vaccins n'induisent pas de concentration seuil d'Ac pouvant fournir une activité antiparasitaire fonctionnelle, malgré des titres d'Ac anti-AMA-1 élevés (Draper et al., 2015, 2018). Des efforts récents ont largement contribué à améliorer les Ac neutralisants des souches en incorporant plusieurs allèles de *PfAMA*-1 pour rediriger la réponse immunitaire vers les régions conservées (Dutta et al., 2013; Terheggen et al., 2014; Harris et al., 2014; Miura et al., 2013). Une approche dont les tests sont en cours en Europe et en Afrique (Sirima et al., 2017), consiste à générer une chimère de protéine AMA1 de type Diversity Covering (DiCo)

qui pourrait couvrir la majorité des gènes polymorphes et ainsi augmenter le taux d'Ac (Faber et al., 2016) ; ou remplacer les principaux résidus polymorphes en alanine, en glycine ou en sérine. Au vu des observations différentes réalisées dans ces études, ces données suggèrent qu'un niveau seuil d'Ac fonctionnels neutralisants pourrait être induit par un vaccin complexe.

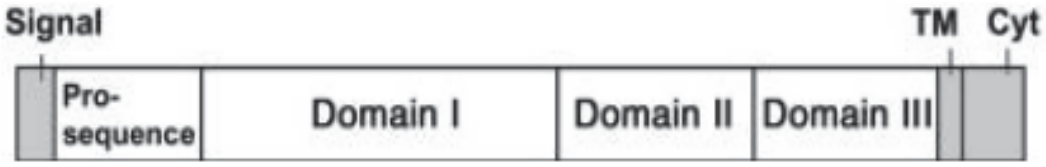


Figure 11: Représentation schématique de l'antigène AMA-1 de *P. falciparum* (Kato et al., 2005)

- *Pf*MSP-1

La protéine *Pf*MSP-1 (glycoprotéine d'environ 200 kDa) constitue la principale protéine exprimée à la surface des mérozoïtes. Elle est constituée de blocs semi- conservés et conservés, numérotés de 1 à 17 (Ghoshal et al., 2018) (**Figure 12**). Durant l'évolution des mérozoïtes, la protéine *Pf*MSP-1 subit des clivages protéolytiques en différents fragments dont le seul fragment C-terminal de 19 kDa (MSP-1$_{19}$) est exprimé à la surface du parasite intracellulaire et persiste jusqu'au stade trophozoïte chez l'hématie nouvellement infectée. Cette protéine a fait l'objet d'études approfondies en tant que candidat vaccin, sur la base de rapports selon lesquels les Acs anti-*Pf*MSP-1 sont associés à une réduction du risque d'épisode clinique du paludisme (Fowkes et al., 2010; Beeson et al., 2016). Tout comme l' Ag *Pf*AMA-1 cité plus haut, il a été montré que certains Acs anti-*Pf*MSP-1 sont des Acs inhibiteurs de l'invasion des érythrocytes (Moss et al., 2012). Les Acs pourraient agir soit directement, en bloquant ou en empêchant l'invasion des érythrocytes sains par les mérozoïtes, soit indirectement par activation des monocytes effecteurs : cytotoxicité cellulaire dépendant de l'Ac (ADCC) (Jafarshad et al., 2007). De plus, les études longitudinales réalisées montrent que l'immunité protectrice contre le paludisme est largement médiée par les IgG et les sous-classe cytophiles IgG1 et IgG3 anti-*Pf*MSP-1(Amoah et al., 2017; Wang et al., 2016).

A ce jour, bien que les vaccins à base de *Pf*MSP-1 aient montré leur immunogénicité, aucun candidat vaccin comprenant une partie de la protéine *Pf*MSP-1 n'a encore démontré une véritable efficacité chez l'Homme à la suite d'infections naturelles. En effet seul le vaccin basé

sur l'extrémité C-terminale de *Pf*MSP1(MSP1$_{42}$) formulé avec l'adjuvant (AS02) a induit des Ac inhibiteurs de croissance du parasite, chez des adultes naïfs, et chez des enfants et adultes exposés au paludisme. Cependant il n'a montré qu'une efficacité de 5,2% dans des essais de phase IIb chez des enfants du Kenya (Ogutu et al., 2009). En revanche, la combinaison de *Pf*MSP-1 avec les Ag *Pf*MSP-2 et RESA a révélé une réduction de 62% des infections en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Genton et al., 2003).

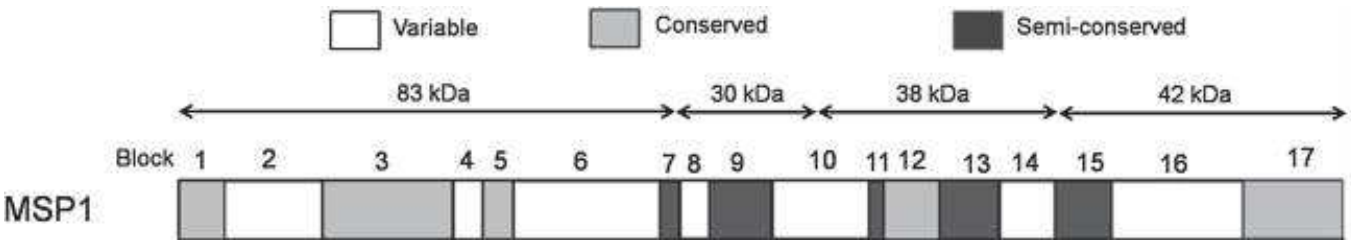


Figure 12: Représentation schématique de la protéine MSP-1 de P. falciparum adapté de (Ghoshal et al., 2018)

- *Pf*MSP-3, *Pf*GLURP et GMZ2

Les protéines MSP-3 (38 kDa) et GLURP (145 kDa) de *P.falciparum* sont des protéines situées à la surface des mérozoïtes qui ne possèdent pas de domaine transmembranaire ni d'ancrage glycophosphatidylinositol (GPI). *Pf*MSP-3 est composée d'une partie C-terminale relativement conservée (avec des domaines variables responsables de la dimérisation de la protéine) et une partie N-terminale hautement polymorphe. Quant à *Pf*GLURP, il possède deux régions (R1 et R2) répétées polymorphes et une région N-terminale non répétée (R0) qui a une diversité limitée.

Ces deux protéines ont fait l'objet de nombreuses études aussi bien chez l'animal que chez l'Homme dans divers milieux épidémiologiques et géographiques. L'immunisation chez le primate (*Saimiri sciureus*) avec différents fragments de MSP-3/adjuvant et GLURP (incluant la région R0) a révélé une protection clinique partielle associée à un taux élevé d'Ac (Carvalho et al., 2004, 2005). Les Ac anti-*Pf*MSP-3 et *Pf*GLURP ne semblent pas capables de bloquer *in vitro* et in *vivo* l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ni leur développement à l'intérieur des globules rouges, mais réduit la croissance parasitaire par l'activation des monocytes

effecteurs : inhibition cellulaire dépendante des Ac (ADCI) (Tiendrebeogo et al., 2015; Osier et al., 2014; Jepsen et al., 2013; Audran et al., 2005; Druilhe et al., 2005).

Des études immuno-épidémiologiques menées dans les pays où le paludisme est endémique ont établi une association entre les Ac spécifiques des régions conservées de *Pf*MSP-3 et *Pf*GLURP et la protection clinique (Amoah et al., 2017; Cherif et al., 2017; Nebie et al., 2008; Soe et al., 2004; Oeuvray et al., 2000). Cependant ces Ag candidats vaccins n'ont pas dépassé le stade de la phase I. Un essai vaccinal de phase I chez des enfants (1-2 ans) au Burkina Faso a rapporté de fortes réponses en Ac cytophiles anti-*PfMSP-3* et le suivi post-vaccinal a indiqué une diminution significative des épisodes cliniques du paludisme chez les enfants ayant reçu le vaccin par rapport aux témoins (Sirima et al., 2009, 2011). Les progrès considérables réalisés dans le développement et la capacité à générer des Ag recombinants à partir de bactérie (*Lactococcus lactis*) ont permis de fusionner des Ag, comme dans le cas du candidat vaccin GMZ2 (Theisen et al., 2004).

GMZ2, est une protéine hybride issue de la fusion des domaines conservés de *Pf*MSP-3 et de *Pf* GLURP (Theisen et al., 2004; Jepsen et al., 2013) (**Figure 13)**, choisis sur la base de plusieurs études immuno-épidémiologiques réalisées dans des zones épidémiologiques variées (Nebie et al., 2008; Soe et al., 2004; Dodoo et al., 2000; Oeuvray et al., 2000; Theisen et al., 2000), en fonction de leur capacité à induire des types Ac naturels similaires (Soe et al., 2004), ainsi que sur la base d'études *in vitro* (Theisen et al., 1998) et l'étude des populations des individus (humains) exposés au paludisme (Adu et al., 2014).

Ce candidat vaccin s'est révélé être sûr, bien toléré et immunogène aussi bien chez des adultes sains allemands , que chez des adultes gabonais partiellement immunisés et des enfants (Esen et al., 2009; Mordmüller et al., 2010; Bélard et al., 2011). Cependant les essais de phase IIb chez des enfants ont révélé une faible efficacité dans la protection contre les infections à *Plasmodium* (14%) (Sirima et al., 2016).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec ces Ag des stades sanguins suggèrent qu'un niveau d'immunité pourrait être acquis par vaccination. Cependant des obstacles subsistent au développement de ces vaccins et susciter une réponse immunitaire protectrice de longue durée par la vaccination semble être un objectif difficile à atteindre. Ces obstacles, sont notamment liés à la variation des séquences des cibles vaccinales, l'incapacité des vaccins à générer des titres d'Ac suffisamment élevés pour la protection. Parallèlement à ces obstacles au développement de vaccins, de nombreuses questions subsistent sur la nature de l'immunité acquise naturellement. On ne comprend pas parfaitement pourquoi l'immunité contre le

paludisme se développe relativement lentement, combien de temps les réponses immunitaires acquises naturellement sont maintenues en l'absence de réexposition, et quelles combinaisons d'Ag devraient être priorisées pour la mise au point d'un vaccin efficace.

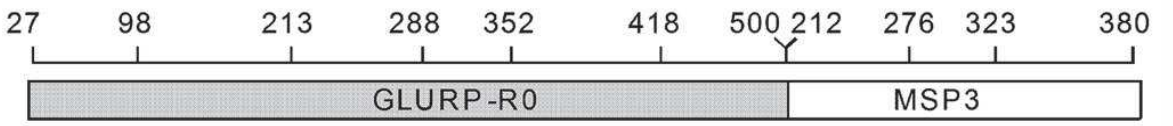


Figure 13: Représentation schématique GMZ2 de *P. falciparum*
(Jepsen et al., 2013)

2.4.3.3-Vaccin contre les stades sexués de *P. falciparum*

Les vaccins dirigés contre le stade sexué de *Plasmodium* permettraient de bloquer la transmission (Acquah et al., 2019).

Ces vaccins induisent la production d'Ac contre les Ag des stades sexués (gamétocytes) du parasite qui peuvent empêcher la fécondation dans l'estomac de l'*Anopheles* vecteur et le développement du parasite. Ils ne conféreraient pas de protection individuelle, mais viseraient à limiter la transmission des parasites de l'Homme au vecteur et aussi du vecteur à l'Homme. Néanmoins pour bloquer la transmission, la couverture vaccinale devrait être totale car un petit nombre d'individus infectés suffirait à assurer la transmission.

De tels vaccins pour être efficaces, devraient potentiellement être combinés à des méthodes de lutte anti-vectorielle ou à un vaccin des autres stades (pré-érythrocytaire ou érythrocytaire).

Actuellement chez *P. falciparum* , seul le candidat vaccin Pfs25 (toujours en cours d'amélioration) a été testé dans le cadre d'essai clinique chez l'homme (Nikolaeva et al., 2015). Les Ac anti-Pfs25 induits chez l'homme après vaccination, sont capables de bloquer le développement de souches de laboratoire et la transmission d'isolats de terrain à des *Anopheles* (Wu et al., 2008)

Les essais ont été interrompus à cause d'un très grand nombre d'effets indésirables. Cependant les participants ayant reçu deux doses ont présenté des réponses Ac détectables avec des niveaux d'activité variables de réduction de la transmission. Plus récemment une autre formulation qui consiste à coupler la protéine Pfs25 à une protéine mutante de *Pseudomonas aeruginosa* (Shimp et al., 2013) a permis d'atteindre des niveaux substantiels d'Ac (capables

de reconnaître la protéine native)après quatre doses du vaccin. Mais les niveaux d'Ac ont rapidement baissé après la dernière dose (Sagara et al., 2018).

2.4.4- Concepte de lutte intégrée

La lutte intégrée n'est pas une méthode, mais un concept qui repose sur l'utilisation concertée d'une variété de méthodes de contrôle, qu'elles soient physiques, chimiques, biologiques, génétiques, ou autres. La mise en œuvre de ces mesures de lutte dépend d'un certain nombre de facteurs : épidémiologie, données disponibles, possibilités et limites de chacune des méthodes, infrastructure et moyens dont disposent les institutions, etc. Les caractéristiques de la transmission et de l'épidémiologie du paludisme varient beaucoup entre régions, pays, et au sein d'un même pays. De ce fait, une seule stratégie de lutte donnée n'est pas applicable ou efficace dans tous les contextes épidémiologiques. La stratégie de lutte doit être adaptée localement en tenant compte non seulement des conditions écologiques et épidémiologiques, mais aussi des réalités socio-économiques de chaque pays et de chaque région (Takken & Knols, 2009).

La stratégie mondiale de lutte contre le paludisme par exemple, préconise, le recours à des mesures sélectives de prévention et de lutte, susceptibles de déboucher sur des résultats durables. Ces mesures doivent avoir pour but, d'empêcher que la situation n'empire, d'éviter le gaspillage des ressources et de contribuer au bon développement des services de santé, de la coopération intersectorielle et de la participation communautaire. Ainsi au Vietnam (Asie du Sud-Est), la mise en place de programmes effectifs de traitement (basés sur les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine ''CTA'') et le déploiement massif de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) a permis de contrôler le paludisme dans les zones à risque (Erhart et al., 2007).

En Afrique, des succès ont été notés dans la réduction de la morbidité et de la mortalité palustres dans certains pays (Tanzanie, Erythrée, Kenya, Rwanda, Sud Mozambique, Zambie, Afrique du Sud, Sénégal, Gambie et Guinée Bissau) suite à des combinaisons de méthodes de lutte (Nyarango et al., 2006; Bhattarai et al., 2007; Ceesay et al., 2008). En zone d'endémie palustre, de nombreuses études, combinant l'utilisation des MIIs aux aspersions intra-domiciliaires, ont rapporté une baise supérieure ou égale à 90% de la transmission du paludisme. Cette baisse était couplée dans la plupart des cas à une forte réduction de l'incidence du paludisme, de la prévalence et des densités parasitaires, des cas de paludisme simples ou graves (Gu & Novak, 2005; Protopopoff et al., 2007). Plus récemment, des études réalisées sur des enfants (5 à 17

mois) au Burkina Faso et au Mali, ont révélé que combinaison de la vaccination RTS, S/AS01E et de la chimioprévention saisonnière (SP+AQ) a conduit à une réduction substantielle de l'incidence des cas simples de paludisme, des hospitalisations avec paludisme et des décès dus au paludisme par rapport au niveau de protection obtenu avec l'une ou l'autre intervention administrée seule (Chandramohan et al., 2020).

3- Réponses immunes anti-*Plasmodium falciparum*

L'immunité se définit comme un état de résistance à l'infection et/ou à la maladie, quel qu'en soit le mécanisme immunologique. Dans le cas du paludisme, différents mécanismes immunitaires interviennent au cours de l'infection afin de contrôler les différents stades de l'infection. On distingue une immunité dirigée contre les stades pré-erythrocytaires, qui vise à empêcher l'invasion et la croissance du *Plasmodium* au sein des hépatocytes, et une immunité dirigée contre les stades érythrocytaires, visant à bloquer l'invasion et la croissance de *Plasmodium* au sein des érythrocytes. Ces mécanismes font intervenir différents acteurs cellulaires et solubles des réponses immunitaires innée et adaptative qui coopèrent tout au long de l'infection. L'immunité innée se met en place dès le début (dans les premières heures en attendant la mise en place de l'immunité adaptative (cellulaire et humorale) qui est opérationnelle en général dans les dix jours suivant l'infection.

3.1 Réponse innée

L'immunité innée est un système de défense évolutif présentant plusieurs caractéristiques clés communes à une grande variété de microorganismes différents (Turvey & Broide, 2010). Elle englobe pratiquement tous les tissus et implique des cellules d'origine hématopoïétique et non hématopoïétique (Kaur & Secord, 2019).

Cette immunité se différencie de celle acquise par le fait qu'elle s'active très rapidement, sans immunisation et sans vaccination préalable. Elle se met en place dès le début de toute infection, se maintient jusqu'à la mise en place de l'immunité acquise et aide à la mise en place de cette dernière qui est plus ciblée et spécifique du pathogène. Dans le cas du paludisme, cette réponse serait probablement la cause du faible taux de parasitémie observé au cours des infections aigues à *P. falciparum* (Mohan et al., 1997)

Les mécanismes de cette défense dite non spécifique, parce que ne dépendant pas de la nature du parasite font intervenir différents effecteurs tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques (CD), les phagocytes mononucléaires et les cellules « tueuses naturelles » (Natural killer) généralement appelées cellules NK, qui semblent jouer un rôle important dans l'immunité innée observée au cours des infections palustres précoces. Ce rôle important des cellules NK dans la réponse immunitaire innée aux infections palustres à *P. falciparum* est médié par la production de cytokines pro-inflammatoires et s'illustre par l'inhibition de la croissance des parasites et la destruction cytotoxique des parasites intra-érythrocytaires (Arora

et al., 2018). Les cellules NK sont les premières cellules du sang périphérique à produire de l'IFN-γ en réponse à une infection à *P. falciparum* (Wolf et al., 2017) et participent à l'initiation et au développement des réponses immunitaires adaptatives (Obaid et al., 2018). Cette implication des cellules dans le contrôle de l'infection de par la production de cytokines a été démontré dans de nombreuses études chez l'Homme et dans le modèle murin. A cet effet, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et le TNFα par les cellules NK du foie et les PBMC de souris, augmente fortement en réponse à l'infection aux stades érythrocytaires et hépatiques de *P. yoelii* (Roland et al., 2006; De Souza et al., 1997) et *P. chabaudi.*(De Souza et al., 1997; Mohan et al., 1997)

Il a également été démontré que la déplétion expérimentale des cellules NK chez les souris infectées par *P. yoelii* ou *P. chabaudi* entraîne une diminution de la production d'IFN-γ avec une augmentation correspondante de la parasitémie (Mohan et al., 1997; Choudhury et al., 2000), suggérant que les cellules NK contribuent de manière significative à la production précoce de cytokines pro-inflammatoires qui est associée à une amélioration des signes cliniques. De plus, les cellules NK jouent un rôle important dans l'activation réciproque des cellules dendritiques pour la production de cytokines et l'amorçage des cellules T CD4+ lors des infections palustres dans le modèle murin (Ryg-Cornejo et al., 2013; Ing & Stevenson, 2009) , les plaçant à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Aux stades pré-érythrocytaires de l'infection, l'IFN-γ produit par la prolifération des cellules NK hépatiques inhibe la croissance des schizontes hépatiques (Roland et al., 2006; Miller et al., 2014) .

Les études chez l'homme ont aussi montré qu'un taux élevé d'IFN-γ était associé à la protection contre l'infection palustre (McCall & Sauerwein, 2010). La production d'IFN-γ par les PBMC était associée au cas de paludisme simple plutôt qu'à un paludisme grave chez les enfants. De plus les enfants atteints de paludisme simple qui présentaient des réponses d'IFN-γ détectables présentaient également une incidence retardée à la réinfection dans l'année suivant l'infection initiale (Luty et al., 1999). Plus tard, une étude a révélé une protection plus longue contre l'infection palustre après vaccination avec des sporozoïtes entiers de *P. falciparum* (Roestenberg et al., 2009). Cette protection semblait être associée à la fois à la production d'IFN-γ, d'IL-2 et des cellules T par les PBMC restimulées *in vitro* avec les antigènes sporozoïtes (Roestenberg et al., 2011). D'autres études *in vitro* de PBMC provenant d'individus naïfs de paludisme ont montré que les érythrocytes infectés par *P. falciparum* peuvent induire les cellules NK à produire de l'IFN-γ dans les 6 heures suivant la co-culture (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002) , bien que cette réponse semble être quelque peu hétérogène entre les individus (Korbel et al., 2005). Cette hétérogénéité peut s'expliquer en partie par les répertoires

de récepteurs des cellules NK (Korbel et al., 2009), car des preuves suggèrent que cette réponse peut nécessiter un contact physique direct entre les cellules NK et les érythrocytes infectés (Dodoo et al., 2002; Artavanis-Tsakonas et al., 2003). La production d'IL-12 et d'IL-18 par les cellules myéloïdes semble être importante dans l'activation des cellules NK (Perkmann et al., 2005; Kojima et al., 2004; Nagamine et al., 2003; Artavanis-Tsakonas et al., 2003) . De plus, au cours du paludisme de l'enfant, les concentrations de granzymes A et B solubles, ainsi que des cytokines (IL-12p70, IL-10), sont augmentées dans le sérum (Hermsen et al., 2003). Par ailleurs, la réponse immunitaire précoce a été étudiée chez des volontaires sains non immuns infectés par une souche de *P.falciparum* inoculée par piqûre de moustique. Du granzyme A soluble, de l'IFN-γ, de l'IL-12 et de l'IL-8 ont été détectés dans le sérum de ces individus, avant même l'apparition de signes cliniques et d'une parasitémie détectable (Hermsen et al., 2003). L'ensemble de ces résultats suggèrent la mise en place d'une réponse immunitaire innée, impliquant en partie des cellules à capacité cytotoxique au cours de la phase précoce de l'infection. Cette étude *in vivo* est venue corroborer des expériences *in vitro* détectant une production de TNFα, d'IL12 et d'IFNγ dans du surnageant de PBMC humains, 10 heures après exposition à des érythrocytes infectés par *P.falciparum* (Scragg et al., 1999) et vient marquer le potentiel des cellules NK à tuer directement les cellules infectées par *Plasmodium* par le biais d'une activité cytotoxique. Tout comme les cellules NK, les cellules NKT sont impliqué dans la protection contre le paludisme au niveau hépatique. Les lymphocytes NKT constituent un groupe de cellules hétérogènes possédant à la fois des marqueurs de lymphocytes T (TCR et CD3) et de lymphocytes NK (CD161) et qui sont restreints au CD1d, une molécule présentatrice d'antigènes glycolipidiques analogue à la molécule de CMH de classe I. En effet, une étude conduite chez le modèle murin a montré que l'administration du glycolipide α-galactosylcéramide (α-GalCer) à des souris infectées par *P. yoelii* et *P. berghei* inhibe le développement des parasites intra-hépatocytaires prévenant ainsi de l'apparition des stades sanguins asexués de l'infection (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2000).

La cytotoxicité des cellules NK et NKT a également été observée contre les parasites au stade hépatique chez la souris (Roland et al., 2006). Ces études ont révélé une augmentation des cellules NK et NKT qui produisent des quantités accrues d'IFNγ et de TNF en réponse à l'infection à *Plasmodium yoelii* (Roland et al., 2006; Miller et al., 2014), ce qui pourrait être important pour freiner la croissance des schizontes dans le foie et amplifier la réponses immunitaire précoce.

D'autres groupes de cellules tels que les cellules dendritiques (CD), les lymphocytes Tγδ et les macrophages peuvent intervenir dans ce type de défense précoce.

Le rôle des CD est lié à leur capacité à capter, traiter et présenter les Ag aux lymphocytes T, à activer directement les lymphocytes B et à amplifier les réponses immunitaires innées en activant par exemple les lymphocytes NK et les lymphocytes Tγδ (Wykes & Good, 2008).
L'effet du contact avec des érythrocytes infectés par *P.falciparum* est différent selon les sous-populations de CD considérées. Les CD plasmacytoïdes (PDC) sont activées via leur récepteur TLR9, et produisent de l'INF-α en réponse à des lysats d'érythrocytes infectés par *P. falciparum* (Pichyangkul et al., 2004). Cette activation serait importante pour aider à la production d'IFN-γ par les cellules Tγδ (Urban et al., 2005). Une autre étude a montré que, *in vitro*, les érythrocytes infectés par *P. falciparum* étaient également responsables d'une modulation négative de l'activation de CD dérivées de monocytes (Urban et al., 2005). Cette modulation négative, dépendante d'une interaction avec le récepteur CD36, se traduit par une absence d'expression des molécules du CMH, des molécules d'adhésion et de co-stimulation, ainsi qu'une absence de production d'IL-12 normalement observée en présence de LPS (lipopolysaccharide). Il reste cependant un grand nombre de questions ouvertes sur le rôle effectif des CD au cours du paludisme (Stevenson & Riley, 2004).

Les cellules Tγδ sont, elles aussi, capables de reconnaître des molécules produites par *P. falciparum*. Elles sont notamment activées par des phospho-antigènes non peptidiques de *P. falciparum* (Behr et al., 1996; Fournié & Bonneville, 1996). Ces cellules, capables de produire de l'IFNγ, sont également cytotoxiques face à des érythrocytes infectés par *P.falciparum* (Farouk et al., 2004; Stevenson & Riley, 2004). Néanmoins, leur activation semble nécessiter, en plus de la reconnaissance directe par le TCR des érythrocytes infectés, des cytokines exogènes, suggérant que les réponses Tγδ pourraient être elles aussi dépendantes de l'activation d'autres types cellulaires, tels que les monocytes et les cellules dendritiques (Stevenson & Riley, 2004).

Les monocytes/macrophages humains sont également activés (production de protéines pro-inflammatoires comme le TNFα) par des glycosylphosphatidylinositols (GPI) provenant de *P.falciparum*. Les récepteurs impliqués dans cette reconnaissance sont le TLR2 et, dans une moindre mesure, le TLR4 (Krishnegowda et al., 2005; Zhu et al., 2005). Par ailleurs, le récepteur CD36 semble important dans la phagocytose d'érythrocytes infectés par *P.falciparum* par les macrophages.

3.2- Réponse cellulaire

L'immunité cellulaire est une des composantes de l'immunité adaptative et principalement spécialisée dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires tel que les parasites ou des pathogènes qui ont été phagocytés. Elle fait intervenir des cellules comme les macrophages, ou les cellules dendritiques impliquées dans la présentation des Ag via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les lymphocytes T cytotoxiques sont les principales cellules effectrices ; toutefois les lymphocytes T auxiliaires, peuvent également participer à cette immunité en agissant sur les Ag extracellulaires via le CMH de classe II, en activant d'autres cellules et via la sécrétion de cytokines.

Dans le cas du paludisme, la poursuite de l'infection palustre est fortement dépendante de la balance entre les cytokines sécrétées par ces différentes cellules lorsqu'elles sont activées (Troye-Blomberg et al., 1999).

Aidoo et al. (2000), déjà proposèrent en 2000 que les cellules T CD8+ pourraient réguler l'immunosuppression au cours du paludisme aigu et moduler négativement les réponses inflammatoires (Aidoo et al., 2000). En effet, les premières études dans les modèles animaux stipulaient déjà que l'immunité protectrice contre les infections induites par les sporozoïtes nécessitent les lymphocytes T CD8+. Cela est d'autant plus vrai que d'autres études ultérieures ont montré que les réponses des lymphocytes, générées dans les ganglions lymphatiques où était déposés des sporozoïtes irradiés suffisaient pour apporter une protection stérile contre les sporozoïtes vivants (Chakravarty et al., 2007). Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent les molécules antigéniques parasitaires associées aux molécules de classe I du CMH présentes à la surface des cellules hépatiques infectées (Cockburn, 2013). De plus ils interviennent dans la protection par la production de plusieurs cytokines dont l' IFN-γ et le TNF-α puis dans une certaine mesure, par une réponse cytotoxique via la production de perforine/granzyme B (Nussler et al., 1991). L'action cytotoxique directe des cellules T CD8+ sur les stades érythrocytaires est encore mal connue et serait probablement limitée par l'absence de molécule du CMH de classe I à la surface des globules rouges.

Parmi les sous populations majeures de lymphocytes T, les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle prépondérant dans le contrôle immunitaire de l'infection par les nombreuses interactions avec les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative via la production de cytokines.

La fonction principale des lymphocytes T CD4+ est de favoriser le développement des réponses des cellules T CD8+ et B, ainsi que des cellules B mémoires. Des études dans les modèles murins ont montré que les cellules T CD4+ se rétractent et forment une population de cellules

T mémoires en dormance, capable de répondre rapidement à une réinfection, en particulier en présence d'un Ag sous la forme d'une infection continue et sous-jacente (Stephens & Langhorne, 2006). Ces lymphocytes sont capables d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 ou vers une réponse de type Th2 en sécrétant les cytokines anti-inflammatoires associées comme l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-2 et les IL-4, IL-10 et TGF-β respectivement (Kurup et al., 2019). Ils agissent aussi bien dans la réponse immunitaire des stades pré-érythrocytaires que érythrocytaires et nécessitent une activation préalable par les CPA afin d'exercer leurs fonctions effectrices. Les fonctions effectrices des cellules T CD4+ sont bien établies, aussi bien dans le paludisme expérimental de l'animal que dans celui de l'Homme. Pour le paludisme de l'Homme, l'existence de lymphocytes T CD4+ fonctionnels spécifiques de CSP exprimant le CD107a marqueur de la dégranulation cytotoxique a été révélée et associées à la protection après l'immunisation de volontaires sains par des piqûres de moustiques infectés par *P. falciparum* (Bijker et al., 2014). Chez des souris déficientes en lymphocytes T CD8+ immunisées par des sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. berghei* irradiés, il a été démontré que les lymphocytes T CD4+ confèrent une protection contre les stades pré-érythrocytaires des 2 souches parasitaires, même en l'absence de lymphocytes T CD8+ (Oliveira et al., 2008b). Les cellules T CD4+ sont également capable de jouer un rôle dans l'acquisition et le maintien de l'immunité protectrice contre les stades sanguins. En effet lors d'une infection érythrocytaire avec *P. chabaudi* et *P. berghei* les cellules dendritiques activent les lymphocytes T qui secrètent de l' IL-12 qui stimule les lymphocytes T CD4+ naïfs afin qu'ils se différencient en lymphocytes Th1 sécréteurs d'IFN-γ (Sponaas et al., 2006; Voisine et al., 2010). De plus des expériences de transfert à des souris naïves de cellules T CD4+ effectrices mémoires dirigées contre MSP-1 de *P. chabaudi* (issues de souris immunisées), a permis de montrer que les cellules T CD4+ effectrices et les T CD4+ mémoires produisent de l'IFN-γ et confèrent une protection partielle à *P. chabaudi* (Stephens & Langhorne, 2010). D'autres études soulignent aussi l'implication des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de la parasitémie, de par leur capacité à induire une immunité à médiation humorale. En effet les stades érythrocytaires de *Plasmodium* permettent aussi d'activer les lymphocytes T CD4+ à l'origine de la production d'Ac (Stephens et al., 2012).

Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ produit par les cellules dendritiques , et majoritairement les cellules NK et les celllules Tγδ aux stades sanguins, peuvent être protectrices de par leur capacité à induire la destruction des parasites par les monocytes/macrophages, neutrophiles (Teirlinck et al., 2011; Ing & Stevenson, 2009; Moretto et al., 2007; Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Perlmann & Troye-Blomberg, 2000).

L'IL-12 produite par les cellules phagocytes mononucléées et par d'autres cellules, contribue à la protection contre l'infection pré-érythrocytaire et sanguine en initiant une réponse Th1 anti-*Plasmodium* chez la souris et le singe. Par contre les cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10, neutralisent la production, et les effets cytopathiques possibles des cytokines pro-inflammatoires (Hoffman et al., 1997; Deloron et al., 1994). Des études sur le paludisme à *P. falciparum* chez l'Homme soulignent l'importance de la balance entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Ainsi, les rapports élevés d'IL-6/IL-10 dans le plasma, à cause de la relative déficience en IL-10, sont annonciateurs chez les sujets où cela survient d'une issue fatale au cours du paludisme sévère (Ho et al., 1995). De plus, les enfants anémiés de certaines régions holoendémiques ont des ratios de IL-10/TNF plus faibles que ceux d'autres enfants ayant un paludisme non compliqué. Ainsi, l'IL-10 induite par l'infection palustre a été considérée comme un marqueur de la résistance à l'infection par *P. falciparum*, soutenant de fait l'hypothèse du rôle de la balance des cytokines anti-inflammatoires (Kurtis et al., 1999). Il demeure que la cytokine qui a un rôle central à la fois dans la protection et la pathogenèse du paludisme est le TNF-α. Cette cytokine ne détruit pas les parasites directement mais exerce sa protection en activant les effets anti-parasitaires de plusieurs cellules effectrices leucocytaires différentes (Hoffman et al., 1997). Elle pourrait exercer une protection en stimulant la sécrétion du NO (Nitric Oxyde) qui lyse les parasites (Kwiatkowski & Perlmann, 1999). Le NO est un inhibiteur de différents stades du cycle de développement des parasites du paludisme, y compris les stades sanguins asexués responsables de l'état clinique de la maladie (Issifou et al., 2003). Toutefois, le NO a aussi été décrit comme ayant quelques effets immunosuppresseurs au cours du paludisme expérimental, résultant en une augmentation de ces infections (Anstey et al., 1996). Plusieurs résultats indiquent aussi l'implication de NO dans la pathogenèse du paludisme cérébral chez l'homme (Taylor-Robinson & Smith, 1999). En outre, la surproduction chronique de NO en association avec l'infection subclinique des enfants exposés au paludisme pourrait contribuer au développement de l'anémie chez ces derniers (Perkins et al., 1999). Néanmoins, les cellules mononucléaires du sang périphérique des enfants ayant eu une exposition préalable au paludisme simple, expriment de plus forts taux de NO synthétase inductible que celles des enfants ayant eu une expérience préalable de paludisme grave (Fried & Duffy, 1996; Gysin et al., 1999). Les résultats de ces deux études soutiennent aussi l'hypothèse du rôle protecteur de NO au cours du paludisme.

3.3- Réponse humorale et immunité de prémunition

L'immunité à médiation humorale constitue l'autre composante de la réponse immunitaire adaptative. Elle est principalement médiée par les Ac et contrairement à la réponse à médiation cellulaire, elle est beaucoup plus stable dans le temps bien que des variations avec l'intensité de la transmission aient été rapportées (Kinyanjui et al., 2003, 2007; Drakeley et al., 2005; Badu et al., 2012). L'infection palustre induit à la fois une production Ac (Immunoglobuline) spécifique et des Ac polyclonaux. Les Ac sériques qui sont fabriqués par les plasmocytes en réponse à cette infection peuvent intervenir à plusieurs stades du cycle parasitaire. Cependant ils interviennent dans la protection en agissant principalement contre les parasites des stades sanguins asexués qui causent les symptômes cliniques du paludisme. Ils ciblent : les Ag impliqués dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes (Richards & Beeson, 2009; Mueller et al., 2013), les Ag variables (principalement *Pf*EMP1) impliqués dans le processus de cytoadhérence (Chan et al., 2014, 2019). Les Ac pourraient également détruire les mérozoïtes libres (avant qu'il envahissement des érythrocytes) ou les globules rouges infectés avant la cytoadhésion (O'Donnell et al., 2001; Dutta et al., 2009; Duncan et al., 2012) par des mécanisme d'ADCC, inhibition de leur développement (ADCI) (Boyle et al., 2017) et d'opsono-phagocytose (Hill et al., 2013; Chan et al., 2014; Osier et al., 2014) par les macrophages, les neutrophiles et éosinophiles (**Figure 14)**. Cette gamme de fonctions effectrices serait médiée par le fragment Fc (fragment cristallisable) de l'Ac (Jafarshad et al., 2007).

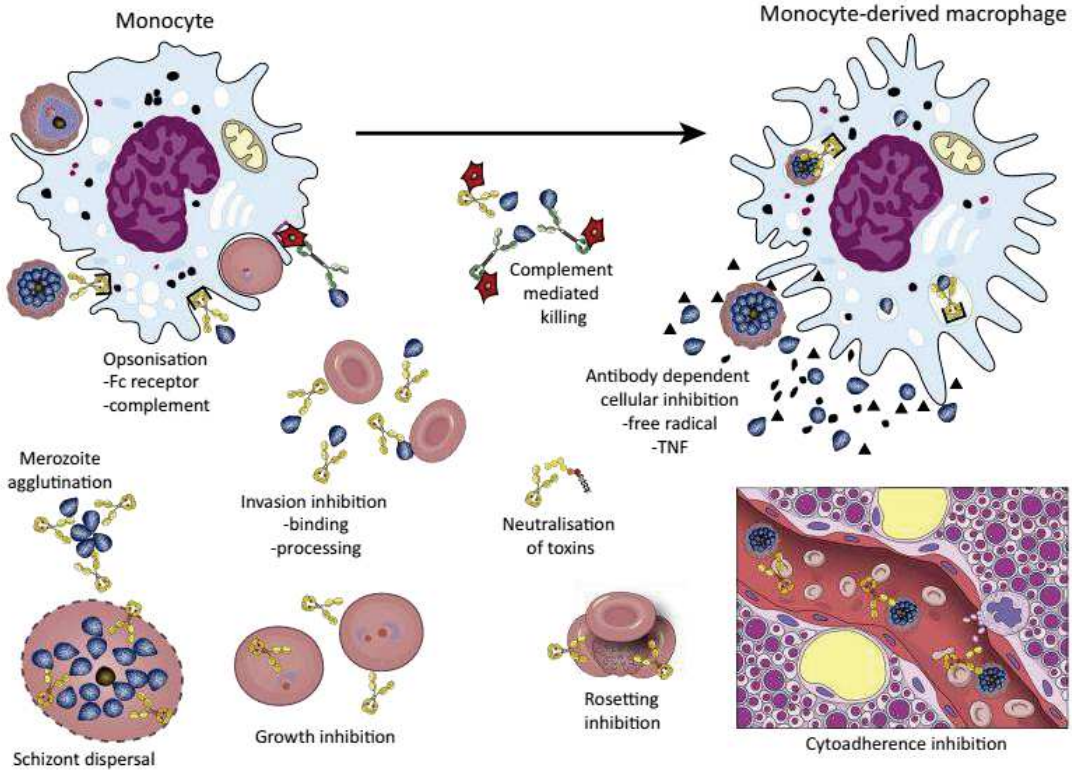


Figure 14: Mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale dirigée contre les stades érythrocytaires.
Les anticorps dirigés contre les mérozoïtes peuvent prévenir l'invasion des érythrocytes; fixer le complément à l'origine de la lyse les mérozoïtes; opsoniser les mérozoïtes afin qu'ils soient adsorbés par les cellules phagocytaires; et stimuler les monocytes et les macrophages pour libérer des molécules qui tuent les parasites érythrocytaires. Les anticorps dirigés contre les globules rouges parasités peuvent bloquer la cytoadhérence de ces globules rouges, perturber les rosettes que les globules rouges parasités forment avec des globules rouges non infectées, et opsoniser ces globules rouges parasités pour permettre leur adsorption par les cellules phagocytaires. Les anticorps reconnaissant la surface des mérozoïtes activent les cellules effectrices, ce qui a pour effet de diminuer la parasitémie (ADCI). Adapté de (Teo et al., 2016)

Le transfert passif d' Ig de donneurs immuns suggérait déjà il y a bien longtemps, que les Ac pouvaient conférer une protection contre le paludisme (Cohen et al., 1961b; Sabchareon et al., 1991). Cette protection est relativement courte, non stérilisante et nécessite une exposition répétée au parasite pour être efficace.

Ces Ig, majoritairement de la classe des IgG seraient les plus performantes dans la réduction de la parasitémie et les manifestations cliniques de la maladie. Le traitement de patients infectés par *P. falciparum* à l'aide d'extrait d'IgG provenant d'adultes immuns conduisait à une réduction des symptômes cliniques montrant ainsi que ces IgG pourraient être impliquées dans des phénomène d'ADCI (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992b; Bouharoun-Tayoun et al., 1990). Parmi les 4 sous-classes d'IgG, les IgG1 et IgG3 peuvent favoriser la liaison des

composants du complément (Boyle et al., 2017) et se lier avec une grande affinité aux récepteurs Fc se trouvant sur les cellules phagocytaires d'où leurs nom d'Ac « cytophiles »(Vidarsson et al., 2014).

Chez les individus naturellement protégés, et asymptomatiques résidant en zone d'endémie palustre, les Ac cytophiles IgG1 et IgG3 sont prédominants (Dobaño et al., 2019; Stanisic et al., 2009; Oeuvray et al., 2000). Ils protègent contre l'accès palustre (Nebie et al., 2008) et le taux de guérison est proportionnel à celui des IgG3 (Roussilhon et al., 2007; Dechavanne et al., 2017).

Des études immuno-épidémiologiques ont montré que l'immunité protectrice dépend d'une concentration élevée d'IgG et des Ac cytophiliques IgG1 et IgG3 dirigés contre certains Ag candidats vaccins des stades sanguins , notamment *Pf*AMA-1 (Stanisic et al., 2015; Polley et al., 2004; Stanisic et al., 2009; Akpogheneta et al., 2008), *Pf*MSP-1, *Pf*MSP-3 (Murungi et al., 2013; Wang et al., 2016; Roussilhon et al., 2007) et *Pf*GLURP (Courtin et al., 2009). Des observations récentes au Ghana ont révélé que les taux élevés d'IgG anti-*PfMSP-3* et anti-*Pf*GLURP augmentent avec l'âge et serait associés à une réduction de la densité parasitaire, suggérant une probable protection contre la maladie (Amoah et al., 2017). Ces observations viennent corroborer d'autres études antérieures dans les mêmes zones endémiques (Sirima et al., 2011; Dodoo et al., 2008).

Il faut noter aussi que chez l'Homme comme chez l'animal, le paludisme fait aussi intervenir d'autres classes d'Ac, notamment les IgM qui peuvent jouer un rôle dans la protection, par leur médiation dans l'activation du complément (Boyle et al., 2019; Krishnamurty et al., 2016; Arama et al., 2015) ; et les IgE qui ont un rôle ambivalent, étant associées aussi bien à la pathogénèse des formes graves qu'à la protection contre le paludisme (Kumsiri et al., 2016; Calissano et al., 2003). Les récentes études chez la souris ont démontré que cette implication dans les formes sévères du paludisme serait liée à la capacité des complexes immuns formés par les IgE à induire la production de TNF-α par les monocytes et éventuellement d'autres cellules effectrices (les neutrophiles) après la fixation aux récepteurs cellulaires Fcε (Porcherie et al., 2011; Yan et al., 2016). Ces observations restent encore à être démontrées chez l'Homme. Toutefois des études appuient l'idée que les IgE spécifiques protègent contre le paludisme (Calissano et al., 2003; Farouk et al., 2005; Duarte et al., 2007). Une étude réalisée dans le groupe ethnique Fulani (moins vulnérables aux infections palustres) a révélé que les Peuls qui étaient moins parasités, avaient des IgG et IgE spécifiques plus élevées que les Dogons plus sensibles (Farouk et al., 2005). Cette ambivalence des IgE dans le paludisme, s'explique par la diversité génétique des populations humaines, mais aussi par les différentes souches.

Des études récentes ont montré que les Ag variants de surface (*variants surface antigen,* VSA) tels que *Pf*EMP1, STEVORs, et RIFINs. induisent aussi des réponses protectrices (Gonzales et al., 2020). Ces Ag de grande importance pour le développement de l'immunité anti- palustre humorale des stades sanguins asexués sont exprimés à la surface des érythrocytes infectés et codés par la famille multigénique de *P. falciparum,* appelée *var* (Baruch et al., 1995; Su et al., 1995). Ces Ag possèdent une variabilité qui permet aux parasites d'échapper à la réponse immune.

La variabilité antigénique est par conséquent, un facteur majeur de la virulence du parasite (Newbold, 1999). En effet la variété du répertoire antigénique et le taux d'Ac sont importants en terme de réponses protectrices , les individus qui possèdent un plus grand répertoire sont mieux protégés des formes sévères (Rono et al., 2013; Dent et al., 2015). Les réponses protectrices les plus fortes sont généralement observées pour les Ac ciblant cette catégorie d'Ag (Liu et al., 2018). En effet il a été démontré que les IgG contre *Pf*EMP1 sont acquises au cours des premières années de la vie (Turner et al., 2015; Chan et al., 2017), et que leur ampleur augmente avec l'âge et l'exposition (Chan et al., 2012; Kanoi et al., 2018). Dans une cohorte d'enfants de Papouasie-Nouvelle-Guinée, les niveaux d'Ac IgG anti-*Pf*EMP1 étaient corrélés positivement avec la protection à la fois chez les jeunes enfants (1-4 ans) et les enfants plus âgés (5-14 ans) (Chan et al., 2017). De plus, au cours de cette étude, les Ac contre les Ag des mérozoïtes n'étaient associés à la protection que chez les enfants plus âgés de cette cohorte. Ces résultats suggèrent que les Ac contre *Pf*EMP1 peuvent constituer une première ligne de défense contre le paludisme grave au début de la vie, tandis que les Ac contre d'autres Ag parasitaires peuvent contribuer à la protection contre le paludisme non compliqué chez les enfants plus âgés. Cela peut sembler contre-intuitif étant donné que les polymorphismes dans les Ag des mérozoïtes fournissent une variation de séquence relativement modeste en comparaison de la diversité extrêmement élevée parmi les variantes de *Pf*EMP1, tant au niveau des séquences d'acides aminés que de la composition des domaines (Gonzales et al., 2020). Cependant seule une petite fraction des domaines de *Pf*EMP1 est impliquée dans la pathogénèse du parasite (Lavstsen et al., 2012; Kessler et al., 2017).

En règle générale, les Ac contre ces différents Ag semblent s'accumuler a des vitesses variables, et donc pour assurer une protection efficace, il faut qu'ils puissent atteindre un certain seuil et perdurer dans le temps. Il existe des preuves qui soutiennent l'hypothèse selon laquelle il y a un seuil d'immunité nécessaire pour assurer la protection contre le paludisme (Stanisic et al., 2015; Murungi et al., 2013). Dans ces deux études réalisées au Kenya et en Papouasie-Nouvelle Guinée, comparant des enfants avec différents niveaux d'exposition, les Ac étaient

clairement plus élevés chez les enfants plus âgés ou provenant de zone à forte transmission, comparé aux jeunes enfants. De plus ce taux d'Ac était associé à une immunité clinique significative (Stanisic et al., 2015; Murungi et al., 2013). Les estimations de la demi-vie de la réponse en Ac chez les enfants africains après le pic de la réponse (la première phase de décroissance) ont estimé de courtes demi-vies de la réponse en Ac pour les antigènes des mérozoïtes et des gamétocytes de *P. falciparum* allant de moins de 2 semaines (Kinyanjui et al., 2007) à 12 semaines (Bousema et al., 2010). Des gammes similaires de réponse Ac anti-mérozoïtes de *P. falciparum* (2-8 semaines) ont été trouvées chez des enfants gambiens asymptomatiques pendant la saison sèche (Akpogheneta et al., 2008). Toutefois une modélisation mathématique montre que la décroissance biphasique observée serait peut être le résultat de cellules sécrétrices d'Ac à courte durée de vie (demi-vie de 2 à 10 jours) qui augmentent les niveaux d'Ac post-infection et de la présence de cellules sécrétrices d'Ac à longue durée de vie qui maintiennent les réponses dans le temps (White et al., 2014).

Les preuves de l'existence de réponses Ac (persistante) au paludisme proviennent de l'observation d'une augmentation rapide des réponses Ac spécifiques de *P. falciparum* lors d'une réexposition après la saison sèche ou des périodes prolongées de faible transmission (Vande Waa et al., 1984; Migot et al., 1993). Les études sur l'infection palustre humaine contrôlée (CHMI) ont montré que des individus non parasités exposés précédemment (>5 ans auparavant) présentaient une augmentation plus forte des titres d'anticorps que les volontaires naïfs (Obiero et al., 2015), suggérant que les individus peuvent générer et conserver des cellules B mémoires (CBM). Des études épidémiologiques ont montré que les CBM comme les anticorps antipaludiques, sont acquis lentement après des infections répétées dans les zones d'endémie palustre, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire acquise (Muellenbeck et al., 2013; Weiss et al., 2012, 2011; Ndungu et al., 2012; Nogaro et al., 2011; Wipasa et al., 2010). Cependant, les études épidémiologiques susmentionnées ont montré que les Ac spécifiques de l'Ag et les CBM ne sont pas toujours corrélés. Notamment, des études sur la réponse immunitaire à la protéine VAR2CSA ont montré que les femmes enceintes multigravides peuvent ne pas avoir d'Ac spécifiques du VAR2CSA au début de la grossesse, alors qu'elles ont des CBM détectables plusieurs années auparavant (Ampomah et al., 2014). De même, il a été démontré que les Ac dirigés contre les Ag pré-érythrocytaires et mérozoïtes diminuent à la fin de la période de transmission, alors que les CBM se maintiennent pendant des décennies (Ndungu et al., 2012; Wipasa et al., 2010). En outre, des études sur l'antigène AMA1 chez des voyageurs suédois ont également montré la présence de CBM jusqu'à 16 ans après l'infection en l'absence d'anticorps (Ndungu et al., 2013). L'ensemble de ces études

fournissent des preuves que les réponses Ac générées par les CBM sont potentiellement acquises à vie et les CBM sont détectables des décennies plus tard chez des individus auparavant naïfs suggère que les réponses MBC sont générées et maintenues malgré toute réexposition ou stimulation antigénique persistante.

3.4 Facteurs de variation de l'immunité anti *Plasmodium*

3.4.1 Facteurs intrinsèques

3.4.1.1 Facteurs liés à l'hôte

- **Facteurs liés à l'âge et à l'intensité de transmission**

Les populations humaines, vivant en zone hautement endémique où le paludisme prévaut toute l'année, développent une immunité protectrice (prémunition) suite à une exposition régulière et répétée aux parasites (Ndungu et al., 2015; Bejon et al., 2014, 2009; Mosha et al., 2013; Marsh & Kinyanjui, 2006). Elle est labile (elle disparaît entre 1 à 2 ans si le sujet quitte la zone d'endémie) et son développement est progressif (Griffin et al., 2015), avec l'apparition successive d'une immunité clinique (ou « anti-maladie ») offrant une protection contre les formes simples et compliquées de la maladie, suivie d'une immunité anti-parasitaire permettant de réduire la parasitémie en contrôlant la multiplication parasitaire.
L'acquisition de cette immunité est multi factorielle d'autant plus que le devenir de l'infection palustre est lié à l'âge et au sexe, aux maladies chronique concomitantes, à l'origine ethnique, aux co-infections et aux divers polymorphismes génétiques. Elle est mise en évidence par la diminution de l'incidence du paludisme grave et non compliqué avec l'augmentation de l'âge, et une réduction de la densité moyenne des parasites. Ainsi les enfants de moins de 5 ans dont le niveau d'immunité protectrice est plus faible sont les plus susceptibles de développer une parasitémie élevée avec des risques de complications et de décès (Marsh & Kinyanjui, 2006), alors que les enfants plus âgés et les adultes, bénéficient d'une protection. Cependant les nourrissons (< 6 mois) peuvent bénéficier d'une certaine protection, probablement dûe aux Ac transmis par leur mère, mais aussi à la présence d'hémoglobine fœtale au sein des érythrocytes (Amaratunga et al., 2011) qui est responsable d'une représentation altérée de *Pf*EMP1 à la surface des globules rouges infectés et donc d'une cytoadhérence altérée. D'autres études ont invoqué, les constituants du lait maternel riche en Ac et pauvre en acide para-aminobenzoïque essentiel à la croissance du parasite (Kicska et al., 2003; Kassim et al., 2000).

Toutefois, la plupart de ces études ont été réalisées dans des zones d'endémie palustre, mais l'impact de l'âge sur l'acquisition de l'immunité peut tout aussi bien varier avec l'âge de la première exposition qu'avec le degré de la transmission. Les premières études sur des migrants avaient démontré que les réponses Ac sont acquises plus rapidement chez les adultes que chez les enfants (Baird et al., 1993, 1991), et des analyses ont suggéré que l'âge est un facteur important influençant la susceptibilité au paludisme grave (Griffin et al., 2015; Carneiro et al., 2010). A l'inverse des études menées dans des zones d'endémie du paludisme d'Afrique ont suggéré que les nourrissons acquièrent l'immunité plus rapidement que les enfants plus âgés (Aponte et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que la prévalence et les niveaux d'Ac cytophiles (IgG1 et IgG3) à des Ag de *P. falciparum* augmentaient avec l'âge en zone de transmission instable, mais à des niveaux moins élevés que chez des jeunes enfants en zone de transmission stable (Noland et al., 2015).

Ces différentes études viennent donc confirmer que l'âge et très certainement l'intensité de la transmission sont liés dans l'acquisition de l'immunité anti-*Plasmodium* (Kobayashi et al., 2019; McCallum et al., 2017; King et al., 2015).

Mais d'autres facteurs liés à l'appartenance ethnique et à l'état physiologique de l'hôte peuvent également intervenir.

- **Facteurs liés au groupe ethnique et à la susceptibilité génétique**

Des différences dans l'immunité contre le paludisme ont été observées dans des groupes ethniques sympatriques vivant en Afrique de l'Ouest. En effet l'examen des caractéristiques spécifiques de la réponse immunitaire au paludisme chez les Peuls a établi une immunité différente par rapport aux Dogons du Mali ou aux Mossi du Burkina Faso malgré une exposition similaire au parasite (Troye-Blomberg et al., 2020). Les Peuls réagissent mieux aux Ag de *P. falciparum*, avec des taux d'Ac (IgG, IgM et IgE) spécifiques plus élevés que leurs homologues vivant en sympatrie (Cherif et al., 2017, 2016, 2015; Arama et al., 2015; Boström et al., 2012; Vafa et al., 2009; Bolad et al., 2005). Cette réactivité active aux Ag de *P. falciparum* implique un nombre élevé de certaines cytokines pro-inflamatoires (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF et IFN-γ) et de cellules dendritiques activées (Arama et al., 2011) et des Ac cytophiles (IgG1 et IgG3) (Boström et al., 2012). En outre les Peuls ont systématiquement montré des niveaux significativement plus élevés des Ac cytophiles (IgG1 et IgG3) que ceux des autres ethnies (Bolad et al., 2005; Boström et al., 2012; Dolo et al., 2012).

L'ensemble de ces données conduit à proposer l'hypothèse que l'existence de ces différences dans les réponses immunes humorales et cellulaires serait probablement liée à des facteurs génétiques qui contribueraient aux différences inter-ethniques de susceptibilité au paludisme.

Les différences génétiques inter-ethniques ont montré que les Peuls par rapport à leurs homologues Dogons et Mossi ont un bagage génétique distinct (Lulli et al., 2009; Vafa et al., 2007; Modiano et al., 2001). Les Peuls sont un groupe à prédominance musulmane et ont une préférence pour les mariages intra-linéaires. Des études génétiques ont révélé que la prévalence des gènes de résistance au paludisme déjà connus est plus faible chez les Peuls que dans les autres populations ethniques. Ce qui n'explique pas leur meilleure protection et qu'ils soient moins susceptibles de faire des accès palustres (Modiano et al., 2001; Mangano et al., 2015).

Toutefois il faut dire que le paludisme est la maladie infectieuse qui a le plus façonné le génome humain, favorisant l'évolution convergente d'une grande diversité de variations génétiques, touchant les globules rouges mais aussi le système immunitaire (Harp et al., 2020; Kwiatkowski, 2005). Les distributions géographiques, du paludisme et des variants impliqués dans les hémoglobinopathies telles que la drépanocytose, l'ovalocytose, les thalassémies, et la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) sont similaires, ce qui suggère que ces troubles confèrent un avantage sélectif aux individus vivant en zone d'endémie palustre (Allison, 2009; López et al., 2010).

En effet, des études ont montré que des individus vivant dans différentes zones endémiques du paludisme peuvent avoir une protection ou être plus susceptibles de faire des accès palustres (Mbanefo et al., 2017). Une étude réalisée en Thaïlande (Asie) a confirmé l'affirmation selon laquelle les patients présentant un déficit en G6PD n'avaient aucune protection contre l'infection par *P. falciparum*. De plus, les patients atteints de paludisme présentant un déficit en G6PD avaient un nombre de monocytes plus élevé que ceux qui ne présentaient pas de déficit en G6PD. Alors que la carence en G6PD qui est tout aussi endémique en Afrique, a aussi révélé une protection contre le paludisme (Uyoga et al., 2015). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les patients africains déficients en G6PD ont une activité enzymatique relativement plus élevée qui leur confère des conséquences plus légères par rapport aux personnes d'origine asiatique. De nombreuses autres études et revues se sont intéressées aux mécanismes génétiques contrôlant la sévérité des manifestations cliniques du paludisme et notamment leurs conséquences sur l'immunité contre le paludisme (Harp et al., 2020; Kariuki & Williams, 2020; Luzzatto, 2015; Hedrick, 2012; Verra et al., 2007). Harp et al. (2020) a indiqué que l'expression différentielle des cytokines CXCL10, TNF-α, CCL2, IL-8 et IL-6 était étroitement liée aux différents génotypes d'hémoglobine et à la gravité de l'infection à *Plasmodium* et que ces

niveaux de cytokines peuvent être prédictifs de la sensibilité au paludisme grave ou à la sévérité. Tout compte fait, la protection contre le paludisme et les variations immunologiques observées dans les différentes zones endémiques du paludisme se manifesteraient par : les traits génétiques (ovalocytose, elliptocytose..) qui altèrent la structure de la membrane du globule rouge ayant un impact sur l'invasion de l'érythrocytes par *P falciparum* et ceux des anomalie affectant la physiopathologie du globule rouge pouvant altérer la croissance du parasite par la destruction prématurée des globules rouges infectés exprimant le trait ou par une infection abortive (drépanocytose, thalassémie, HbS, HbE, HbF, G6PD) (Herbert Opi et al., 2014; Williams et al., 2005; Ayi et al., 2004)

- **Les co-infections**

Les co-infections peuvent elles aussi affecter le développement des symptômes en altérant le fonctionnement du système immunitaire. Il a été démontré que l'infection à VIH-1 augmente le taux d'accès fébriles palustres suite à la diminution du nombre de lymphocytes T-CD4 (González et al., 2012). L'association entre les helminthes transmissibles par le sol et l'apparition de symptômes cliniques chez les enfants infectés par *Plasmodium* est moins évidente : l'infection par l'ankylostomiase semble augmenter les symptômes du paludisme, tandis que l'infection par *Ascaris lumbricoides* semble diminuer les symptômes (Nacher, 2012). La co-infection par *Plasmodium* et *Schistosoma* est fréquente, mais les effets sur l'immunité sont complexes. Certaines études suggèrent que cette co-infection favorise le développement de l'immunité antipaludique (Diallo et al., 2010; Lyke et al., 2012), tandis que d'autres ont trouvé des niveaux plus faibles d'Ac antipaludiques protecteurs chez les porteurs de *Schistosoma haematobium* (Courtin et al., 2011).

3.4.1.2. Facteurs parasitaires

La virulence de *P. falciparum* pour son hôte, se caractérise par sa capacité à se multiplier, à adhérer aux tissus périphériques, à produire des substances toxiques ou à induire des réponses immunitaires délétères. L'infection à *Plasmodium*, est capable de déprimer le système immunitaire (Hviid et al., 1992). Cela s'explique par le fait que la libération de l'hémozoïne lors de la rupture des schizontes provoque une action immunosuppressive sur les cellules phagocytaires, en particulier les macrophages (Scorza et al., 1999). Ce phénomène d'immunosuppression est amplifié par des densités parasitaires maximales que peuvent atteindre différentes souches et isolats de *Plasmodium* (Gatton & Cheng, 2004) ainsi que le

seuil pyrogénique au-delà duquel une réponse clinique se déclenche chez l'hôte (Gatton & Cheng, 2002). Des expériences ont montré des différences de réaction aux isolats de *P. falciparum.* Les isolats de *P. falciparum* provenant de personnes atteintes de paludisme sévère génèrent des taux de multiplication trois fois plus élevés que ceux provenant de patients atteints de paludisme non compliqué (Chotivanich et al., 2000). Ainsi les manifestations cliniques et les réponses immunitaires associées peuvent être différentes selon la souche parasitaire.

En effet au sein d'une seule espèce de *Plasmodium*, les polymorphismes alléliques entraînent la coexistence de différents génotypes. Les polymorphismes alléliques ou les polymorphismes génétiques dans certain loci protéiques donnent lieu à des formes antigéniques distinctes de la protéine chez différentes souches de parasites. Ce type de diversité (diversité antigénique/polymorphisme antigénique/hétérogénéité des souches) sous-tend le concept d'immunité spécifique à la souche (Day & Marsh, 1991). Selon cette hypothèse, l'immunité à *P. falciparum* est essentiellement spécifique à la souche (Doolan et al., 2009) et un individu devient immunisé après avoir été exposé à un grand nombre de souches circulant dans la zone où il vit. Des preuves d'une immunité spécifique à la souche se sont accumulées à partir d'études sur des modèles animaux, en particulier d'infections expérimentales chez le singe (Makobongo et al., 2006; Jones et al., 2000), ainsi que des infections induites chez l'Homme. Dans le cas du paludisme expérimental chez l'Homme, une infection primaire par une souche de parasite a provoqué une réponse immunitaire capable de protéger contre cette souche, mais pas contre l'infection par une souche différente (Jeffery, 1966). Cependant une récente étude n'a pas appuyé cette thèse et stipule que la protection est associée à l'opsonisation médiée par les Ac aussi bien dans les souches sauvages qu'au sein d'une souche transgénique (Hill et al., 2016).

Un autre concept qui sous-tend les variations individuelles de l'immunité anti-*Plasmodium*, est la variation antigénique.

Le concept de variation antigénique phénotypique est distinct de celui d'immunité spécifique à la souche. De manière générale, le terme variation antigénique fait référence aux changements dans le phénotype antigénique par expression régulée de différents gènes d'une population clonale de parasites au cours d'une infection naturelle (Doolan et al., 2009).

La démonstration classique de la variation antigénique a été réalisée pour la première fois chez *P. knowlesi* par Brown et Brown en 1965 (Brown & Brown, 1965), lorsqu'il a été démontré que les infections érythrocytaires chroniques de *P. knowlesi* consistaient en une succession de variants antigéniques. cela a servi de base à des études sur la variation antigénique et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte comme explication de l'apparition apparemment lente de

l'immunité naturellement acquise. Dans ce scénario, le parasite *Plasmodium* échappe à l'immunité de l'hôte en variant le caractère antigénique des érythrocytes infectés.

Des études réalisées sur les protéines parasitaires à l'origine de l'invasion des globules rouges, à partir d'isolats prélevés sur des cas de paludisme asymptomatiques, simples et graves dans diverses régions géographiques (Chan et al., 2019, 2014; Maketa et al., 2015; Boutlis et al., 2003), ont permis de mettre en évidence des différences polymorphiques aux niveaux de ces Ag de surface impliqués dans l'invasion des érythrocytes, à savoir la famille des protéines de surface des mérozoïtes (Beeson et al., 2016) notamment AMA-1, MSP-1 et EBA-175, et les Antigen Variant de Surface (VSA) du parasite situés sur la membrane cellulaire des érythrocytes infectés notamment *Pf*EMP1(Leech et al., 1984), les repetitive interspersed repeats (RIFIN) (Fernandez et al., 1999; Kyes et al., 1999), les subtelomeric variant open reading frame (STEVOR) (Kaviratne et al., 2002) et les surface-associated interspersed gene family proteins (SURFIN) (Winter et al., 2005). Pour ces derniers les réponses Ac protectrices peuvent être plus importantes comparé à celles dirigées contre les Ag des mérozoïtes.

Des études ont montré que l'acquisition de l'immunité protectrice et le niveau des réponses Ac nécessaire sont différents. Chez les jeunes enfants ou les enfants peu exposés au paludisme, les niveaux d'Ac dirigés contre les Ag de la surface des mérozoïtes peuvent être inférieurs au seuil requis pour fournir une immunité protectrice suffisante (Stanisic et al., 2015; Murungi et al., 2013), alors que ceux dirigés contre les Ag VSA, de la surface des érythrocytes infectés en particulier *Pf*EMP1 jouent un rôle plus précoce dans l'immunité acquise contre le paludisme (Chan et al., 2017). En effet dans cette étude réalisée dans deux cohortes d'enfants en Papouasie-Nouvelle-Guinée, les Ac contre les Ag de surface de l'érythrocyte infecté étaient systématiquement associés à une réduction du risque de paludisme chez les enfants plus jeunes et plus âgés. Par contre des associations protectrices d'Ac contre les Ag de surface du mérozoïte n'ont été observées que chez les enfants plus âgés, suggérant ainsi qu'une plus grande exposition est nécessaire pour les Ac protecteurs contre les Ag du mérozoïte (Chan et al., 2017).

Cette différence peut être aussi observée entre Ag VSA. Chez des enfants du Kenya, les IgG contre *Pf*EMP1 étaient associées à la protection contre le paludisme, alors que les Ac contre d'autres VSA ne l'étaient pas (Chan et al., 2012), ce qui suggère que les protéines *Pf*EMP1 sont la cible principale des réponses immunitaires protectrices contre les protéines du parasite exprimées à la surface des érythrocytes.

De tous les Ag de surface des érythrocytes infectés, le *Pf*EMP1 est le plus prépondérant et le mieux étudié de par son implication dans l'acquisition de l'immunité anti-*Plasmodium* (Gonzales et al., 2020). Il peut se lier à différents récepteurs des hôtes permettant ainsi la

séquestration des érythrocytes infectés dans les différents organes vitaux, ce qui contribue à la pathogénèse. *Pf*EMP1 est codé par la famille des multigènes *var*, qui subit une variation antigénique clonale due à une pression immunitaire sélective (Chan et al., 2012). Le changement de gènes *var* facilite l'évasion aux réponses immunitaires acquises et entraîne divers phénotypes adhésifs des érythrocytes infectés (Claessens et al., 2014; Smith et al., 1995; Roberts et al., 1992). Les Ac dirigés contre les variants de *Pf*EMP1 seraient responsables de la commutation entre les gènes *var* dans un processus hiérarchique (Abdi et al., 2017), les parasites exprimant des *Pf*EMP1 conservés et virulents sont surclassés par des variants moins virulents et diversifiés qui persistent dans les infections chez les individus semi-immuns. La famille des gènes *var* peut être divisée en trois groupes principaux (A, B et C) et un groupe chimère B/A en fonction de leur localisation génomique et le sens de leur transcription (Lavstsen et al., 2003). L'expression du groupe A est associée aux formes sévères de la maladie, alors que ceux du groupe C semble être observés chez des enfants plus âgés et asymptomatiques (Kaestli et al., 2006; Rottmann et al., 2006; Falk et al., 2009). Cette expression différentielle suggère qu'une fois que le répertoire initial des gène *var* est épuisé par une réponse immunitaire forte, le groupe C ou un tout autre groupe qui n'intervient pas dans la cytoadhérence des organes vitaux, pourrait prévaloir dans les infections asymptomatiques.

3.4.2 Facteurs extrinsèques

De nombreux facteurs environnementaux tels que des facteurs chimiques, biologiques et physiques peuvent influencer l'activité immunitaire (MacGillivray & Kollmann, 2014) et les réponses vaccinales (Zimmermann & Curtis, 2019). Les expositions environnementales peuvent entraîner une modification épigénétique qui intervient dans l'activation de lymphocytes T (Bruniquel & Schwartz, 2003) et de la réponse mémoire (Northrop et al., 2006). L'exposition à des agents ayant des activités immunotoxiques ou modulatrices altéreront ainsi les fonctions immunitaires. Fait intéressant, certaines études ont montré que les réponses Ac à certains vaccins spécifiques (vaccins contre le pneumocoque, la rage et la typhoïde) sont influencées par le mois d'administration du vaccin alors que dans d'autres cas, aucune association entre le mois d'administration du vaccin et les réponses anticorps à la vaccination contre la diphtérie, Hépatite B et le tétanos ont été observées (Moore et al., 2006a).

Ces études suggèrent qu'un facteur environnemental variable selon la saison peut avoir un effet co-stimulant sur les réponses immunitaires. Les changements de température, l'exposition diurne au soleil et les niveaux de vitamine D circulante, la disponibilité de la nourriture et

l'exposition à des agents infectieux peuvent faire partie des différents facteurs environnementaux saisonniers qui peuvent agir sur le système immunitaire. Il a été suggéré que ces variations dans les réponses vaccinales peuvent s'expliquer par des différences d'exposition aux UV (Termorshuizen et al., 2002). Néanmoins, exposer des volontaires sains aux UVB sur cinq jours consécutifs avant la vaccination Hépatite B n'entraîne pas de différence entre les titres Ac ou réponses vaccinales cellulaires (dans un test de stimulation lymphocytaire) entre individus exposés aux UVB- et individus non-exposés aux UVB (Sleijffers et al., 2001).
L'évaluation de la saisonnalité, de la vitamine D et des maladies infectieuses a été explorée en ce qui concerne la tuberculose en Afrique du Sud, révélant une variation saisonnière réciproque de la concentration sérique de 25-hydroxyvitamine-D et de l'incidence de la tuberculose (Martineau et al., 2011).

Un autre des facteurs extrinsèques, est celui de l'exposition aux piqûres d'arthropode vecteurs (notamment les moustiques). Les piqures des moustiques ont des propriétés immunogéniques et pourraient donc intervenir dans la modulation de l'acquisition et maintien de la réponse immune anti-*Plasmodium* chez les personnes vivant en zone d'endémie. A ce jour très peu d'études ont été menées aussi bien en population que chez des modèles expérimentaux pour étudier cette hypothèse.

4- Piqûres de moustiques et réponses immunes de l'homme : implications de la salive dans la transmission du paludisme

Les moustiques femelles, à l'instar d'autres arthropodes vecteurs ont adopté au cours de l'évolution, l'hématophagie comme régime alimentaire (Ribeiro, 1995; Adams, 1999). Pour ces arthropodes cela implique, non seulement d'être fréquemment au contact des hôtes vertébrés mais aussi et surtout une adaptation morphologique, physiologique et biochimique permettant le bon déroulement du repas sanguin. En effet l'alimentation sanguine des arthropodes se divise en deux modèles. Les solénophages (moustiques, triatomides et punaises), qui utilisent leurs pièces buccales en forme de stylet pour se nourrir grâce à l'hémorragie provoquée au niveau d'un capillaire ou veinule, et les telmophages (les phlébotomes, les glossines et les tiques) qui recueillent le liquide nutritif dans une « mare de sang » par la lacération des capillaires sanguins (Lavoipierre, 1965; Bergman, 1996).

Toutefois quel que soit le modèle d'alimentation utilisé, les arthropodes doivent trouver des solutions pour contrer les réponses hémostatiques, inflammatoires et immunitaires des hôtes vertébrés. Pour cela, ils secrètent de la salive contenant des protéines pharmacologiquement actives (Ribeiro, 1995; Champagne, 2004). Ces protéines qui sont sécrétées avec la salive dans la peau de l'hôte lors de la piqûre, vont créer un ensemble de modifications physiologiques et systémiques (Arcà & Ribeiro, 2018), ce qui va favoriser le bon déroulement du repas sanguin de l'arthropode. Certaines de ces protéines pourront par leurs propriétés immunogéniques (Peng & Simons, 2004), moduler la réponse immune de l'hôte, favoriser ou engendrer une réponse immune spécifique, de type Ac ou cellulaire (Briant et al., 2014; Schneider et al., 2011; Donovan et al., 2007) et aussi influencer la transmission de pathogène (Pingen et al., 2017; Styer et al., 2011; Choumet et al., 2007).

4.1- Propriétés pharmacologiques et rôles des protéines salivaires

Des études transcriptomiques, génomiques et protéomiques ont révélé une grande diversité de protéines salivaires selon les arthropodes, et qui diffèrent selon le mode d'alimentation. Chez les moustiques, de nombreuses études du même type (Arcà & Ribeiro, 2018; Arcà et al., 2017, 2007, 2005; Choumet et al., 2007; Calvo et al., 2007; Ribeiro et al., 2018, 2016, 2007) révèlent que la salive contient environ 100-150 protéines. Par exemple, chez les moustiques femelles (*Anopheles* et *Aedes)*, dont le repas de sang ne dure que quelques minutes (2 minutes environ) (Chadee & Beier, 1997), le transcriptome prédit 55-100 protéines

secrétées (Ribeiro et al., 2007). Néanmoins certaines protéines sont ubiquitaires et communes à plusieurs espèces et/ou familles d'arthropodes (Fontaine et al., 2011a; Calvo et al., 2010; Calvo. et al., 2007; Calvo et al., 2006; Ribeiro et al., 2004). Ces protéines salivaires ont pour rôle principal de faciliter le bon déroulement du repas sanguin sur l'hôte, en inhibant les réponses physiologiques initiées par la piqûre des arthropodes.

4.1.1 Rôle pharmacologique de la salive des arthropodes

La piqûre des insectes hématophages induit chez l'hôte vertébré des réponses physiologiques de type hémostatique, inflammatoire et immunitaire.

La réponse hémostatique regroupe l'ensemble des processus ou mécanismes biologiques concourant à la cessation de l'hémorragie et au maintien de la fluidité du sang dans les vaisseaux. Elle fait suite aux lésions des tissus vasculaires et est la première ligne de défense de l'hôte mise en place pendant la piqûre par un vecteur hématophage. Elle est caractérisée par un ensemble de plusieurs processus redondants tels que, l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et la coagulation (Francischetti, 2010; Fontaine et al., 2011a; Chmelar et al., 2012)

4.1.1.1 Inhibition de l'agrégation plaquettaire

Suite à la lésion causée par les pièces buccales de l'arthropode, l'ADP (Adénosine Di-Phosphate) est libéré par les cellules endothéliales et sous-endothéliales endommagées. Cet ADP va déclencher l'activation des plaquettes sanguines qui changent alors de forme et libèrent deux puissants vasoconstricteurs, la sérotonine et le thromboxane A2 (TXA2) (Watson et al., 2005). Les plaquettes vont par la suite s'agréger, alors que la sérotonine et le TXA2 vont réduire le flux de sang en favorisant une vasoconstriction des vaisseaux. Ceci va alors aboutir à la formation en quelques secondes, d'un thrombus blanc qui va boucher l'ouverture créée par la piqûre de l'arthropode, ce qui va empêcher ce dernier d'aspirer une quantité suffisante de sang pour son repas. Pour contrer cette réaction de l'hôte, les arthropodes ont développé dans leur salive des molécules inhibitrices de cette agrégation plaquettaire. On peut notamment citer l'apyrase (une enzyme) ubiquitaire dans la salive de presque tous les arthropodes hématophages, dont les moustiques. Elle inhibe l'agrégation plaquettaire en hydrolysant l'ADP (en AMP) libérée par les cellules endommagées, ce qui va empêcher l'activation des plaquettes (Ribeiro & Francischetti, 2003; Francischetti, 2010). Outre l'apyrase, on trouve également d'autres molécules anti-agrégation plaquettaire. C'est par exemple le cas de l'anopheline chez *Anopheles stephensi* (Yoshida et al., 2008) des protéines de la famille des

protéines D7 (Martin-Martin et al., 2020) ou encore spécifiquement de l'aegyptine chez *Aedes. aegypti* (Calvo et al., 2007) . Cette dernière semble bloquer, l'agrégation plaquettaire en altérant la capacité du collagène à interagir avec les glycoprotéines plaquettaires et simultanément bloque l'initiation de la coagulation en inhibant l'activation du facteur XII (Mizurini et al., 2013; Calvo et al., 2007).

4.1.1.2 Inhibition de la coagulation sanguine

Parallèlement à la formation de l'agrégat plaquettaire, la lésion de la peau de l'hôte due à la piqûre de l'arthropode déclenche également l'activation des mécanismes de la coagulation sanguine. Une cascade de réactions impliquant plusieurs facteurs de la coagulation sanguine (tant les facteurs de la voie intrinsèque que ceux de la voie exogène) va être mise en route et aboutira à l'activation de la thrombine ou facteur IIa (**Figure 15**). Le fibrinogène du plasma va être transformé par la thrombine en un réseau insoluble de fibrine qui va aboutir à la formation d'un caillot sanguin, entraînant ainsi l'arrêt de l'hémorragie. Pour contourner cette réaction de l'hôte à la piqûre, les arthropodes hématophages disposent dans leur salive, de plusieurs molécules protéiques ayant une action anticoagulante. Ces protéines vont ainsi bloquer le processus de coagulation sanguine pendant toute la durée du repas de l'arthropode. Certaines vont en effet agir sur les différentes voies de la coagulation en inhibant des facteurs impliqués. C'est le cas par exemple de l'hamadarine et de l'anopheline chez *An. stephensi* (Isawa et al., 2007), de l'alboserpine chez *Ae. Aegypti* (Calvo et al., 2011) la prolixine-S chez la punaise de lit, *Rhodnuis prolixus* (Ribeiro, 1995) (**Figure 15**).

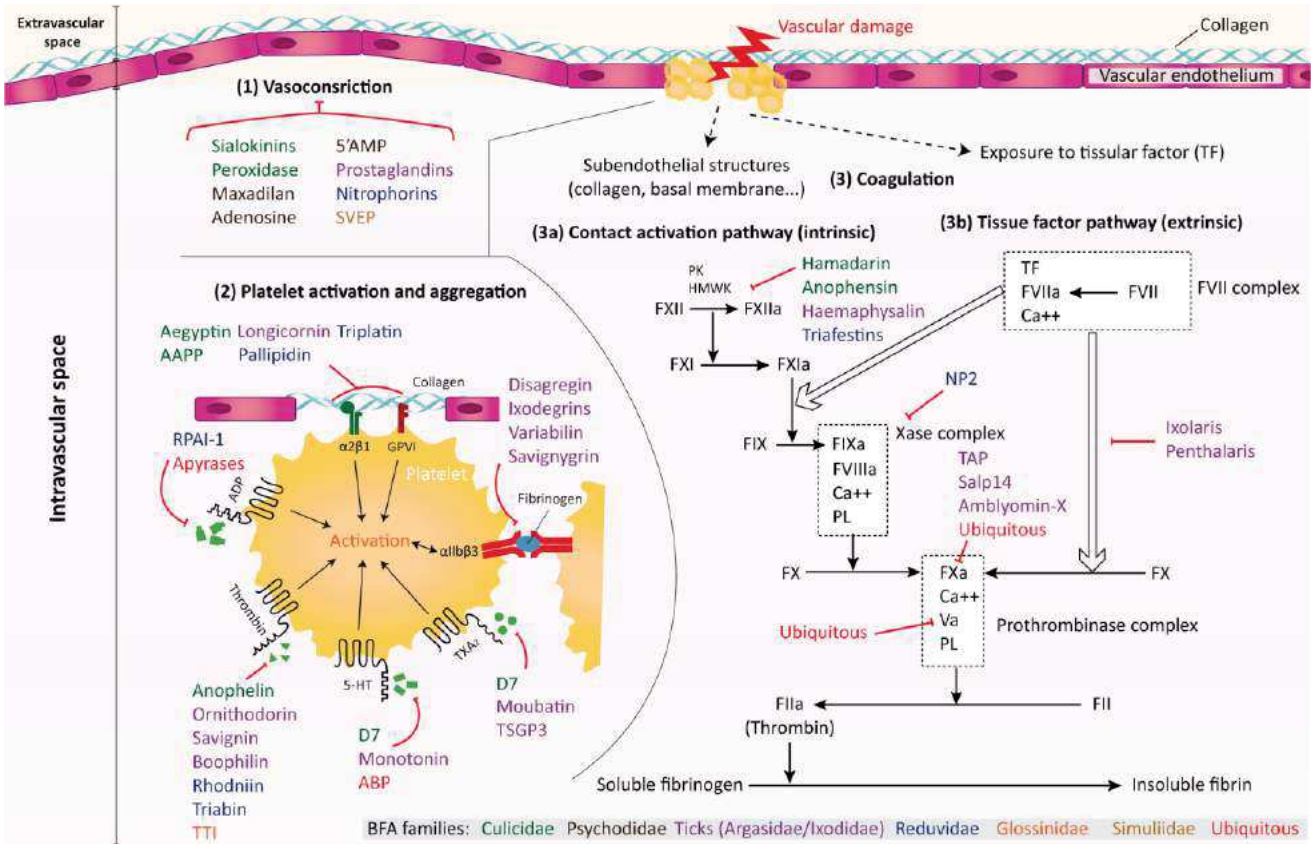


Figure 15: Effets des protéines salivaires des arthropodes vecteurs sur la réaction hémostatique de l'homme
(Fontaine et al., 2011a)

4.1.1.3 Rôle vasodilatateur des protéines salivaires

Les protéines salivaires des vecteurs, en plus de leur effet sur l'agrégation plaquettaire et la coagulation sont capables d'induire une vasodilatation facilitant ainsi leur repas de sang. A cet effet les arthropodes peuvent mettre en place deux stratégies possibles. Certains peuvent libérer dans leur salive, des molécules capables d'inhiber les vasoconstricteurs de l'hôte. C'est le cas par exemple des anophèles qui secrètent la myeloperoxydase capable de détruire la sérotonine (Ribeiro & Nussenzveig, 1993), empêchant ainsi la mise en place du phénomène de vasoconstriction. L'autre stratégie développée par les arthropodes consiste à libérer des substances à action vasodilatatrice, contenues dans leur salive. On peut notamment citer, le maxidilian (MAX) chez *Lutzomyia longipalpalis* (Ribeiro et al., 1989), qui a été décrit comme le plus puissant vasodilatateur. Cependant de récentes études semblent révéler que le MAX, n'est pas présent chez toutes les espèces de phlébotomes (Abdeladhim et al., 2012, 2016) . Outre le MAX, on retrouve aussi les amines (adénosine et la 5'AMP) chez *Plebotomus papatasi*, ou encore les Sialokines 1 et 2 chez les moustiques *Aedes*.

4.2 Propriétés immunologiques de la salive : modulation du système immunitaire de l'homme par la salive

Les hôtes vertébrés ont développé en plus des réponses hémostatiques, des systèmes de défense immunitaire pour éliminer les organismes étrangers, ce qui peut nuire largement aux arthropodes hématophages dans la prise de leur repas. Les lésions tissulaires provoquent l'apparition immédiate d'une inflammation aiguë et d'une réponse immune innée et adaptative **(Figure 16)**.

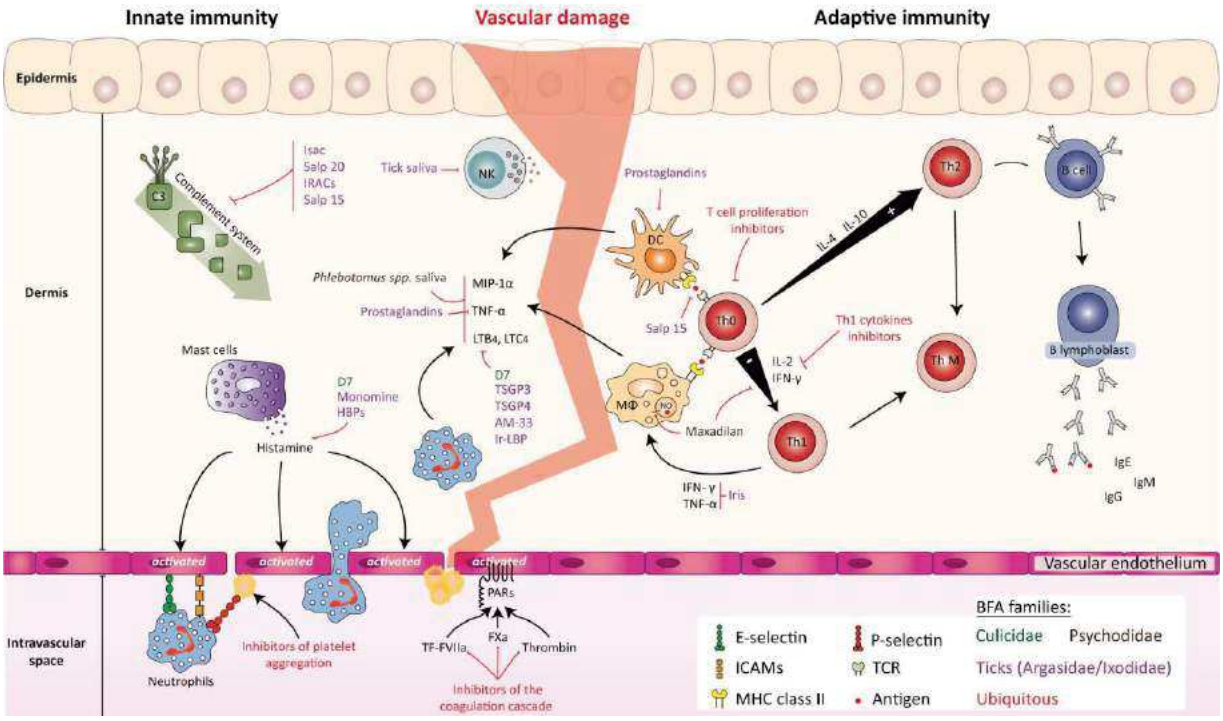


Figure 16: Mécanismes de modulation de la réponse immune des vertébrés par des protéines salivaires des arthropodes
(Fontaine et al., 2011a)

L'inflammation est caractérisée par de multiples interactions entre les cellules de la peau et de nombreuses cellules immunitaires (leucocytes, mastocytes, neutrophiles), qui sont les premières à entrer en contact avec les pièces buccales des arthropodes ainsi que leur salive et agents pathogènes potentiels. Ces interactions vont aboutir à la libération de substances telles que la sérotonine, la bradykinine, l'adénosine et l'histamine qui sont responsables de l'exacerbation de la douleur. Cette perception de la douleur est inhibée par des enzymes présentes dans la salive telle que l'adénosine désaminase (Charlab et al., 2000; Mohamed, 2006). Cet effet anti-nociception a également été observé avec l'apyrase. Chez les *Culicidae*,

les protéines de la famille D7 sont capables de se lier aux amines biogéniques afin d'éviter la réaction inflammatoire (Calvo et al., 2009).

Il est maintenant certain que la salive des arthropodes déclenche l'activation des mécanismes des réponses immunitaires locales innées et adaptatives (Wikel, 2017).

Les arthropodes ont sélectionné parmi leurs protéines salivaires, certaines qui sont capables d'inhiber ou de contrôler ces mécanismes, afin de favoriser leur repas de sang. Ces protéines vont en effet déclencher un certain nombre de réactions importantes, allant de la suppression de la réponse immune de l'hôte, jusqu'à la régulation de l'équilibre entre la réponse cellulaire (réponse de type Th1) et la réponse humorale (réponse de type Th2, avec production d'Ac). En effet la salive des arthropodes contient des molécules qui inhibent le fonctionnement des macrophages (Theodos & Titus, 1993) ou des cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'Ag (Skallova et al., 2008; Sá-Nunes et al., 2007; Hovius et al., 2008b). Elle réduit donc, la capacité des macrophages et des cellules dendritiques à présenter les Ag aux lymphocytes T.

Les études portant sur les effets de la salive de moustique sur la réponse immunitaire des vertébrés suggèrent que les populations de cellules T sont particulièrement sensibles aux effets de la salive de moustique (Wanasen et al., 2004; Depinay et al., 2006). La prolifération des cellules T et B semble être inhibée de manière dose-dépendante.

Les protéines salivaires des arthropodes peuvent, au cours de la piqûre, modifier à leur profit, l'équilibre existant entre les réponses immunes de type Th1 et Th2. En effet, la réorientation de ces deux types de réponse va inhiber la réaction de l'hôte contre ces protéines, ce qui va faciliter le déroulement du repas sanguin de l'arthropode.

Des études expérimentales portant sur un large éventail d'arthropodes ont indiqué qu'en règle générale, l'immunomodulation de l'hôte vertébré par la salive des arthropodes est associée à une baisse de l'expression des cytokines telles que l'IFN-γ et l'IL-2 (médiateurs immunologiques impliqués dans l'activation de la réponse cellulaire de type Th1), favorisant ainsi le développement d'une réponse de type Th2 médiée par les Ac (production d'IL-4 et d'IL-10) (Ockenfels et al., 2014; Caljon et al., 2006a; Mbow et al., 1998). Le phénomène d'immunosuppression, a par exemple, été rapporté avec le moustique *Aedes aegypti* et *Culex pipiens* où il a été observé une inhibition non seulement de la prolifération lymphocytaire (les lymphocytes T et B), mais aussi des cytokines IL-2 et IFNγ (Zeidner et al., 1999; Schneider et al., 2004). Cependant, une étude plus récente sur des souris immunisées directement par exposition aux piqûres d'*Aedes* (utilisant des moustiques vivants) a montré une réponse

immunitaire mixte Th1/Th2 à la salive du moustique *Aedes aegypti*, plutôt qu'une réponse orientée Th1, habituellement rapportée dans les études précédentes (qui utilisent plutôt des extraits de glandes salivaires ou une inoculation de ceux-ci à des souris par des seringues) (Vogt et al., 2018). Dans cette étude les auteurs ont rapporté une baisse de la prolifération des lymphocyte T et B après exposition aux piqûres d'*Aedes*.

Les effets des protéines salivaires sur la réponse immunitaire de l'hôte peuvent également varier en fonction de la concentration d'extraits de glandes salivaires. Dans certaines études, des concentrations élevées ont été signalées comme immunosuppressives, tandis que de faibles concentrations ont été associées à une modulation de la réponse immunitaire, ce qui correspond normalement à une réduction des cytokines de type Th1 et à une évolution vers une réponse de type Th2 (Schneider & Higgs, 2008).

Concernant les moustiques de genre *Anopheles*, une étude portant sur les réponses immunitaires aux piqûres d'*Anopheles stephensi* a rapporté une dégranulation des mastocytes entraînant un afflux local de fluides puis de neutrophiles et une hyperplasie des ganglions lymphatiques suite au recrutement de lymphocytes, de cellules dendritiques et de monocytes (Demeure et al., 2005). La salive d'anophèle induit également la production des IL-10 dans les ganglions lymphatiques et régule à la baisse les réponses des cellules T spécifiques à l'Ag (Depinay et al., 2006). De manière intéressante, chez les moustiques du genre *Anopheles*, une pré-exposition répétée aux piqûres semble également augmenter l'expression de l'IFN-γ et protéger contre l'infection par *Plasmodium yoelii* (Donovan et al., 2007), mais ces résultats sont controversés (Kebaier et al., 2010; Pollock et al., 2011).

Ces résultats semblent suggérer que les propriétés immunomodulatrices de la salive varient en fonction du genre d'arthropode. Ainsi, les réponses immunitaires humaines à la salive de moustique sont importantes et complexes en modifiant les fréquences de plusieurs populations de cellules immunitaires et la production de cytokines dans de multiples tissus, et peuvent durer plusieurs jours au niveau de la peau et au niveau systémique (Vogt et al., 2018). En outre, au vu la capacité qu'a la salive des arthropodes à orienter la réponse immunitaire de l'hôte vers une réponse de type Th2 avec la production d'Ac, pour faciliter le repas de ceux-ci, il n'est pas surprenant que les agents pathogènes transmis par ces vecteurs exploitent ces propriétés salivaires pour assurer une infection et une dissémination réussies chez l'hôte.

4.3. Salive des insectes vecteurs, transmission des pathogènes et développement de l'infection chez l'hôte vertébré

Les protéines salivaires injectées par les arthropodes à l'hôte au cours de la piqûre, présentent une activité immunomodulatrice sur la réponse immune innée et spécifique de l'hôte. Cette immunomodulation peut impacter directement sur la transmission des pathogènes et le développement de l'infection chez l'hôte vertébré (Andrade et al., 2005). De nombreux travaux réalisés sur le modèle phlébotomes/leishmanies ont montré que la salive des phlébotomes favorisait le développement de la pathologie leishmaniose cutanée. Il a été observé que l'inoculation par une seringue (sans salive) d'une quantité de pathogènes similaire (entre 10 et 1000) à celle injectée lors d'une piqûre naturelle (avec salive) n'induit pas la pathologie attendue (Menon & Bretscher, 1996). Des milliers voire des millions de parasites doivent être injectés par la seringue pour induire expérimentalement une infection chez la souris. De plus, la charge parasitaire et le degré de la pathologie sont moins importants après une inoculation par la seringue comparativement aux effets observés lors d'une co-injection du même nombre de parasites en présence de la salive de phlébotomes (Titus & Ribeiro, 1988). Cette assertion est aussi renforcée par une même étude du genre, chez les moustiques où seule une petite quantité de *P. berghei* injectée par un moustique et en présence de salive provoque une infection palustre (Leitner et al., 2010).

Toujours chez les moustiques, des études ont exploré les effets de la salive (ou des protéines salivaires) des *Aedes* dans la transmission des arboviroses/arbovirus et leurs capacités à exacerber la maladie **(Tableau 1)**. La majorité de ces études se sont concentrées sur la co-inoculation de virus avec de la salive ou des extraits de glandes salivaires (EGS) entiers. Une étude dans le modèle murin a rapporté que la réplication virale du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (RVF), ainsi que la pathogénie associée à l'infection par ce virus étaient fortement renforcées par des facteurs contenus dans la salive et l'extrait de glandes salivaires (Le Coupanec et al., 2013). De plus, dans le contexte d'une infection par le virus de la dengue, il a également été signalé que la co-inoculation avec les protéines ou les extraits de glande salivaire de *Aedes aegypti* favorisait la réplication virale chez la souris (Schmid et al., 2016; McCracken et al., 2014; Surasombatpattana et al., 2014, 2012; Cox et al., 2012). La salive des insectes joue donc un rôle essentiel semblant favoriser la transmission des agents infectieux et ceci grâce aux propriétés immunomodulatrices de certaines protéines salivaires (Leitner et al., 2013; Nuttall & Labuda, 2004; Hovius et al., 2008a) (**Tableau 1**)

Par ailleurs, une pré-exposition à la salive (piqûres non infectantes) chez des modèles murins, abroge l'effet exacerbant de l'inoculation de pathogène avec de la salive et semble donc protéger l'hôte contre la transmission des pathogènes (Belkaid et al., 1998; Valenzuela et al., 2001).

Cependant des résultats controversés montrent que cet effet protecteur de la pré-exposition aux piqûres non infectantes n'est pas toujours observé. En effet, alors qu'une pré-immunisation par injection de LJL143 et LJM17, (protéines recombinantes issues de la salive de *Lu. Longipalpalis*), prémunissait des hamsters contre une infection à *Leishmania major*, cette protection n'était pas retrouvée après une pré-exposition à la salive totale du même vecteur (Gomes et al., 2008; Collin et al., 2009). Aucune protection n'a également été observée contre *Leishmania major* après une pré-exposition des souris aux piqûres de *Phlebotomus papatasi* (Ben Hadj Ahmed et al., 2011).

Cet effet protecteur sur la transmission des pathogènes suggère qu'il serait possible de contrôler la transmission des maladies par une vaccination de l'hôte vertébré par des composants salivaires immunogéniques (Titus et al., 2006a). Plusieurs candidats vaccins ont été identifiés dans le contexte de la leishmaniose. Les études menées chez des primates non-humains et des souris immunisées par les protéines salivaires PspP15 (Oliveira et al., 2008a, 2015), le peptide MAX (Morris et al., 2001a) et la protéine LJM19 (Gomes et al., 2008) de *Phlebotomus* ou *Lutzomia*, présentent de plus petites lésions et/ou une charge parasitaire réduite voire une protection contre la leishmaniose viscérale.

En outre, une exposition préalable aux piqûres de moustiques peut favoriser la progression de la pathogenèse virale dans le cas du virus du Nil (Schneider et al., 2007). Très peu d'études ont porté sur la contribution des protéines salivaires individuelles lors de la transmission vectorielle d'un virus. Une étude a identifié une sérine-protéase qui peut amplifier l'infection par le virus de la dengue (Conway et al., 2014). Cette sérine protéase modifiait l'environnement par la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire, permettant une meilleure prolifération du virus (Conway et al., 2014). Les protéines qui favorisent la transmission pourraient donc être ciblées pour l'élaboration de vaccins qui empêcheraient la transmission.

Dans le contexte du paludisme, l'exposition unique à la salive faciliterait l'infectiosité *par P. berghei ,* et exacerberait la pathologie chez les modèles murins (Vaughan et al., 1999). Cette exposition à la salive des moustiques a aussi révélé une action délétère chez des souris en augmentant la parasitémie et la sévérité de la maladie (cas du paludisme cérébral). Ces effets se produiraient à la suite d'un dérèglement au site de piqûre, de la signalisation immunitaire et d'une réduction du nombre de cellules inflammatoires clés telles que les cellules dendritiques

et T CD8+ qui sont les premières cellules impliquées dans la défense du système immunitaire au niveau des ganglions lymphatiques (Schneider et al., 2011; Chakravarty et al., 2007).
Toutefois, la pré-exposition répétée aux Ag salivaires des *Anopheles* n'a pas les mêmes effets sur la réponse immune de l'hôte. En effet, la pré-exposition répétée de souris aux piqûres non infectantes d'*An. stephensi* favoriserait le développement d'une réponse immune cellulaire et/ou humorale, locale et systémique de type Th1 avec une augmentation d'IL 12, d'IFNγ et d'oxide nitrique, réponse immunitaire et inflammatoire qui seraient défavorables au développement des *Plasmodium* . Mais d'autres études utilisant la même approche n'ont pas pu confirmer ces résultats, suggérant que les Ac anti-salive des *Anopheles* n'ont pas d'impact significatif dans la protection contre *Plasmodium* (Kebaier et al., 2010; Pollock et al., 2011)
Ces observations indiquent que les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs de la salive du vecteur pourraient favoriser la survie de l'agent pathogène chez l'hôte (Wikel, 2017), et soulignent les interactions intimes entre l'agent pathogène et la salive du vecteur pendant la transmission et le développement de celui-ci. Cependant des effets différents sont observés selon le mode d'exposition de l'hôte et la nature de l'interaction vecteur-pathogène.

Tableau 1: rôle de la salive de différents vecteurs au cours de l'infection

Vecteurs	Pathogènes	Hôtes	Conséquences sur l'infection	Références
Anopheles stephensi	*Plasmodium yoelii*	souris	Protection Pas d'effet	Donovan et al. (2007) Kebaier et al. (2010)
	Plasmodium berghei	souris	Pas d'effet Amélioration	Kebaier et al. (2010) Schneider et al.(2011)
Anopheles fluviatilis	*Plasmodium gallinaceum*	oiseau	Protection	Rocha et al. (2004)
Aedes aegypti	West Nile virus	souris	Amélioration	Schneider et al. (2007)
	Cache Valley virus	souris	Amélioration	Edwards et al. (Edwards et al., 1998)
	Sindbis virus	rat	Amélioration	Schneider et al. (2004)
	Dengue virus		Amélioration	Conway et al. (2014)
	Rift Valley fever virus	souris	Amélioration	Le Coupanec et al. (2013)
Culex tarsalis	West Nile virus	souris souris	Amélioration	Reagan et al. (2012) Styer et al. (2011)
Culex pipiens	Cache Valley virus	souris	Amélioration	Edwards et al. (1998)
	West Nile virus	poule	Amélioration	
Glossina morsitans morsitans	Trypanosoma brucei brucei	Souris humain	Amélioration	Caljon et al. (2006a, 2006b)
Lutzomyia longipalpis *Lutzomyia flaviscutellata*	*Leishmania amazonenis* *Leishmania braziliensis*	souris	Amélioration	Francesquini et al. (2014), Thiakaki et al. (2005), Norsworthy et al. (2004)
	Leishmania major *Leishmania mexicana*	souris	Protection	Gomes et al. (2012) Rogers et al. (2002)
Lutzomyia intermedia	*Leishmania braziliensis*	souris	Amélioration	de Moura et al. (2007)
Phlebotomus papatasi	*Leishmania major*	souris	Protection Amélioration	Lestinova et al. (2015) Morris et al. (2001b),
Phlebotomus duboscqi	*Leishmania major*	souris	Protection	Rohousova et al. (2011) Lestinova et al. (2015)
Dermacentor andersoni	*Francisella tularensis*	lapin	Protection	Bell et al. (1979)
Ixodes scapularis	*Borrelia burgdorferi*	Cochon d'inde	Protection	Wikel et al. (1997)
Borrelia burgdorferi	*Borrelia burgdorferi*	Cochon d'inde	Protection	Nazario et al. (1998)

4.4 Composants salivaires des arthropodes comme antigènes vaccinaux

Le développement de vaccin basé sur la salive des vecteurs, n'est pas une idée nouvelle. Durant ces 30 dernières années, de multiples études surtout chez les tiques ont pu nous convaincre de l'utilité de la salive des arthropodes vecteurs, dans l'élaboration d'un vaccin contre la transmission des maladies vectorielles. L'une des hypothèses qui vient renforcer cette idée serait l'importance des protéines salivaires des arthropodes vecteurs dans leur capacité à favoriser l'infectiosité des pathogènes et l'établissement d'une infection systémique. Des études réalisées dans plusieurs systèmes vectoriels montrent qu'une pré exposition aux piqûres non infectantes des arthropodes, aurait un effet protecteur contre la transmission des pathogènes (Donovan et al., 2007; Titus et al., 2006b; Kamhawi et al., 2000). Cet effet protecteur sur la transmission des pathogènes suggère qu'il serait possible de contrôler la transmission des maladies par une vaccination de l'hôte vertébré par des composants salivaires immunogéniques en reproduisant cette exposition préalable (Titus et al., 2006b). Différents candidats vaccin ont été identifiés et offrent une preuve de cette stratégie vaccinale.

La protéine Salp 15, décrite chez les tiques *Ixodes scalpularis* a été testée *in vivo* comme un candidat vaccin. Les résultats montrèrent une faible densité parasitaire chez les souris immunisées par la protéine recombinante Salp15, conférant ainsi une protection partielle contre les spirochètes de l'agent de la maladie de Lyme (Dai et al., 2009). De manière très intéressante, la co-immunisation par Salp15 et une protéine de surface de *Borrelia burgdorferi* (OspA), exerce une meilleure protection contre *B. burgdorferi* que lorsque ces deux candidats sont utilisés séparément (Steere et al., 1998). Ainsi, l'association d'une protéine salivaire avec une préparation antigénique dérivée ou proche d'un agent infectieux pourrait améliorer la protection de l'hôte contre les maladies à transmission vectorielle. D'autres études dans le modèle de la leishmaniose animale ont aussi mis en évidence l'efficacité des combinaisons vaccinales. Les souris immunisées avec la protéine salivaire native PpSP15 de *Phlebotomus duboscqi*, puis renforcée avec une combinaison de PpSP15 et de *Leishmania tarentolae* non pathogènes (vivants) ont présenté une meilleure immunité et une meilleure protection contre la leishmaniose cutanée que les animaux vaccinés avec PpSP15 ou avec les parasites *Leishmania tarentolae* atténués seuls (Zahedifard et al., 2014). Concernant PpSP15, des études précliniques ont montré que des macaques rhésus immunisés avec une protéine salivaire de *Phlébotomus duboscqi* (PdSP15) étaient protégés contre la leishmaniose cutanée lorsqu'ils étaient exposés à des phlébotomes infectés par le parasite (Oliveira et al., 2015). La protection était corrélée à une

production accélérée de lymphocytes CD4+ et IFN-γ spécifiques des *Leishmania.* Des études ont montré qu'il serait efficace pour conférer une protection contre la transmission des parasites issus d'autres phlébotomes (*Phlebotomus papatasi*), du fait de sa forte homologie de séquence (Lestinova et al., 2015). Chez l'Homme, les sérums et les cellules PBMCs des individus naturellement exposés aux piqûres de *P. duboscqi* ont reconnu la PdSP15, démontrant son immunogénicité. De plus, la séquence et la structure de la PdSP15 ne présentent aucune homologie avec les protéines de mammifères, ce qui démontre son potentiel en tant que composant d'un vaccin contre la leishmaniose humaine (Demarta-Gatsi & Mécheri, 2021).

L'autre hypothèse, qui est que la salive des moustiques contiendrait des molécules immunomodulatrices (Wikel, 2017), a achevé de confirmer cette idée. En effet les pathogènes transmis par la salive des vecteurs semblent en général initier ou induire une plus grande infection chez l'hôte, en tirant parti des interactions existant entre l'hôte vertébré et la salive (Pingen et al., 2016, 2017; Conway et al., 2014; Styer et al., 2011). Ces interactions conduisent à une altération du micro-environnement cutané et à une modulation des réponses immunes innées et adaptatives de l'hôte (Bizzarro et al., 2013; Vogt et al., 2018), justifiant ainsi un espoir, pour la création de vaccins dirigés contre les protéines salivaires plutôt que contre les pathogènes contenus dans la salive des vecteurs (Manning et al., 2018). Chez les trois genres de moustique (*Anopheles, Aedes, et culex*) d'intérêt clinique, il existe de nombreuses protéines salivaires aux propriétés immunomodulatrices qui facilitent l'infection chez l'hôte vertébré. L'immunisation passive de souris avec des Ac dirigés contres des protéines salivaires de *Aedes aegypti* (NeST1 et AgBR1) a amélioré leur survie lorsque celles-ci ont été exposées par la suite à des moustiques infectés par le virus Zika, en réprimant de nombreux changements du système inflammatoire (Hastings et al., 2019; Uraki et al., 2019). Dans une autre étude chez le modèle animal, l'immunisation avec la protéine salivaire *Anopheles gambiae* AgTRIO fournirait une protection chez les souris (qui supportent l'infection par *P. falciparum* au stade hépatique) contre *P. falciparum* en réduisant le mouvement des sporozoïtes dans le derme. De manière très intéressante, la combinaison de sérum anti-AgTRIO et d'Ac anti-CSP (un candidat vaccin), réduit l'infection à *Plasmodium berghei* (Dragovic et al., 2018a). Les résultats de cette étude indiquent que les Ac anti-AgTRIO peuvent renforcer l'efficacité de ceux dirigés contre l'Ag CSP de *P.berghei* chez la souris qui à leur tour diminueraient la charge parasitaire de manière dose-dépendante lors de la transmission de *P. berghei* à des souris par des moustiques (Dragovic et al., 2018a).

A ce jour, il n'existe pas de vaccin basé sur les composants salivaires des moustiques chez l'Homme. Toutefois les résultats du premier essai clinique de phase 1 de l'AGS-v (*Anopheles*

gambiae saliva vaccine) candidat vaccin à base de peptide dérivé de quatre protéines salivaires de *Anopheles gambiae* (mais conservées chez les *Aedes* et *Culex)* ont montré une augmentation significative des Ac (IgG) et de IFNγ, une bonne tolérance et une immunogénicité (potentialisé par un adjuvant, Montanide ISA 51) (Manning et al., 2020).

4.5 Modulation de la réponse immune anti pathogène de l'homme par la salive

Il est possible que le pouvoir immunomodulateur de la salive des arthropodes vecteurs ait une influence sur le développement et l'orientation de la réponse immune spécifique aux pathogènes, et donc sur le devenir de l'infection. Ceci est d'autant plus plausible que la modulation du système immunitaire de l'hôte est différente selon que le pathogène soit inoculé naturellement par la piqûre du vecteur, ou de façon artificielle par une seringue. Thangamani et al. (2010) a montré que les réponses immunitaires dermiques au virus du chikungunya (CHIKV) transmis par une piqûre de moustique étaient significativement différentes des réponses immunitaires provoquées par le CHIKV transmis par inoculation par aiguille. L'étude a montré qu'en présence de salive de moustique, les niveaux d'IL-4 étaient significativement augmentés et les niveaux de transcription d'IL-2, d'IFN-γ et de TLR3 diminuaient par rapport à ceux observés lors de l'inoculation par aiguille (Thangamani et al., 2010). Plus intéressant encore, l'étude a observé que les piqûres de moustiques infectés par le CHIKV provoquaient une augmentation de près de 150 fois des transcriptions d'IL-4 aux sites de piqûre par rapport aux sites de piqûre de moustiques non infectés. Ces effets peuvent donc avoir des répercussions sur l'infection ; chez les tiques, par exemple, il a été montré que la salive inhibait *in vitro* l'action trypanocide des macrophages sur *Trypanosoma cruzi* (Ferreira & Silva, 1998).

Il a été observé, dans un contexte épidémiologique, que la réduction des cas de virus « Human Herpes Virus 8 », l'agent pathogène responsable du sarcome de Kaposi et transmis essentiellement par la salive humaine, était corrélée avec la réduction des populations de vecteurs en Italie (Coluzzi et al., 2003). Ceci a poussé ces auteurs à suggérer que l'immunomodulation locale induite par la salive de moustiques *Anopheles* pourrait favoriser la transmission du HHV8. En Afrique, la transmission du HHV 8 peut avoir lieu lorsque les mères appliquent leur salive sur les blessures des enfants telles que des piqûres d'insectes.

L'immunomodulation induite par la salive du vecteur au site même pourrait créer un micro-environnement (une hypersensibilité locale ou une immunosuppression) favorable au développement du virus transmis de la mère à l'enfant via la salive (Remoue et al., 2005).

A ce jour peu d'études ont étudié spécifiquement cette hypothèse dans le cas d'infections hétérologues. Deux études expérimentales indépendantes ont suggéré que la réponse immune spécifique anti-pathogène était significativement réduite chez les souris pré-exposées aux piqûres d'anophèles et morsures des tiques par rapport aux souris naïves (Ag modèle = ovalbumine et BSA, respectivement) (Depinay et al., 2006; Menten-Dedoyart et al., 2008). Dans ces deux études, les auteurs ont observé , une inhibition de la réponse lymphocytaire T, spécifique à l'Ag par un mécanisme dépendant des mastocytes et médié par l'IL-10 pour la première étude (Depinay et al., 2006). en outre la réduction significative des taux d'IgM et d'IgG spécifiques à la BSA a été observée chez des souris infestées par des tiques 5 jours avant l'injection de BSA en comparaison aux souris non infestées (Menten-Dedoyart et al., 2008)
Extrapoler cette approche chez l'Homme dans le cas d'infection naturelle en zone d'endémie serait pourrait être réaliste.
Les premières études en zone d'endémie montrèrent une différence de réponse IgG anti-*Plasmodium* chez des enfants exposés différemment aux piqûres des anophèles entre 2 villages. En effet, un des villages présentait une forte exposition à *An. gambiae* (village de Gankette Balla) et l'autre une faible exposition à *An. funestus* (village de Mboula). Sur une année de suivi, les auteurs ont observé que les réponses IgG anti-*P. falciparum* i) étaient significativement plus élevées à Mboula comparé à Gankette Balla et ii) variaient en fonction de la saison d'exposition (pic en décembre) à Mboula, contrairement au village exposé à *An. funestus* (Gankette Balla) où les réponses IgG spécifiques restaient stables tout au long de l'année. Les auteurs ont ainsi suggéré que l'intensité d'exposition et/ou la nature des piqûres (*An. gambiae* ou *An. funestus*) pourraient influencer la réponse Ac contre les pathogènes (Sarr et al., 2007). De plus, une modulation différente des réponses isotypiques (IgG1 et IgG3) a été constatée entre ces deux villages. Les réponses IgG3 étaient similaire entre les deux villages En revanche les individus vivant à Mboula présentaient majoritairement une réponse IgG1 anti-*P. falciparum* comparés à ceux de Gankette Balla (Sarr et al., 2012). Ainsi Le microenvironnement immunitaire initié par les composants salivaires des arthropodes chez l'hôte vertébré pourrait donc avoir des conséquences sur le développement d'une réponse immunitaire spécifique contre les pathogènes.

4.6 Réponses anticorps spécifiques aux protéines salivaires

Comme précédemment décrit, la salive des arthropodes contient un cocktail de molécules bioactives, essentiellement de nature protéique, qui en plus de leurs propriétés pharmacologiques, anti-inflammatoires et immunomodulatrices, peuvent pour certaines, être immunogéniques. En effet chez certains individus vertébrés, la piqûre d'un arthropode hématophage est souvent suivie d'une réaction d'hypersensibilité au niveau du site de la piqûre. L'hypersensibilité observée serait due à une production d'immunoglobulines de type IgG et IgE, spécifiques aux protéines de la salive (Reunala et al., 1994; Peng et al., 1996a).

Exploitant cette propriété des protéines salivaires à induire la production d'Ac, associés aux allergies, des travaux ont été menés pour caractériser les principales protéines impliquées dans ce processus et majoritairement reconnues par les isotypes IgG1, IgG4 et IgE (Peng et al., 1996b; Brummer-Korvenkontio et al., 1997). Ces protéines pourraient premièrement être utilisées comme outils pour le diagnostic et le traitement des réactions allergiques dues aux piqûres de moustiques (Peng et al., 2007, 2004b; Remoue et al., 2007), deuxièmement une idée serait d'utiliser cette réponse Ac comme biomarqueur d'exposition au piqûres de moustiques vecteurs. Remoue et al., avait observé au Sénégal que les réponse IgG et IgE spécifiques aux extraits salivaires totaux d'*Aedes aegypti* augmentaient durant la saison d'exposition chez des enfants (Remoue et al., 2007). Ainsi comme révélé plus tôt, les taux d'Ac anti-protéine salivaire des moustiques du genre *Aedes* comme d'autres moustiques (*Culex et Anopheles*) seraient un indicateur d'exposition aux piqûres de ces vecteurs (Palosuo et al., 1997; Peng et al., 2002). Des études réalisées dans d'autres systèmes vectoriels, ont montré que les Ac IgM anti-salive de punaise (*Triatoma infestans*) peuvent être détectés chez des animaux après 2 jours d'exposition (Schwarz et al., 2009, 2011). Ainsi l'on peut s'attendre à une corrélation logique entre le niveau d'exposition humaine aux piqûres des arthropodes et le niveau d'Ac dirigé contre la salive de ces arthropodes. L'hypothèse serait que le niveau de réponse Ac humaine contre la salive des arthropodes puisse représenter un proxy de l'exposition humaine aux piqûres de ces arthropodes.

4.7 Réponses humorales anti-salive comme biomarqueur d'exposition aux piqûres : Nouvel outil immunologique pour évaluer le contact hôtes-vecteurs

La pertinence d'utiliser la réponse Ac anti-protéines salivaires d'arthropodes comme biomarqueur d'exposition aux piqûres des arthropodes hématophages et ses nombreuses applications, n'a cessé d'être démontrée au cours de ces 30 dernières années. Cette idée est renforcée par la mise en évidence par de nombreuses études, de l'existence d'une réponse Ac anti-salive chez des individus (animaux ou humains) exposés aux piqûres d'arthropodes, mais absente chez les individus non exposés (Abdel-Naser et al., 2006; Peng et al., 1996a; Brummer-Korvenkontio et al., 1994; Reunala et al., 1994). Ceci suggère donc que l'acquisition de la réponse Ac contre les protéines salivaires des arthropodes dépend de l'exposition (nature et intensité) de l'homme à ces insectes. Il a donc été imaginé que l'évaluation quantitative de la réponse Ac anti-salive pourrait permettre d'évaluer le niveau d'exposition des vertébrés aux piqûres des arthropodes hématophages (Remoue et al., 2005; Billingsley et al., 2006).
Concernant les moustiques, notamment *An. gambiae* des travaux ont montré que des enfants vivant en zone d'endémie palustre, au Sénégal, développaient une réponse IgG spécifique aux Ag salivaires totaux d'*An. gambiae* qui était associée positivement au degré d'exposition des enfants aux piqûres de ce vecteur, mesurée par des méthodes entomologiques classiques (Remoue et al., 2006). Cette réponse IgG semblait transitoire, une diminution du niveau des IgG a été observée entre septembre et décembre en absence d'une forte exposition aux piqûres d'*Anopheles* contrairement aux villages fortement exposés où le niveau de la réponse IgG a été maintenu durant la période (Remoue et al., 2006). Dans cette même étude, les auteurs ont remarqué une grande hétérogénéité inter-individuelle dans le niveau de réponse des Ac anti-salive que des facteurs épidémiologiques inter-humains (génétique, co-infection par des pathogènes) et des différences de niveau d'exposition au sein des mêmes villages pourraient expliquer. Depuis lors, des résultats similaires ont été observés puis démontrés selon lesquels l'intensité de la réponse IgG anti-salive pourrait être un biomarqueur mesurant le niveau d'exposition des humains aux piqûres des *Anopheles* et des *Aedes* (Waitayakul et al., 2006; Orlandi-Pradines et al., 2007). Orlandi-Pradines et al., ont ainsi pu évaluer les conséquences d'une exposition transitoire à *An. gambiae* et *Ae. aegypti* sur la réponse IgG spécifique à la salive de ces vecteurs, chez des soldats français en mission d'une durée de 5 mois en Afrique. Par conséquent, l'exposition temporaire aux piqûres des vecteurs semble suffisante pour développer une réponse IgG anti-salive d'arthropodes (Orlandi-Pradines et al., 2007). Une

autre étude réalisée en France, a montré une association positive entre le niveau moyen de la réponse IgG anti-salive de *Aedes caspus* et les variations spatiales des densités de ce vecteur (Fontaine et al., 2011b).

De manière intéressante les études menées au cours de cette dernière décennie ont fini de confirmer que la réponse IgG anti-salive pourrait être un marqueur d'exposition aux piqûres de vecteurs de grand intérêt médical. A cet effet il a été démontré que la réponse spécifique IgG anti-salive des *Anopheles* peut être considérée comme un indicateur d'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides dans la lutte contre les vecteurs du paludisme (Drame et al., 2010). Une diminution rapide des niveaux d'IgG dirigés contre les extraits de glandes salivaire de *Aedes albopictus* a également été rapportée après la mise en place de mesures de contrôle dans une ville urbaine de l'île de la Réunion (Doucoure et al., 2014). Par ailleurs les auteurs dans une toute autre étude sur des moustiques du même genre ont pu observer une corrélation positive entre les niveaux de réponse Ac anti-salive et le risque d'infection par le virus de la dengue (Doucoure et al., 2012).

Cependant, l'existence dans la salive totale, de protéines communes à plusieurs arthropodes hématophages et le fait que la collecte de la salive ou des extraits de glandes salivaires soit fastidieuse, constituent les principales limites à l'utilisation de la réponse Ac anti- salive totale comme marqueur d'exposition pour des études épidémiologiques à grande échelle. En effet, il est possible qu'une réactivité croisée entre les Ac de protéines salivaires d'autres moustiques existent. Cette potentielle réaction croisée limiterait considérablement la spécificité du test (Poinsignon et al., 2008a). Par ailleurs, la teneur et la composition en protéines salivaires peuvent varier en fonction du sexe, de l'âge ou du régime alimentaire des insectes (Volf et al., 2000). Ainsi l'utilisation de la salive totale ou des extraits de glandes salivaires comme source d'Ag ne permet pas d'obtenir un test reproductible. Par conséquent, l'identification des protéines salivaires immunogéniques spécifiques au genre ou à l'espèce et leur production sous forme recombinante ou de peptides synthétiques permettrait d'obtenir un gain de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité dans les tests immunologiques (Lombardo et al., 2009).

4.8. Peptides salivaires marqueurs immunologiques d'exposition aux piqûres de moustiques

L'analyse transcriptomique et protéomique de la salive totale de plusieurs arthropodes a permis d'identifier des protéines salivaires spécifiques du genre et/ou d'espèce(Arcà et al., 1999, 2007; Valenzuela et al., 2003; Calvo et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Francischetti et al., 2009).

Chez les femelles de *Anopheles gambiae*, plus de 70 protéines salivaires ont pu être identifiées (Arcà et al., 2005), et parmi ces protéines, la protéine gSG6 (*An. gambiae Salivary Gland protein 6)* semble être un candidat pertinent pour développer un biomarqueur car elle est hautement conservée entre les espèces du genre *Anopheles* (Lombardo et al., 2009) et est antigénique (Orlandi-Pradines et al., 2007) **(Figure 17).**

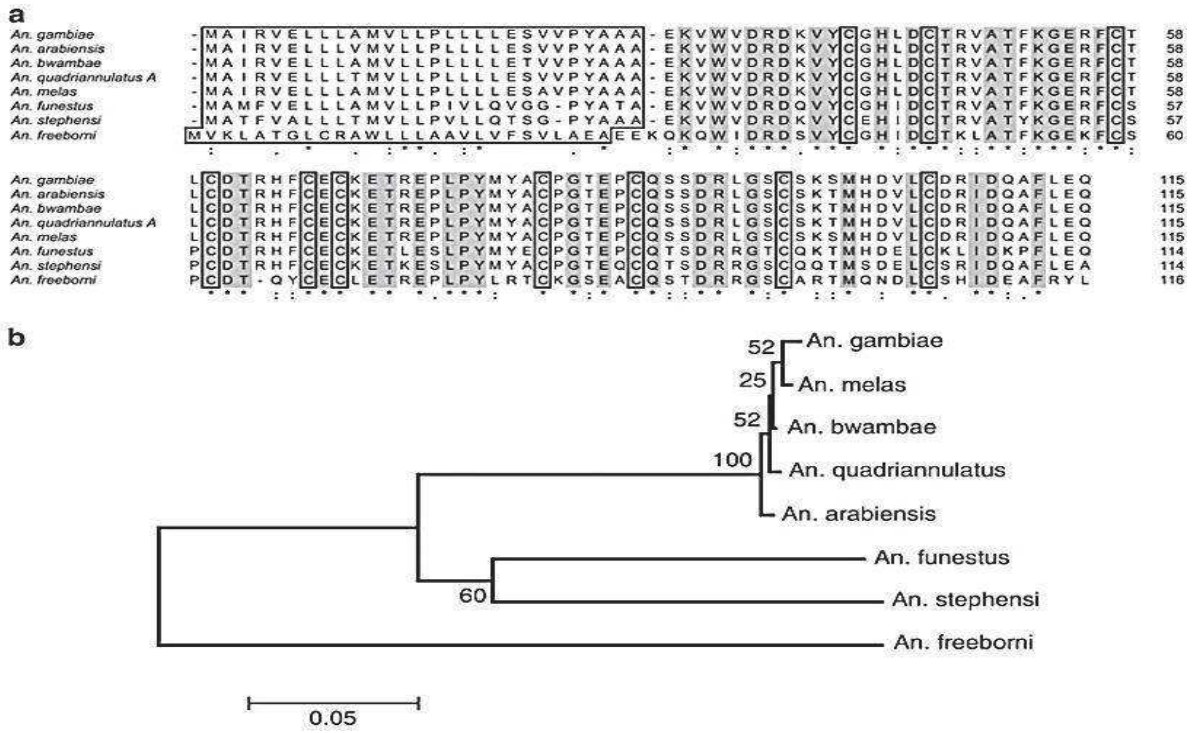


Figure 17: séquences des protéines gSG6 de *Anopheles*

(Lombardo et al., 2009)

(a) Alignement des séquences de gSG6 de 8 espèces de Anopheles.

(b) Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement de la séquence nucléotidique codant pour les polypeptides de gSG6

La protéine gSG6 a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de valider la réponse anticorps IgG spécifique comme un marqueur immunologique d'exposition humaine aux piqûres de plusieurs espèces vectrices du paludisme en Afrique et en Asie (Poinsignon et al., 2008a; Idris et al., 2017). L'immunogénicité de cette protéine produite sous forme recombinante a été confirmée chez des individus vivant en zone hyperendémique pour le paludisme (Rizzo et al., 2011b, 2014a). En effet, ces études ont révélé que les individus exposés aux piqûres de *Anopheles* développaient des réponses Ac spécifiques reconnues par la protéine gSG6 exprimée sous forme de protéine recombinante purifiée (His-tagged N-terminal) dans le vecteur *Escherichia coli* pET28b(+) (Rizzo et al., 2011a). De plus la réponse IgG spécifique à la protéine gSG6 semble être un marqueur immunologique fiable pour déterminer une variation spatiale et saisonnière de la densité des vecteurs (Rizzo et al., 2014b, 2014a; Ya-Umphan et al., 2017). Ainsi l'utilisation des protéines salivaires recombinantes hautement conservées entre plusieurs espèces vectrices apparentées, comme la gSG6 pourrait être utile dans l'évaluation du risque de transmission chez les individus vivant dans des zones où la diversité des espèces vectrices n'est pas bien caractérisée ou même applicable dans des zones qui présentent des espèces vectrices différentes.

L'identification de peptides salivaires et leur obtention par synthèse chimique permettrait de s'affranchir des limites de la production de protéines recombinantes (haut degré de pureté et une reproductibilité entre les lots de production)

Ainsi, à partir de la séquence de la protéine gSG6 et par l'utilisation des techniques de bioinformatique et d'immunoempreinte (Poinsignon et al., 2008a; Cornelie et al., 2007) ((**Figure 18**), le peptide salivaire gSG6-P1 a été identifié comme un candidat biomarqueur d'exposition.

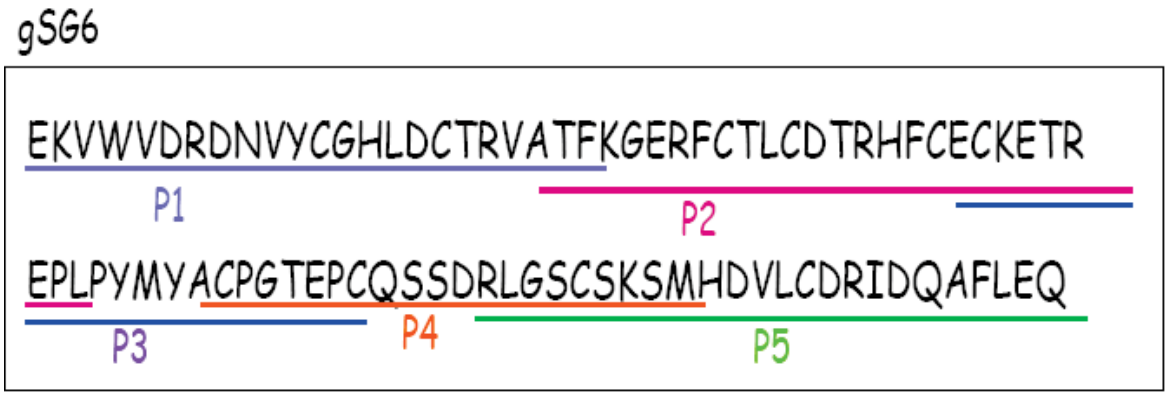


Figure 18: Représentation schématique des 5 peptides de la protéine gSG6 d'*An. gambiae* (Poinsignon et al., 2008a)

La séquence gSG6-P1 est très conservée entre espèces d'*Anopheles* (Lombardo et al., 2009; Calvo. et al., 2007) indiquant que ce peptide peut être un biomarqueur potentiel aux autres espèces d'anophèles vectrices. La sensibilité du gSG6-P1 en tant que candidat biomarqueur pertinent évaluant de manière spécifique et fiable le niveau d'exposition aux piqûres d'anophèles a été testé dans différents contextes épidémiologiques. Dans une zone de pré-élimination du paludisme au Sénégal, des réponses IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 ont été détectées chez 36% des enfants vivant dans des villages où très peu *d'An. gambiae* ont été collectés par des méthodes entomologiques classiques. Ce biomarqueur sérologique a permis de mettre en évidence une hétérogénéité micro-géographique de l'exposition de ces enfants malgré le faible niveau général d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* (Sagna et al., 2013b). Ces deux études soulignent ainsi l'utilisation potentielle de la réponse IgG anti-gsG6-P1 comme biomarqueur épidémiologique pour évaluer le risque de transmission du paludisme chez des individus vivant dans des zones de faibles expositions là où les méthodes (entomologiques) de mesure classique présentent des limites. Le paludisme urbain, est un autre exemple. En effet Drame et al., (2012) a révélé une variation individuelle de l'intensité d'IgG anti-gSG6-P1 entre et au sein des quartiers urbains de la ville de Dakar (Sénégal) malgré un niveau d'exposition aux anophèles et une transmission du paludisme globalement faibles. L'intensité des réponses IgG anti-gSG6-P1 semblait être associée positivement aux niveaux d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*, reflétant ainsi le contact réel moustiques-populations humaines (Drame et al., 2012). Fort de cette sensibilité, l'utilisation de ce biomarqueur salivaire d'exposition aux piqûres d'anophèles a permis d'évaluer le risque de transmission du paludisme chez des enfants (âge < 1 an) (Drame et al., 2015).

D'autres études ont aussi souligné la pertinence de l'utilisation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans l'évaluation du contact Homme-vecteur, notamment comme indicateur prédictif des cas de paludisme clinique ou asymptomatique (Sagna et al., 2013a) et de suspicion d'infection à *P. falciparum* chez des individus vivant en zone de faible transmission du paludisme en Amérique (Londono-Renteria et al., 2015). Plus récemment Ya-Umphan et al., en (2018) ont pu mettre en évidence des hot-spots de transmission du paludisme à la frontière entre la Birmanie et la Thaïlande. En effet il a été observé une association positive entre le niveau d'exposition aux piqûres d'*Anopheles* représenté par la réponse IgG anti gSG6-P1 et le niveau de réponse Ac anti-*Plasmodium falciparum* (Ya-Umphan et al., 2018).

Une des applications non moins négligeables malgré l'existence des méthodes classiques d'évaluation de la densité des vecteurs et du risque de transmission du paludisme, est son utilisation dans l'évaluation des méthodes de lutte anti-vectorielle. En effet, une chute drastique

de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez des individus (en Angola) a été observée après la mise en place des MII (Drame et al., 2010). Cette baisse semblait être associée à la parasitémie et à l'utilisation effective des MIIs, suggérant que ce biomarqueur pourrait être utilisé comme critère d'efficacité des MII à court et long terme. Par ailleurs il été validé comme indicateur épidémiologique évaluant l'efficacité « réelle » de différents moyens de lutte antivectorielle (MII, serpentins, fumigène, bombes aérosol etc…) dans des quartiers de la ville de Dakar au Sénégal (Drame et al., 2013) et plus récemment pour évaluer l'intégrité physique des MILDA sur le terrain dans des districts sanitaires du Bénin (Noukpo et al., 2016).

La même approche a été utilisée pour déterminer un biomarqueur d'exposition spécifique aux piqûres des *Aedes*. Ainsi la réponse IgG anti peptide Nterm-34 kDa d'*Aedes aegypti* a été déterminée comme un biomarqueur d'exposition au piqûre d'*Aedes*, donc pour évaluer le risque de transmission des arboviroses. La pertinence de l'utilisation des réponses Ac IgG anti Nterm-34 kDa comme biomarqueur d'exposition aux piqûres d'*Aedes* a d'abord été testée dans les zones rurales du Bénin (Afrique de l'Ouest). Les réponses IgG ont montré des variations saisonnières significatives au cours de l'étude. En effet, des réponses IgG ont été détectées chez 29% des enfants pendant la saison sèche, alors que ce pourcentage atteignait 99% pendant la saison des pluies (saison de grande exposition aux *Aedes*). En outre, le niveau médian des réponses Ac IgG a augmenté de manière significative entre la saison sèche et la saison des pluies (Elanga Ndille et al., 2012). Dans une autre étude, le niveau de la réponse IgG spécifique au peptide Nterm-34kDa a été évalué chez des individus vivant en milieu urbain à Vientiane au Laos (Asie) et a été comparé au risque de transmission du virus de la Dengue. Tout comme la prévalence d'infection du virus de la dengue (IgM anti-DENV), l'intensité des réponses IgG semblait diminuer avec le degré d'urbanisation de la ville (Ndille et al., 2014) ; les zones les moins urbanisées présentaient un risque de transmission plus grand comparé à celle plus urbanisées.

D'autres études ont pu mettre en évidence sa pertinence en tant que candidat biomarqueur pour évaluer le risque de transmission des maladies transmises par les moustiques du genres *Aedes* en milieu rural dans une zone à forte densité agricole en Côte d'ivoire (Yobo et al., 2018) et pour évaluer l'efficacité des stratégies de lutte anti-*Aedes* (Elanga Ndille et al., 2016). Cette dernière étude, réalisée sur 102 individus de l'ile de la Réunion montre une rapide et drastique baisse des niveaux de réponses Ac IgG anti-Nterm 34 kDa au bout de seulement 15 jours après implémentation des méthodes de lutte anti vectorielles (élimination des potentiels gîtes et pulvérisation d'insecticide). Cette baisse des réponses IgG semble être corrélée avec la densité des moustiques (méthodes entomologiques) et persister après la mise en place des méthodes

utilisées pour réduire la densité des vecteurs (Elanga Ndille et al., 2016).

Dans l'ensemble ces résultats semblent démontrer que la réponse IgG anti-peptide Nterm-34kDa représente un candidat pertinent pour évaluer l'exposition des populations aux piqûres des *Aedes*, et donc du risque de transmission des arboviroses.

Comme pour la plupart des arthropodes hématophages, les moustiques du genre *Culex* (*Cx*.) ont la capacité de se nourrir aussi bien sur l'homme que sur les animaux

Plusieurs études évaluant la réponse anticorps anti-salive des moustiques du genre *Culex* comme biomarqueur potentiel pour évaluer l'exposition à *Cx. quinquefasciatus* ou *Cx. pipiens* ont été réalisées en utilisant les EGS (Bakli et al., 2014; Wongkamchai et al., 2010; Wanasen et al., 2004; Malafronte et al., 2003). Ainsi dans le but de définir un biomarqueur immunologique permettant d'évaluer l'exposition aux moustiques du genre *Culex*, une démarche similaire à celle utilisée pour *Anopheles* et *Aedes* a été adoptée.

La protéine allergène 30kDa (gi | 170033701) a été sélectionnée. Cette protéine appartient à une famille de protéines (30-kD/GE-rich/Aegyptin protein family) hautement immunogène, induisant une réponse IgE chez les personnes exposées aux *Aedes* (Opasawatchai et al., 2020), et une réponse IgG chez celles exposées aux *Culex* (Peng et al., 1996a) Les études de transcriptomique/protéomique des *Culicinae* et d'*Anophelinae* ont revélé qu'elle est commune à *Cx. Quinquefasciatus* (Ribeiro et al., 2004), *Ae. aegypti* (Ribeiro et al., 2016) et *Anopheles sp.*(Cornelie et al., 2007). La comparaison de la séquence de la protéine 30kDa de *Cx quinquefasciatus* avec les homologues dans le phylum des Arthropodes a montré, en dehors des espèces de *Culex*, un maximum d'homologie de 36% et 39% avec *Ae. albopictus* et avec *Ae. aegypti*, alors qu'une homologie de 34% a été trouvé avec *Anopheles*. Produite sous forme recombinante les auteurs ont pu évaluer si la réponse IgG spécifique à cette protéine ainsi qu'aux extraits totaux de *Culex quinquefasciatus* permettrait d'évaluer le niveau d'exposition aux piqûres de ce moustique vecteur. Par ailleurs, au cours d'une étude multidisciplinaire menée auprès d'enfants âgés de 1 à 14 ans exposés différemment à *Cx. quinquefasciatus*, les données ont montré que les enfants vivant dans les villages fortement exposés (taux agressivité moyen:10,2 piqûres/homme/nuit) avaient une réponse IgG significativement plus élevée aux Ag salivaires (protéine 30 kDa et EGS) que les enfants vivant dans le village témoin où très peu de *Culex* ont été capturés (taux agressivité moyen: 0,2 piqûre/homme/nuit). Aucune différence significative n'a été notée dans les réponses immunitaires entre les groupes d'âge et le sexe, tandis que l'utilisation d'une moustiquaire était associée négativement à la réponse IgG aux 2 types d'Ag salivaires.

Ces résultats suggèrent que la réponse IgG aux extraits de glandes salivaires de *Culex* peut

représenter un proxy de l'exposition ; cependant, la spécificité du genre *Culex* doit être évaluée plus en profondeur.

DEUXIEME PARTIE :

OBJECTIFS ET CADRE DE TRAVAIL DE LA THESE

1. Objectifs

1.1 Objectif Général

L'objectif général de cette thèse est d'étudier, chez les populations humaines résidant en zones d'endémie pour le paludisme, les effets de l'exposition aux piqûres des moustiques (*Anopheles, Aedes et Culex*) et à leurs propriétés immunomodulatrices sur la réponse immune anti-*Plasmodium* impliquée dans la protection contre le paludisme.

1.2 Objectifs spécifiques

Notre objectif principal se décline en deux étapes essentielles pour la compréhension de l'influence de l'exposition aux piqûres de moustiques sur la réponse Ac anti-*Plasmodium*.. L'étude d'une cohorte spécifique à chaque étape a permis de décliner les objectifs spécifiques suivants:

1. Étudier l'influence de l'exposition aux piqûres des *Anopheles* sur la réponse immune humorale anti-*Plasmodium* acquise après l'infection : analyse transversale.

2. Étudier l'influence de l'exposition aux piqûres des *Anopheles* et *Aedes* sur la dynamique de la réponse immune humorale acquise après l'infection : analyse longitudinale.

2. Cadre de travail de la thèse et Financement

Les travaux de cette thèse constituent une contribution à l'étude des relations immunologiques Homme-vecteur au cours des maladies transmises par les moustiques. Cette thèse a été effectuée au sein de l'équipe IHVEC (coordinateur : Franck Remoué) ("Immunology of Human Vector Contact") de l'UMR MIVEGEC (IRD, CNRS, Université de Montpellier). Les objectifs de ce projet sont d'identifier des biomarqueurs immuno-sérologiques d'exposition de l'Homme aux piqûres des insectes vecteurs et d'étudier les effets de l'immunomodulation induite par les piqûres des moustiques, sur les réponses immunes anti-*Plasmodium* et des conséquences sur la transmission du paludisme. Elle a été réalisée dans différents instituts et laboratoires en Afrique et en Europe : à l'Institut Pierre Richet de Bouaké / Institut National de la Santé Publique (IPR/INSP) à Bouaké en Côte d'Ivoire, et à la Délégation Régionale Occitanie IRD de Montpellier en France.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés suivant une approche immuno-épidémiologique à partir de prélèvements sanguins collectés au cours de deux études, transversale pour l'une et longitudinale pour l'autre, réalisées dans le cadre des projets suivants :

Le projet « EvaPalCI » : Evaluation du Paludisme en Côte d'Ivoire (Coordinateur: M.A. Adja (IPR/INSP), correspondant IRD: F. Remoué) est une étude multidisciplinaire visant à évaluer le risque de transmission du paludisme dans la ville de Bouaké par l'utilisation d'indicateurs multidisciplinaires prenant en compte les aspects socio-anthropologiques, géographiques, entomologiques, épidémiologiques, parasitologiques et immunologiques de l'infection et de ses risques. Les études ont été financées par l'IRD dans le cadre des projets « Jeune Equipe Associée à l'IRD » et réalisées entièrement à Bouaké au centre de la Côte d'Ivoire (2013-2016). La population d'étude était issue de 3 quartiers urbains (Kennedy quartier résidentiel, N'gattakro et Dar-es-salam quartiers non-résidentiels et de 2 villages situés à la périphérie de la ville de Bouaké (Petessou et Allokokro) (**Figure 19).** Ce projet a porté sur un ensemble de 801 enfants (6 mois à 14 ans) sur l'ensemble de 2 enquêtes transversales. Dans chaque site, 2 passages ont été réalisés : un passage au milieu de la saison des pluies (août 2014) et un passage en fin de saison sèche (mars 2015). A chaque passage, des données socio-anthropologiques, géographiques, entomologiques, cliniques et parasitologiques (goutte épaisse et prélèvements sanguins) ont été collectées.

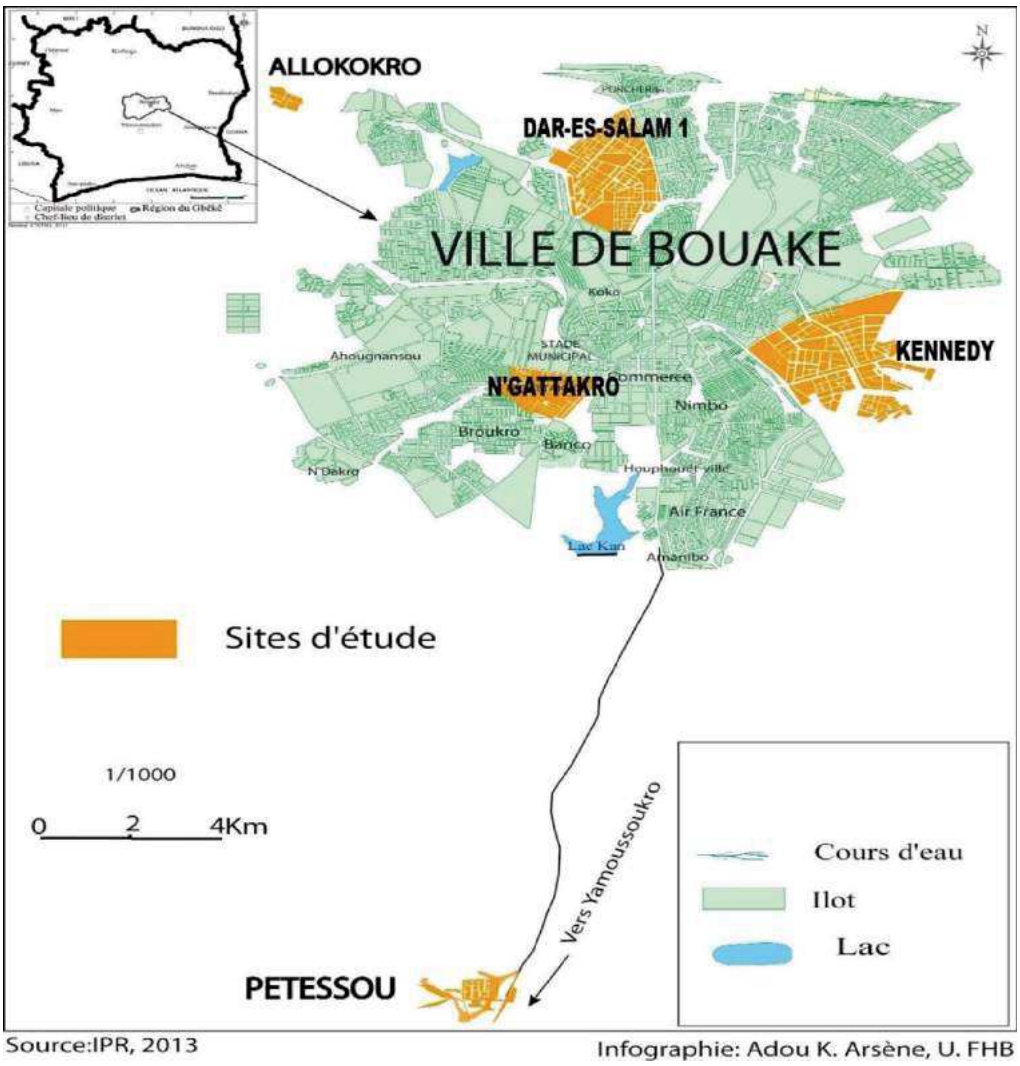


Figure 19: site d'étude du projet JEAI-EvaPalCI

Le projet « PalEvalut » : Evaluation opérationnelle de la lutte intégrée contre le paludisme ; Principal investigateur : Dr Christophe Rogier ; financement Initiative 5% - Expertise France. Ce projet vise à mettre au point et à évaluer des méthodes et des indicateurs, regroupés dans une « boite à outils multidisciplinaires », qui permettraient d'évaluer l'efficacité opérationnelle des méthodes de lutte contre le paludisme. Pour atteindre ces objectifs, une approche multidisciplinaire regroupant des expertises épidémiologiques, entomologiques, parasitologiques, immunologiques, socio-anthropologiques et économiques, a été mise en place. En Côte d'Ivoire, le projet PalEvalut s'est déroulé dans le district sanitaire de Bouaké sous la supervision de Dr Alphonsine Koffi (PI Pays). Cette ville a été sélectionnée par le projet et le PNLP (Programme National de Lutte contre le Paludisme) pour son intérêt

épidémiologique (transmission, diversité de méthodes de lutte mises en œuvre, paludisme urbain) et anthropologique (particularités culturelles).
Au sein du projet PalEvalut, une étude a été menée afin d'étudier l'efficacité et la tolérance des associations artésunate/amodiaquine et artéméther/luméfantrine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* (étude Sens-Vivo). Dans ce cadre, 120 personnes présentant un accès palustre non compliqué ont été traitées par un antipaludique (suivant les recommandations du PNLP) et suivies régulièrement pendant 42 jours (6 semaines). Des données cliniques et prélèvements biologiques ont été collectés dans le cadre de cette étude.

Le choix de la ville de Bouaké pour la réalisation des études JEAI EVAPAL-CI et PALEVALUT répond à plusieurs critères : la zone de Bouaké présente des faciès différents et complementaires au niveau de la transmission du paludisme (entomologie, parasitologie) ; plusieurs études antérieures ont été réalisées à Bouaké avant la crise socio-politique de 2002 et Bouaké est l'une des villes qui a cristallisée toutes les tensions, car étant une zone d'affrontement. Très peu de données ont été recueillies sur l'état de la transmission du paludisme à Bouaké depuis le début de cette crise. Or, les conditions environnementales ont été fortement bouleversées par la guerre. En outre cette ville est le chef-lieu de la région du Gbêkê. Bouaké est la seconde ville de Côte d'Ivoire après Abidjan (la capitale économique) avec plus de 54200 habitants. Sa population est très hétérogène composée d'autochtones Baoulé, d'allogènes ivoiriens (principalement les Dioula). On note également la présense d'une forte communauté de ressortissants africains, provenant pour l'essentiel des pays limitrophes (Mali, du Burkina-Faso et de la Guinée). La ville de Bouaké est située au centre de la Côte d'Ivoire à environ 350 km d'Abidjan. Le paludisme y sévit de façon endémique et sa transmission est assurée par deux vecteurs : *An. gambiae* et *An. funestus* (Dossou-Yovo et al., 1998). Le vecteur *An. gambiae* assure une transmission permanente alors que *An. funestus* assure une transmission saisonnière sur 4 ou 5 mois. La transformation de nombreux bas-fonds qui parcourent la ville en périmètres de riziculture a entrainé un élargissement des bandes humides exploitables avec pour conséquence la création de gîtes larvaires favorables à *An. gambiae*. Ce dernier assure une transmission permanente du paludisme dans de nombreux quartiers de la ville. La ville est composée de plusieurs quartiers et de quelques villages périphériques. La plupart de ces villages sont engloutis par certains quartiers de la ville du fait de la forte démographie et de l'urbanisation rapide. Située dans une zone de transition climatique, Bouaké fait apparaître, d'une année à l'autre, 2 ou 4 saisons : une saison chaude, sèche et non pluvieuse (novembre à

février) ; une saison chaude, humide et pluvieuse (mars à juin) ; une saison fraîche, humide et peu pluvieuse (juillet à août) ; une saison fraîche, humide et pluvieuse (septembre et octobre). Les pluies s'étalent généralement de Mai à Novembre et la saison sèche le reste de l'année. Les moyennes pluviométriques annuelles oscillent entre 1000 et 1200 mm. La température varie peu au cours de l'année, avec des moyennes de 28 à 32° C. L'humidité relative annuelle se situe entre 75 et 90% (Dossou-Yovo et al., 1999). L'espace urbain est parcouru par de nombreux petits cours d'eau, ce qui fait que tous les quartiers de la ville, à l'exception du centre commercial, sont traversés ou limités par des rubans de bas-fonds humides.

3. Financements

Ce travail de thèse n'aurait pu être mené à bien sans le soutien financier de la fondation Méditerranée Infection qui m'a octroyé une allocation doctorale (Décembre 2017-Mars 2021). L'ensemble des travaux de laboratoire a été réalisé également grâce au financement du groupe IHVEC, et la mise à disposition d'antigènes de *Plasmodium* par S. Longagre (Vaximax, France) pour avoir fourni la protéine recombinante *Pf*MSP1p19, E.J. Remarque (Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, Pays-Bas) pour la protéine recombinante *Pf*AMA1, Michael Theisen (Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark) pour les protéines recombinantes *Pf*GLURP et *Pf*MSP3 et L. Almeras *(*Unité Parasitologie et Entomologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France) *pour la protéine* salivaire recombinante 30 kDa de *Culex quinquefasciatus*. J'ai par ailleurs obtenu un financement auprès du Laboratoire Mixte International LAMIVECT pour l'étude portant sur le projet Sens Vivo.

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS

Chapitre I : Influence de l'exposition des moustiques *Anopheles* sur la réponse anticorps anti-*Plasmodium falciparum* : analyse transversale.

Description de l'étude

Cette première étude a été réalisée dans le cadre du projet dénommé JEAI-EvaPalCI. Dans le cadre de ce projet de thèse, cette cohorte nous a permis de mesurer quantitativement les réponses IgG et isotypiques IgG1 et IgG3 spécifiques à 2 Ags de *P. falciparum Pf*AMA1 et *Pf*MSP1 par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) au laboratoire de l'Institut Pierre Richet (IPR-INSP) dans une sous-cohorte regroupant 95 enfants âgés de 0 à 14 ans non infectés au cours de la saison des pluies. Nous nous sommes focalisés sur les enfants non parasités afin d'éviter le biais dû à l'intensité d'infection en cours. Les profils immunologiques de ces individus ont alors été comparés en fonction de leur niveau d'exposition aux piqûres des *Anopheles, et Culex*. L'exposition des enfants à ces moustiques a été évaluée par 2 méthodes différentes et complémentaires : 1- au niveau populationnel (captures entomologiques ; niveau d'exposition dans le quartier) et 2- au niveau individuel par l'utilisation de biomarqueurs immunologiques d'exposition aux piqûres des *Anopheles* (réponse IgG spécifique au peptide salivaire d'*An. gambiae* gSG6-P1). Cette cohorte offrait l'opportunité d'évaluer l'influence de l'exposition aux *Anopheles* et des autres *Culicidae* présents sur les caractéristiques de la réponse immune humorale acquise anti-*Plasmodium falciparum* à un temps donné, en comparant les profils immunologiques de chaque Ag de *Plasmodium falciparum* en fonction de leur niveau d'exposition à *Anopheles*, en prenant en compte les autres facteurs démographiques.

Les résultats issus de nos différentes analyses ont fait l'objet d'un article scientifique publié en 2020 dans la revue Malaria Journal.

Pattern of antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens in individuals differentially exposed to *Anopheles* bites

Kakou G.Aka, Dipomin F. Traoré, André B; Sagna, Dounin D. Zoh, Serge B. Assi, Bertin N'cho Tchiekoi, Akré M. Adja, Franck Remoue and Anne Poinsignon

Malaria J (2020); 19: 83.
Published online 2020 Feb 21. doi: 10.1186/s12936-020-03160-5

Aka *et al. Malar J* (2020) 19:83
https://doi.org/10.1186/s12936-020-03160-5

Malaria Journal

RESEARCH Open Access

Pattern of antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens in individuals differentially exposed to *Anopheles* bites

Kakou G. Aka[1,2*], Dipomin F. Traoré[1,2,3], André B. Sagna[1,2], Dounin D. Zoh[1,4], Serge B. Assi[1], Bertin N'cho Tchiekoi[1], Akré M. Adja[1,4], Franck Remoue[1,2] and Anne Poinsignon[1,2]

Abstract

Background: In malaria-endemic areas, human populations are frequently exposed to immunomodulatory salivary components injected during mosquito blood feeding. The consequences on pathogen-specific immune responses are not well known. This study evaluated and compared the humoral responses specific to merozoite stage vaccine candidates of *Plasmodium falciparum*, in children differentially exposed to *Anopheles* bites in a natural setting.

Methods: The cross-sectional study was carried out in Bouaké (Côte d'Ivoire) where entomological data and blood samples from children (0–14 years) were collected in two sites with similar malaria prevalence. Antibody (IgG, IgG1, IgG3) responses to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 were evaluated by ELISA. Univariate and multivariate analysis were performed to assess the relationship between the immune responses to *P. falciparum* antigens and exposure to *Anopheles* bites in the total cohort and in each site, separately. The individual level of exposure to *Anopheles* bites was evaluated by quantifying specific IgG response to the *Anopheles* gSG6-P1 salivary peptide, which represents a proxy of *Anopheles* exposure.

Results: The anti-*Plasmodium* humoral responses were different according to the level of exposure of children, with those highly exposed to *Anopheles* presenting significantly lower antibody responses to *Pf*MSP1 in total population (IgG and IgG3) and in Petessou village (IgG, IgG1, IgG3). No significant difference was seen for *Pf*AMA1 antigen between children differently exposed to *Anopheles*. In Dar-es-Salam, a neighbourhood where a high *Culex* density was reported, children presented very low antibody levels specific to both antigens, and no difference according to the exposure to *Anopheles* bites was found.

Conclusion: These findings may suggest that immunomodulatory components of *Anopheles* saliva, in addition to other factors, may participate to the modulation of the humoral response specific to *Plasmodium* merozoite stage antigens. This epidemiological observation may form a starting point for additional work to decipher the role of mosquito saliva on the modulation of the anti-*Plasmodium* acquired immunity and clinical protection in combining both field and ex vivo immunological studies.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Malaria, Immunity, Salivary proteins, *Anopheles*, Exposure, Immunomodulation

Background

Despite the progress achieved in controlling malaria, it remains a major health problem contributing to morbidity and mortality especially in children under 5 years of

*Correspondence: ghislain.aka@gmail.com
[2] MIVEGEC, University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

age in sub-Saharan Africa. Substantial reductions in the global burden of malaria were noted during the past two decades but progress has stagnated. In 2017, the World Health Organization (WHO) estimated that 219 million cases of malaria occurred worldwide, an increase of 2 million from the previous year [1]. Malaria elimination efforts are threatened by the emergence of the resistance of *Plasmodium falciparum* to anti-malarial drugs [2], by increasing and widespread mosquito vector resistance to insecticides [3], and by the lack of an effective vaccine conferring strong protective immunity to infection [4].

In malaria-endemic areas, human populations develop natural immunity against *P. falciparum* that can lead to premunition. This acquired protective immunity takes years to develop after repeated exposure to *Plasmodium* parasite, is relatively short-lived, and is partially effective. It can efficiently control malaria parasite infection leading to a decline in clinical malaria since low parasitaemia mostly persists in the presence of circulating antibodies (Abs). Protective immunity is largely mediated by specific Abs, including immunoglobulin G (IgG) and cytophilic sub-classes (IgG1 and IgG3) [5], that mostly target the *P. falciparum* blood-stage antigens (Ags), such as apical membrane antigen 1 (*Pf*AMA1) [6], merozoite surface protein 1 and 3 (*Pf*MSP1, *Pf*MSP3) [7, 8], and glutamate-rich protein (*Pf*GLURP) [9, 10].

Malaria vaccines currently under development aim to prime such protective responses, particularly in young children and infants. To date, varying formulations of *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 account for the majority of the vaccines that have reached the clinic [11], except the pre-erythrocytic vaccine RTS,S/AS01, based on circumsporozoite protein (CSP) from the sporozoite stage. RTS,S is the most promising malaria vaccine, reaching phase 3 in a clinical trial and approved for use by European regulators in 2015 (Mosquirix™). Modest but significant heterogeneity between individuals regarding the efficacy of infection-blocking vaccine was seen across sites, ranging from 40 to 77% [12].

Immune responses are complex traits and vaccine development requires extensive knowledge of the processes and of the determinants that modulate immune responses in human populations. The effect of age, genetic factors, pathogen co-infection, and nutritional status have been more intensively explored and are recognized to influence anti-*Plasmodium* Ab responses and to have some association with malaria clinical protection [13–15].

Environmental factors as chemical, biological and physical factors may also influence immunity activity [16] and vaccine responses [17]. Environmental exposure can drive epigenetic modification which allows for adaptative immune-T cell activation [18] and memory responses [19] as well as exposure to immuno-toxic or -modulatory activities that can altered immune functions. Interestingly, few studies showed that Ab responses to certain specific vaccines (pneumococcal, rabies, and typhoid vaccines) may be influenced by month of vaccine administration [20] suggesting that seasonally variable environmental Ags may have a co-stimulatory effect on immune responses. Changing temperature, diurnal exposure to sunlight, food availability, and exposure to infectious agents may be part of the different season environmental factors that may act on the immune system. In malaria-endemic areas, human populations are repeatedly exposed to salivary components of blood-feeding mosquitoes that possess a variety of pharmacologically active biomolecules with anti-haemostatic, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties to counter the host defense responses activated during a blood meal [21]. There is now evidence that co-injected saliva has immunomodulatory properties, and studies support a role for mosquito saliva in enhancing pathogen transmission via the modulation of Th1/Th2 immune responses [22, 23].

Experimental studies across a wide range of arthropods and their associated pathogens indicated that, generally, insect saliva enhances infection by orientating the immune response of the vertebrate toward a Th2 profile, whereas prior repeated exposure to uninfected bites leads to the development of a Th1 response with a decrease in infection severity [24, 25]. A more recent study in humanized mice suggests that a mixture of Th1 and Th2 responses are upregulated by mosquito saliva and can last for several days in the skin and bone marrow [26]. Most of studies have been performed in murine models and it is obvious that the investigation of this question in human populations from endemic settings is much more complicated. Relatively few studies have investigated the effects of mosquito saliva on human cells ex vivo [27] and on cytokine production from human cells following stimulation with mosquito saliva [28–30]. Altogether, it suggests that human immune response to mosquito saliva is significant and complex: mosquito saliva alters the frequencies of several immune cell populations and cytokine production, in multiple tissues, at several times after blood feeding [26].

The immune microenvironment initiated by arthropod salivary components in the vertebrate host may have consequences for the development of specific immune response against pathogens. So far, few studies have investigated specifically this assumption. Two independent experimental studies suggested that mice exposed either to *Anopheles* or to tick feeding showed a down-regulated Ag-specific immune response compared to naïve mice (model Ag = ovalbumin and BSA, respectively) [31, 32]. Studies extending this approach from murine to

natural infection in humans living in malaria-endemic settings are challenging but required. Previous studies showed that acquired anti-*Plasmodium* IgG responses in children differed in two geographic areas where the level of exposure to *Anopheles* vectors was markedly different [33]. Sarr et al. showed a modulation of the balance of cytophilic Ab responses to parasite Ags according to the level of exposure of children to *Anopheles* bites. High exposure to *Anopheles* bites seemed to down-regulate the protective IgG1 Ab responses to whole *Plasmodium* extracts and to CSP Ag, whereas specific IgG3 responses were similar for the two *Plasmodium* Ags in villages exposed to either low or high levels of *Anopheles* bites [34].

The aim of the present study was to evaluate and compare the immunological profiles of IgG, IgG1, and IgG3 responses specific to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 vaccine candidates, in children differentially exposed to *Anopheles* bites in a natural setting. Interestingly, the intensity of *Anopheles* exposure was assessed at an individual level by evaluating the IgG level specific to the *Anopheles gambiae* gSG6-P1 salivary peptide. For the last decade, new immune-epidemiological tools have been developed that aimed at evaluating the level of exposure to mosquito bites at population and individual level [35]. These innovative tools are based on the measure of human antibody responses to salivary proteins of arthropod vector injected during the bite. As far as the *Anopheles* genus is concerned, the IgG response to the gSG6-P1 peptide (*An. gambiae* Salivary Gland Protein-6 peptide 1) of *An. gambiae* saliva has been identified and validated as a pertinent biomarker of *Anopheles* bites [36–38]. It represents a proxy of human exposure to *Anopheles* bites and is a reliable tool for assessing spatial and temporal heterogeneity of exposure at the individual level [35]. The gSG6-P1 salivary peptide is specific to the *Anopheles* genus, antigenic, easy to synthesize and highly conserved between *Anopheles* mosquitoes.

Methods

Ethics statement

The present study followed the ethical principles according to the Helsinki Declaration, and was approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of Côte d'Ivoire (June 2014; No. 41/MSLS/CNER-dkn). Site leaders provided prior permission to survey on each site and informed consent was obtained from all parents or guardians of children.

Study sites and population

The study was conducted in Bouaké (7° 69 N, 5° 03 W) located in the centre of Côte d'Ivoire. The study area, study design, and local malaria epidemiology have been previously described in detail [39]. Briefly, the climate is tropical humid with two seasons: the dry season runs from November through March, and the rainy season occurs from April to October. The rainy season is marked by two maximum rainfalls, one in June and one in September, with an average annual rainfall of between 1000 and 1600 mm. In this area, malaria transmission is intense with *P. falciparum* the major parasite species [40] and *An. gambiae sensu lato* (*s.l.*). the major vector [41].

The initial cohort consisted of 212 children aged from 6 months to 14 years from two sites (a sub-set of a cohort of 508 children from 5 sites [39]) and enrolled in a cross-sectional study which was carried out during the rainy season (August 2014). Households and children were randomly selected and sociological, geographical, entomological, and clinical data were collected. Children's axillary temperature was measured, and thick films and blood smears were performed for all participants to determine parasite density and *Plasmodium* species. Thick blood smears were fixed and stained with 10% Giemsa and read at double blind by certified microscopists. Asexual parasite densities were counted against 200 microscope fields white blood cells assuming 8000 white blood cells per microlitre. A blood smear was considered negative if no parasites were observed. For quality control, 10% of slides were re-read by blind expert reader.

The present study was carried out on a sub-sample of the initial cohort and consisted of 95 uninfected children aged from 6 months to 14 years from two sites, Dar-es-Salam (a neighbourhood of Bouaké city) and Petessou (a village near Bouaké). Only 76 children were included in the final analysis, after having defined the groups of exposure to *Anopheles* (see below).

For immunological assays, blood samples were collected at the fingertips in microtainer tubes (microvette 500 serum-Gel Starstedt, Marnay, France) and sera were obtained after centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Sera were fractionated into aliquots and then frozen at − 20 °C until used.

Mosquito collection

Adult mosquitoes were collected in June and September 2014, as described [39]. In each of the two sites, six catching points, three indoor and three outdoor were used to collect mosquitoes by landing catches on adult volunteers for two consecutive nights (from 18.00. to 06.00). Adult mosquito catchers gave prior informed consent and received yellow fever vaccination and anti-malarial chemoprophylaxis as recommended by the National Malaria Control Programme. Adult mosquitoes were collected, counted and their species were morphologically classified at the laboratory. The human biting rate (HBR)

of each mosquito species was calculated as the average number of mosquitoes collected per person per night.

Measurement of human IgG antibody level for gSG6-P1 salivary antigen

Human IgG level against the gSG6-P1 salivary antigen of *An. gambiae* was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, 96-well Maxisorp microassay plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gSG6-P1 salivary antigen (GPS 1216, Genepep, Saint Jean de Védas, France) at a concentration of 20 µg/mL in phosphate buffered saline (PBS) using 100 µl/well and incubated at 37 °C for 2 h 30. Plates were blocked for 1 h with 200 µL of protein-free blocking buffer, pH7.4 (Thermo scientific, Rockford, USA). The plates were then washed and sera were incubated in duplicate wells at 4 °C overnight at 1/320 dilution in PBS containing 1% of Tween 20 (1%-PBST). Mouse biotinylated Ab to human IgG (BD Pharmingen, San Diego CA, USA) was incubated at a 1/4000 dilution in 1%-PBST (1 h 30 at 37 °C) and Extravidine biotine peroxydase (Amersham, les Ulis, France) was then added (1/20,000; 1 h at 37 °C). Colorimetric development was carried out using ABTS (2.2′-azinobis (3 ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium; Sigma, St Louis, MO, USA) in citrate buffer (Sigma, pH4, containing 0.003% H_2O_2) and the optical density (OD) was read 2 h later at 405 nm.

Individual results were expressed as the ΔOD value: ΔOD = ODx-ODn, where ODx represents the mean of individual optical density (OD) value in both wells with gSG6-P1 antigen and ODn the individual OD value for each serum without gSG6-P1 antigen.

Children were separated into 2 groups of exposure according to their IgG level to the gSG6-P1 peptide. The mean value of the total population ($\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ mean = 1.25) was determined as the threshold, and individuals (n = 17) presenting $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ mean ± 0.1 ($1.15 < OD_{gSG6\text{-}P1} < 1.35$) have been withdrawn to clearly define 2 groups of individuals differently exposed to *Anopheles*. This results in a 'low exposure group' grouping individuals with $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} < 1.15$ and a 'high exposure group' with individuals with $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} > 1.35$, from either Petessou or Dar-es-Salam site.

Measurement of human IgG, IgG1 and IgG3 antibodies for *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1

IgG, IgG1 and IgG3 level to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 (*Pf*MSP1p_{19}) recombinant proteins were measured by indirect ELISA as previously described [9]. Briefly, 96-well Maxisorp micro-assay plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 recombinant proteins at a final concentration of 1 µg/ml in coating buffer (PBS with red phenol 0.001%) and incubated at 4 °C overnight. The plates were blocked with skimmed milk buffer (5% milk powder in PBS 0.1% Tween 20 (0.1%-PBST) for 1 h at room temperature. Individual sera were diluted in buffer (1% milk powder in 0.1%-PBST) and added in at a final dilution (1/750 for IgG, 1/200 IgG1 and 1/50 for IgG3) for *Pf*MSP1 and (1/7500 for IgG, 1/3000 IgG1 and 1/100 for IgG3) for *Pf*AMA1. Optimal dilutions were determined after several preliminary experiments. Plates were then incubated for 1 h at room temperature with 100 µl/well of HRP-conjugated goat anti-human IgG (Frederick, USA), IgG1 and IgG3 (Binding Site, Birmingham, UK) diluted respectively for *Pf*MSP1 (1/7500; 1/2000 and 1/1000) and for *Pf*AMA1 (1/5000; 1/2000 and 1/1000) in skimmed milk buffer (1% milk powder in 0.1%-PBST). TMB (Eco Tek, Kuldysen 10, Denmark) was used as a substrate and the reaction was stopped by the addition of 0.2 M H_2SO_4 (100 µL/well). The OD was read after 30 min at 450 nm. Individual results (ΔOD) were expressed as above: ΔOD = ODx-ODn, where ODx represents the mean of individual OD value in both wells with *P. falciparum* antigen and ODn the individual OD value for each serum without antigen.

Data management and statistical analysis

Chi^2 test was used to compare *Plasmodium* prevalence and HBR between the two studied sites. As antibody levels were not normally distributed, nonparametric tests were used for analyses. A Wilcoxon rank-sum test was used for comparison of Ab levels between two independent groups. Linear regression was performed to compare Ab levels according to age of participants. Generalized linear model (GLM) was used to assess the relationship between the Ab titres specific to *P. falciparum* antigens and covariate factors (age, site and group of exposure). All statistical analysis was done using Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) and R software (Version 3.3.3; R Core Team, Vienna, Austria). All differences were considered as significant at p value < 0.05.

Results

Study population characteristics, parasitological and entomological data

Population demographic (gender ratio and mean age), parasitological (prevalence and geometric mean of *P. falciparum* density), and entomological data are presented for the initial and the study cohorts, according to the two study sites, in Table 1. In the initial cohort (n = 212), no significant difference was observed in *P. falciparum* prevalence (56.6 and 54%, respectively, $\chi^2 = 0.057$, df = 1, $p = 0.811$) and in parasite density in infected children (geometric mean (log 10) 3.5 parasites/µl and 4.6 parasites/µl, respectively, $p = 0.079$) between Petessou and Dar-es-Salam sites.

Table 1 Characteristics of study population: demographic, parasitological, and entomological data

Site	Dar-es-Salam	Petessou	Total	*p*
Initial cohort				
n	99	113	212	–
Thick blood smears				
Negative (%)	43 (43.4)	52 (46.0)	95 (44.8)	0.706
Positive (%)	56 (56.6)	61 (54.0)	117 (55.2)	0.811
Parasite density[a]				
Geometric mean (min–max)	3.55 (2.93–4.29)	4.58 (3.72–5.64)	3.18	0.079
Human biting rate (BHN)				
An. gambiae	2	78	–	***
Culex s.l.	81	1	–	***
Study cohort[b]				
n	35	41	76	–
Gender ratio (male/female)	0.94 (17/18)	0.95 (20/21)	0.95 (37/39)	0.98
Mean age (years, 95% CI)	6.5 (5.4–7.6)	7.2 (6.3–8.2)	6.9 (5.9–7.9)	0.35
IgG to gSG6-P1[c]				
Low exposure group	0.73 (0.61;0.90)	0.97 (0.74;1.08)	–	0.071
High exposure group	1.84 (1.61;2.11)	1.45 (1.38;1.62)	–	0.001

n number of children, *BHN* bites/human/night

[a] Parasite density is expressed as log10 of the number of parasites per µL

[b] Study cohort is composed of uninfected children with $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} < 1.15$ or $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} > 1.35$

[c] Anti-gSG6-P1 IgG median value (25th; 75th percentile); ***$p < 0.001$

Table 1 presents the entomological data collected in each study site. The HBR of *An. gambiae* was significantly higher in Petessou than in Dar-es-Salam, with 78 bites per human per night (BHN) and 2 BHN reported, respectively. In Petessou, other *Anopheles* species were captured in much lower proportion: *Anopheles pharoensis* (1.8 BHN), *Anopheles funestus* (0.3 BHN) and *Anopheles welcomei* (0.17 BHN). The HBR of other major nocturnal mosquitoes (*Culex spp.)* was much higher in Dar-es-Salam than in Petessou, with 81 BHN reported in Dar-es-Salam whereas almost no *Culex* was collected in Petessou.

In this study, only the non-infected children residing in the two sites ($n = 43$ from Dar-es-Salam and $n = 52$ from Petessou) were selected. The gender ratio ($p = 0.98$) and mean age ($p = 0.35$) of the sub-set of children were not significantly different between the two study sites (Table 1).

The specific IgG level to the gSG6-P1 salivary peptide representing a proxy of the intensity of exposure to *Anopheles* bites was also assessed in uninfected children residing in both sites. Children presented a wide range in $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ from 0 to 2.57 (Fig. 1). The median level of IgG response to the gSG6-P1 peptide was similar in children from Dar-es-Salam and Petessou ($p = 0.129$). Children were then separated into low or high exposure group according to their individual $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ value. Children

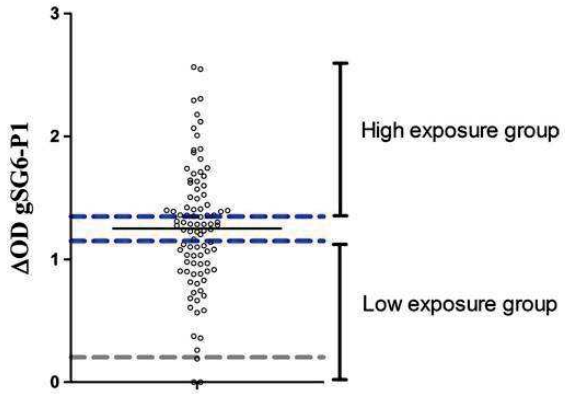


Fig. 1 IgG response to *An. gambiae* gSG6-P1 salivary peptide in all uninfected children. Dot plots show the individual specific IgG level to gSG6-P1. Bar indicates the mean value, the grey dot line indicates the cut-off value of seropositivity and the blue dot lines represent the $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ mean ± 0.1 that allow to define the two groups of exposure to *Anopheles* bites. Individuals with $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} < 1.15$ were considered as low exposed and individuals with $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} > 1.35$ were considered as high exposed to *Anopheles* bites

from the low exposure group ($\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} < 1.15$) had a similar IgG median level in Dar-es-Salam and in Petessou sites ($p = 0.071$), which indicated a similar level of exposure to *Anopheles* bites for the children from the

low exposure group from each site. On the contrary, children from the high exposure group ($\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} > 1.35$) from Dar-es-Salam had a significantly higher IgG median value than children from Petessou ($p = 0.001$), indicating that children from the high exposure group from Dar-es-Salam were higher exposed to *Anopheles* than did children from Petessou.

Univariate analysis of specific IgG, IgG1 and IgG3 levels and potential covariate factors

Total IgG, IgG1 and IgG3 responses of the participants to two merozoite (*Pf*AMA1 and *Pf*MSP1) *P. falciparum* stage antigens were evaluated. Univariate analysis was used to investigate the relation between specific anti-*Plasmodium* Ab responses and demographic factors (age, gender) and environmental factors (village and level of exposure to *Anopheles* bites) in the total cohort and in each study site, separately. The results presented in Table 2 showed that the level of the different Ab responses was not significantly ($p > 0.05$) influenced by age or gender.

The comparison of the Ab responses between groups of exposure indicated that a higher exposure to *Anopheles* mosquitoes was associated with a lower Ab levels to *Pf*MSP1 antigen in the total population and in Petessou, but not in Dar-es-Salam. Indeed, children from the high exposure group had significantly lower IgG, IgG1 and IgG3 responses specific to *Pf*MSP1 compared to children from the low exposure group in total population ($p = 0.016$, $p = 0.034$ and $p = 0.04$, respectively) and in Petessou ($p = 0.001$, $p = 0.002$ and $p = 0.03$, respectively). In contrast, difference in *Anopheles* exposure was not associated with a statistically significant effect on the levels of Ab responses to *Pf*AMA1 antigen in the total population as well as in each site.

The comparison of Ab responses between site showed children from Dar-es-Salam presented significant lower Ab levels to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 *P. falciparum* Ags compared to children from Petessou (all $p < 0.0001$). In Dar-es-Salam, the median values of Ab responses specific to both Ags were very low.

Multivariate analysis of specific IgG, IgG1 and IgG3 responses in total population and in each study site

A multivariate analysis was used to further assess the relationship between the immune responses to *P. falciparum* merozoite stage antigens and exposure to mosquito bites. Age, level of exposure (group of exposure) and site were used as predictor variables (Table 3). In a general pattern, children from Dar-es-Salam presented significantly lower Ab responses to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 than children from Petessou (all $p < 0.01$) and no association was found between Ab responses to *P. falciparum* antigens and age. In the total population, a negative association was observed between the level of exposure and the anti-*Pf*MSP1 Ab titres. Indeed children from the high exposure group presented a significant lower anti-*Pf*MSP1 IgG (-0.443, $p = 0.043$) and IgG3 (-0.422, $p = 0.033$) titres whereas no association was found between Ab responses to *Pf*AMA1 and groups of exposure. The same trend was observed only for children from Petessou, when the analysis was restricted to site. A higher exposure to *Anopheles* mosquitoes was associated with a trend toward decreased of the IgG (-1.02, $p = 0.003$), IgG1 (-1.09, $p = 0.006$) and IgG3 (-0.653, $p = 0.047$) responses to *Pf*MSP1 antigen only.

Discussion

Evidence now suggested that arthropod vectors on top of transmitting pathogens may also have roles in facilitating transmission and influencing disease evolution [25]; for instance the immuno modulatory properties of the co-injected saliva acts both on innate and adaptative immune responses of the vertebrate host [42]. Host immune responses to arthropod saliva are varied and complex, and depend both on the host and vector species [43]. The present study aimed to investigate the relationships between specific Ab responses to merozoite stage antigens (*Pf*MSP1 and *Pf*AMA1) in children differently exposed to *Anopheles* bites in two study sites in Côte d'Ivoire. Results showed that children higher exposed to *Anopheles* bites presented lower IgG, IgG1 and IgG3 responses to *Pf*MSP1 in Petessou. No association between the level of exposure and Ab responses to *Pf*AMA1 antigen was observed.

Exposure to *Anopheles* bites was investigated via two complementary methods: at the site scale with entomological indicators (human landing catches (HLC)) and at the individual level by using a serological biomarker of exposure based on the quantification of the IgG response specific to the *An. gambiae* gSG6-P1 salivary peptide. The two approaches did not give the same level of information about the exposure to *Anopheles* bites. HLC method indicates the mean number of bites that an individual may receive per night. Thus, it appreciates as an approximate proxy the level of exposure for each *Culicidae* species at site scale but does not take into account the inter-individual heterogeneity of exposure in natural setting. Indeed, environmental factors generating hot-spots of exposure (proximity to breeding sites for example), attraction an individual exerts on mosquitoes and the use of personal protection against mosquito bites (such as nets and coils) suggest that exposure to *Anopheles* bites can be highly variable from house to house and also between people living in the same house. Only the serological approach

Table 2 Influence of covariate factors on specific IgG, IgG1 and IgG3 antibody levels in children

Covariate factors	Ab response	Total population	*p*	Petessou	*p*	Dar-es-Salam	*p*
Gender (female/male)[a]	IgG anti-*Pf*MSP1	0.16 (0.38;1.12)/0.38 (0.49;1.11)	0.435	0.76 (0.21;2.05)/1.01 (0.19;2.26)	0.835	0.02 (0;0.09)/0.12 (0;0.53)	0.151
	IgG1 anti-*Pf*MSP1	0.14 (0.25;0.92)/0.41 (0.55;1.31)	0.122	0.34 (0.13;1.17)/0.59 (0.30;2.79)	0.07	0.08 (0.01;0.18)/0.13 (0;0.67)	0.58
	IgG3 anti-*Pf*MSP1	0.21 (0.33;0.96)/0.24 (0.40;1.10)	0.322	0.63 (0.24;1.74)/0.65 (0.27;2.70)	0.861	0.00 (0;0.04)/0.03 (0;0.18)	0.065
	IgG anti-*Pf*AMA1	1.02 (0.755;1.563)/0.91 (0.83;1.68)	0.452	1.93 (1.2;2.91)/2.68 (1.28;3.02)	0.506	0.00 (0;0.60)/0.01 (0;0.37)	0.131
	IgG1 anti-*Pf*AMA1	1.19 (1.06;2.15)/0.86 (1.04;2.17)	0.565	3.24 (1.67;3.89)/3.41 (1.86;3.94)	0.758	0.01 (0;0.67)/0.06 (0; 0.58)	0.145
	IgG3 anti-*Pf*AMA1	0.58 (0.55;1.29)/0.37 (0.63;1.49)	0.529	1.15 (0.62;2.34)/1.87 (0.56;3.08)	0.557	0.01 (0; 0.47)/0.034 (0; 0.27)	0.204
Age (years)[b]	IgG anti-*Pf*MSP1	0.002	0.280	− 0.001	0.330	− .031	0.888
	IgG1 anti-*Pf*MSP1	− 0.009	0.551	0.018	0.564	− 0.029	0.788
	IgG3 anti-*Pf*MSP1	0.052	0.287	0.068	0.063	− 0.001	0.335
	IgG anti-*Pf*AMA1	0.001	0.316	− 0.014	0.491	− 0.029	0.825
	IgG1 anti-*Pf*AMA1	− 0.010	0.601	− 0.027	0.878	− 0.029	0.823
	IgG3 anti-*Pf*AMA1	0.029	0.077	0.028	0.150	− 0.018	0.539
Group of exposure *Anopheles* bites (low/high)[a]	IgG anti-*Pf*MSP1	0.53 (0.09;1.97)/0.12 (0.01;0.58)	*0.016*	1.56 (0.76;2.54)/0.27 (0.06;0.67)	*0.001*	0.07 (0;0.16)/0.02 (0;0.55)	0.944
	IgG1 anti-*Pf*MSP1	0.40 (0.10;1.41)/0.16 (0.04;0.50)	*0.034*	1.17 (0.40;2.89)/0.18 (0.13;0.48)	*0.002*	0.10 (0.03;0.27)/0.09 (0;0.87)	1.000
	IgG3 anti-*Pf*MSP1	0.25 (0.05;2.01)/0.11 (0.00;0.48)	*0.040*	1.29 (0.41;2.72)/0.45 (0.23;1.14)	*0.030*	0.02 (0; 0.12)/0.01 (0; 0.10)	0.505
	IgG anti-*Pf*AMA1	1.00 (0.04;2.74)/0.80 (0;2.57)	0.345	1.58 (1.17;3.01)/2.50 (1.37;2.88)	0.864	0.03 (0.02;0.14)/0 (0; 0.65)	0.285
	IgG1 anti-*Pf*AMA1	0.78 (0.07;3.26)/0.98 (0.01;3.43)	0.456	2.70 (1.56;3.95)/3.51 (2.54;3.89)	0.368	0.06 (0;04; 0.283)/0.01 (0;0.79)	0.216
	IgG3 anti-*Pf*AMA1	0.79 (0.04;2.62)/0.17 (0.0;1.16)	0.076	2.01 (0.78;3.03)/0.93 (0.50;2.07)	0.124	0.02 (0.0; 0.29)/0.01 (0;0.43)	0.533
Site (Petessou/Dar-es-Salam)[a]	IgG anti-*Pf*MSP1	0.80 (0.21;2.20)/0.05 (0;0.22)	*< 0.0001*				
	IgG1 anti-*Pf*MSP1	0.45 (0.18;2.12)/0.09 (0;0.27)	*< 0.0001*				
	IgG3 anti-*Pf*MSP1	0.64 (0.26;1.83)/0.01 (0;0.12)	*< 0.0001*				
	IgG anti-*Pf*AMA1	2.47 (1.25;2.97)/0.01 (0;0.18)	*< 0.0001*				
	IgG1 anti-*Pf*AMA1	3.33 (1.71;3.91)/0.02 (0.01;0.21)	*< 0.0001*				
	IgG3 anti-*Pf*AMA1	1.52 (0.61;2.8)/0.02 (0;0.05)	*< 0.0001*				

[a] Median (25th; 75th percentile)

[b] Adjusted R-squared

Table 3 Multivariate analysis of specific IgG, IgG1 and IgG3 antibody response levels in children

Ab response	Covariate factors	Total population		Petessou		Dar-es-Salam	
		Estimate	*p*	Estimate	*p*	Estimate	*p*
IgG anti-*Pf*MSP1	Constant	1.240		1.488		0.172	
	Age	0.018	0.58	0.069	0.715	−0.005	0.871
	Group of exposure (ref = low exposure)	−0.443	*0.043*	−1.02	*0.003*	0.268	0.232
	Site (ref = Petessou)	−0.823	*< 0.001*				
IgG1 anti-*Pf*MSP1	Constant	1.230		1.623		0.245	
	Age	0.006	0.883	−0.004	0.943	−0.012	0.753
	Group of exposure (ref = low exposure)	−0.397	0.107	−1.09	*0.006*	0.386	0.148
	Site (ref = Petessou)	−0.66	*0.008*	–	–	–	–
IgG3 anti-*Pf*MSP1	Constant	0.951		0.881		0.081	
	Age	0.057	0.066	0.081	0.154	0.027	0.363
	Group of exposure (ref = low exposure)	−0.422	*0.033*	−0.653	*0.047*	−0.126	0.496
	Site (ref = Petessou)	−0.895	*< 0.0001*	–	–	–	–
Ab response	**Covariate factors**	**Total population**		**Petessou**		**Dar-es-Salam**	
		Estimate	***p***	**Estimate**	***p***	**Estimate**	***p***
IgG anti-*Pf*AMA1	Constant	−0.025		1.64		0.129	
	Age	0.018	0.562	0.044	0.416	−0.007	0.813
	Group of exposure (ref = low exposure)	0.196	0.324	0.222	0.506	0.211	0.311
	Site (ref = Petessou)	−1.871	*< 0.0001*	–	–	–	–
IgG1 anti-*Pf*AMA1	Constant	0.028		2.37		0.216	
	Age	0.006	0.87	0.029	0.683	−0.008	0.813
	Group of exposure (ref = low exposure)	0.379	0.125	0.557	0.201	0.216	0.366
	Site (ref = Petessou)	−2.576	*< 0.0001*	–	–	–	–
IgG3 anti-*Pf*AMA1	Constant	0.021		1.42		0.045	
	Age	0.046	0.167	0.069	0.262	0.014	0.548
	Group of exposure (ref = low exposure)	−0.279	0.198	−0.525	0.174	0.053	0.724
	Site (ref = Petessou)	−1.462	*< 0.0001*	–	–	–	–

reflects the human–*Anopheles* contact and integrates the individual risk factors of being bitten. It provides for each participant a proxy of the individual level of exposure to *Anopheles* bites and thus, is more appropriate for reflecting the inter-individual heterogeneity of exposure in natural setting. Numerous studies have evidenced the *Anopheles* gSG6-P1 salivary peptide represents a reliable and complementary tool to entomological methods for assessing spatial and temporal heterogeneity of exposure to *Anopheles* bites at the individual level [35].

On the basis of comparison of HBR, children from Petessou had significantly higher exposure to *Anopheles* bites than did children from Dar-es-Salam, whereas the comparison of anti-gSG6-P1 IgG level ($\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ median and range) suggested that exposure to *Anopheles* bites was similar between the two sites. In Dar-es-Salam, the low number of *Anopheles* female caught during the entomological surveys may be explained by a low availability of breeding sites for *Anopheles* in urban setting. *Anopheles* classically like small, open, sunlit, fresh stagnant water suggesting a mosaic of isolated pockets of *Anopheles* breeding sites in the urban context that may result of local hot spots of *Anopheles* exposure that could not have been identified. As mentioned above, the use of vector control strategies and/or sociological factors specific to the urban context may also explain the discrepancies observed between the two approaches [39]. Parasitological data indicated that *Plasmodium* prevalence and density (the gold standard to measure the transmission of malaria) were similar between the two sites, thereby suggesting that children were exposed similarly to malaria transmission.

According to their individual anti-gSG6-P1 IgG level, children were separated into two exposure groups: low and high group of exposure to *Anopheles* bites. In the present study, when applying the cut-off of positivity ($\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} = 0.204$) [44, 45], one individual from Petessou and two from Dar-es-Salam were seronegative indicating that all but three individuals can be considered

exposed to *Anopheles*. In addition, the wide range of $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ values in either Petessou and Dar-es-Salam, suggested that participants with higher $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ values were bitten more in comparison to those with lower $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ values and thereby applying a threshold (mean $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1} \pm 0.1$) would stratified the population in two groups with different level of exposure to *Anopheles* bites.

IgG, IgG1 and IgG3 levels to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 merozoite stage antigens were compared according to demographic factors and between groups of exposure. No statistically significant effect of age (univariate and multivariate analysis) or gender (univariate analysis) on the level of Abs specific to *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1 was noted. According to univariate and multivariate analysis, specific Ab titres to *Pf*MSP1 differed significantly between groups of exposure in total population (IgG and IgG3) and in Petessou village (IgG, IgG1 and IgG3). A higher exposure to *Anopheles* bites was associated with a significant trend toward lower IgG, IgG1 and IgG3 responses specific to *Pf*MSP1. A higher Ab titres could be expected in children higher exposed to *Anopheles* bites and, therefore, to malaria transmission. Nevertheless, the epidemiological observation in the present study is consistent with studies that reported a down-regulated immune response to specific Ag in mice exposed to arthropod saliva compared to naïve mice [31, 32]. Exposure to biting mosquitoes may lead to a modification of the host's immune cells and of the balance between Th1 and Th2 cytokine production [26]. Several experimental murine studies showed that Th2 cytokines as IL-4, the inhibitory cytokine IL-10 and the pro-inflammatory cytokine TNF, were up-regulated after uninfected *Aedes, Culex* or *Anopheles* mosquito bites [31, 46, 47]. The secretion of the immunosuppressive IL-10 cytokine could increase the proliferation of T regulatory cells and down-regulate specific Ab immune response because it inhibits Ag presentation, IFN-γ expression, and macrophage activation. IL-10 has also been involved in the balance of cytophilic Ab responses [48]. Thus, it is conceivable that the potential decrease of Ab levels in children higher exposed may be associated with a lower IL-10 production. This hypothesis could be assessed by analysing the ex vivo cytokine production of immune cells from individuals differently exposed to *Anopheles* bites.

Only a few epidemiological studies have previously reported an association between exposure to *Anopheles* immunomodulatory saliva and acquisition of natural immunity to *Plasmodium* in natural settings. Sarr et al. reported that children with higher exposure to *Anopheles* bites presented a down-regulated IgG1 response to whole *Plasmodium* extract and to CSP Ag compared to children lower exposed, whereas no effect was observed for the IgG3 isotype response [34]. Dechavanne et al. reported that an environmental variable (quantitative index related to the spatiotemporal risk of exposure to *Anopheles* mosquitoes) was significantly associated with high anti-*Plasmodium* Ab levels in infants (6–18 month old infants) [13]. A recent study in malaria elimination context also showed a positive association between *Anopheles* exposure and IgG responses to *Pf*CSP and *Pf*MSP1 Ags [49]. Differences observed between studies might be attributed to the different context of exposure to *Anopheles* bites. Indeed, the history and intensity of exposure to mosquito bites may have different effect on immune system, as mentioned in experimental studies that reported a immunostimulatory effect with low concentrations of saliva whereas high concentrations were immunosuppressive [50]. Human studies in different malaria context are therefore needed even if challenging, due to numerous co-factors from the parasite, the human-host or environment that may modulate human immune system. The present study was carried out in uninfected children in order to minimize the antigenic boost of recent infection, thus the time since previous *P. falciparum* infection and rates of antibody decay may also participate in the differences observed between individuals from different groups of exposure. This represents a limit to the present study in addition to the small sample size. Malaria prevalence was near 50% in Petessou, thus it could be expected that individuals were regularly infected by *Plasmodium* parasites and that their last infection, symptomatic or asymptomatic, was recent. Other factors such as genetic background, co-infections, or nutritional status may also explain some of the differences in the immunological profiles observed between the two exposure groups.

No association between groups of exposure to *Anopheles* bites and humoral responses (IgG, IgG1 and IgG3) to *Pf*AMA1 merozoite stage Ag was showed. This difference of effect according to *Plasmodium* Ags may be due to different intrinsic characteristics to merozoite Ags.

Children from Dar-es-Salam presented low level of anti-*Plasmodium* Abs. Parasitological data indicated that both sites had a similar intensity of malaria transmission with around 50% of malaria prevalence in the initial population. This suggests that factors other than parasite exposure alone may modulate anti-*Plasmodium* humoral responses. For example, the effect of human genetic factors cannot be excluded since the study children did not belong to the same ethnic group [51, 52]. The population from Dar-es-Salam is mostly composed of Dioula and Manding, whereas autochthonous Baoulé live in the rural village of Petessou. Mosquito saliva is known to contain close to 100 secretory proteins, and comparative analyses indicated that *Culex* and *Aedes* saliva have specific salivary proteins not found in *Anopheles* saliva [53, 54].

The exposure to other mosquito salivary components with immunomodulatory properties may also participate in the modulation of the anti-*Plasmodium* immune responses. The presence of anthropophilic *Culex* species was reported only in Dar-es-Salam site by entomological data. Exposure to immunomodulatory components of *Culex* saliva may also contribute, in addition to other factors, to the down-regulation of the immune responses observed in children from Dar-es-Salam. The availability of a serological biomarker of exposure assessing specifically the exposure to *Culex spp.* bites at the individual level would be valuable in multivariate analysis to strengthen the hypothesis.

Further studies are needed in order to better characterize the effects of mosquito saliva on human immune system, for example by analysing ex vivo cytokine production after stimulation of peripheral blood of mononuclear cells from individuals differentially exposed to mosquito bites. More evidence on its immunomodulatory effects on naturally acquired immunity to *Plasmodium* has to be provided with field studies in different epidemiological context.

Immune responses are complex traits and little is known about the environmental factors modulating acquired immunity to *Plasmodium* and premunition despite its essential role in the clinical outcome of malaria infections and in the development of vaccine immunity. Salivary modulators of the immune system could be prime targets for the development of transmission-blocking vaccines. Indeed, taking advantage of the modulation induced by saliva (e.g., neutralization of the immune suppression) would help the host's immune system to respond to pathogens. Interestingly, over the past few years, combining pathogen and salivary Ags in a single vaccine is seen as a valuable option [55]. Elucidating the mechanism may also lead to the discovery of new immunosuppressive molecules of therapeutic interest. These findings may also have an important impact on the evaluation of vaccine efficacy. Inter-individual variability in humoral immune responses to a specific *P. falciparum* antigen has been reported in different studies evaluating the immunogenicity of vaccine candidates [56, 57]. The exposure to immunomodulatory insect salivary proteins during or after the immunization period could modulate the acquisition as well the durability of Ab responses to vaccine Ag, as noted for rabies or typhoid vaccines [20]. It could also have consequences on the immunological profiles induced in terms of intensity and/or isotype distribution, and thus on the efficacy of the protective immunity. In this framework, it is clear that a better understanding of the modulation of protective and anti-vaccine immune responses by epidemiological and environmental factors is of public health relevance and would be valuable for malaria vaccine development.

Conclusion

The main results of the present study show children differently exposed to *Anopheles* bites presented different levels of Ab responses to *Pf*MSP1 antigen. These findings may suggest that immunomodulatory components of *Anopheles* saliva, in addition to other factors, may participate to the modulation of the humoral response specific to *Plasmodium* merozoite stage antigens. This epidemiological observation may form a starting point for additional works to better evidence and characterize the effects of mosquito saliva on the human immune system and on the anti-*Plasmodium* acquired immunity in combining both field and ex vivo immunological studies.

Abbreviations

gSG6-P1: *An. gambiae* Salivary Gland Protein-6 peptide 1; IgG: Immunoglobulin G; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; ΔOD: Delta optical density; *Pf*AMA1: *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1; *Pf*MSP1: *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1; HBR: Human biting rate; BHN: Bites per human per night.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the populations of Bouaké's health neighbourhood (Dar-es-Salam and Petessou) sites, especially householders and guardians of children for their kind support and collaboration. We kindly thank S. Longagre (Vaximax, France) for providing the *Pf*MSP1p_{19} recombinant protein and E.J. Remarque (Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, The Netherlands) for the *Pf*AMA1 recombinant protein. We would also like to especially thank Isabella Athanassiou (Bonn, Germany) for language editing.

Authors' contributions

AP, FR, AMA, and SBA conceived the study. KGA, DFT, ABS, DDZ, and BNT collected data in field surveys; KGA, DFT, and ABS carried out the immunological assessments; and KGA analysed the data. KGA drafted the first manuscript. AP participated in preparing and writing the manuscript and revised the manuscript. AP, FR, ABS, and AMA provided guidance on revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was integrated into the EVAPALCI multidisciplinary study funded by the IRD (*Jeune Equipe Associée à l'IRD*, French National Institute for Research for Sustainable Development; *Département des Programmes de Recherche et de la Formation au Sud*; convention of February 18, 2013). K.G. Aka and A. B. Sagna were supported by a PhD and a postdoctoral fellowships provided by *Méditerannée Infection Foundation,* respectively. D.F. Traoré and D.D. Zoh were supported by fellowships from the IRD.

Availability of data and materials

The dataset analysed during the current study is available from the last author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This study followed the ethical principles recommended by the Edinburgh revision of the Declaration of Helsinki. The present study was approved by the Ethics Committee of the Côte d'Ivoire Ministry of Health (June 2014; No. 41/MSLS/CNER-dkn). Written informed consent of all parents or guardians of children who participated in the study was obtained before inclusion.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Author details
[1] Institut Pierre Richet, Institut National de Santé Publique, Bouaké, Côte d'Ivoire. [2] MIVEGEC, University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France. [3] UFR Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire. [4] UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Received: 21 August 2019 Accepted: 12 February 2020
Published online: 21 February 2020

References

1. WHO. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Lu F, Culleton R, Cao J. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. N Engl J Med. 2017;377:306.
3. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. Trends Parasitol. 2016;32:187–96.
4. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. J Clin Invest. 2010;120:4168–78.
5. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Parasite Immunol. 2006;28:51–60.
6. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. Infect Immun. 2008;76:759–66.
7. Wang Q, Zhao Z, Zhang X, Li X, Zhu M, Li P, et al. Naturally acquired antibody responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1) C-terminal 19 kDa domains in an area of unstable malaria transmission in southeast Asia. PLoS ONE. 2016;11:e0151900.
8. Kana IH, Garcia-Senosiain A, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Malhotra P, et al. Cytophilic antibodies against key *Plasmodium falciparum* blood stage antigens contribute to protection against clinical malaria in a high transmission region of eastern India. J Infect Dis. 2018;218:956–65.
9. Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. PLoS ONE. 2009;4:e7590.
10. Dodoo D, Theisen M, Kurtzhals JA, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, et al. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis. 2000;181:1202–5.
11. Miura K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. Expert Rev Vaccines. 2016;15:765–81.
12. The RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS, S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 african sites. PLoS Med. 2014;11:e1001685.
13. Dechavanne C, Sadissou I, Bouraima A, Ahouangninou C, Amoussa R, Milet J, et al. Acquisition of natural humoral immunity to *P. falciparum* in early life in Benin: impact of clinical, environmental and host factors. Sci Rep. 2016;6:33961.
14. Goncalves RM, Lima NF, Ferreira MU. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. Pathog Glob Health. 2014;108:173–8.
15. Fillol F, Sarr JB, Boulanger D, Cisse B, Sokhna C, Riveau G, et al. Impact of child malnutrition on the specific anti-*Plasmodium falciparum* antibody response. Malar J. 2009;8:116.
16. MacGillivray DM, Kollmann TR. The role of environmental factors in modulating immune responses in early life. Front Immunol. 2014;5:434.
17. Zimmermann P, Curtis N. Factors that influence the immune response to vaccination. Clin Microbiol Rev. 2019;32:e00084.
18. Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. Nat Immunol. 2003;4:235–40.
19. Northrop JK, Thomas RM, Wells AD, Shen H. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. J Immunol. 2006;177:1062–9.
20. Moore SE, Collinson AC, Fulford AJ, Jalil F, Siegrist CA, Goldblatt D, et al. Effect of month of vaccine administration on antibody responses in The Gambia and Pakistan. Trop Med Int Health. 2006;11:1529–41.
21. Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annu Rev Entomol. 1987;32:463–78.
22. Schneider BS, Mathieu C, Peronet R, Mécheri S. *Anopheles stephensi* saliva enhances progression of cerebral malaria in a murine model. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:423–32.
23. Styer LM, Lim P-Y, Louie KL, Albright RG, Kramer LD, Bernard KA. Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. J Virol. 2011;85:1517–27.
24. Schneider BS, Soong L, Zeidner NS, Higgs S. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to Sindbis virus infection. Viral Immunol. 2004;17:565–73.
25. Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102:400–8.
26. Vogt MB, Lahon A, Arya RP, Kneubehl AR, Spencer Clinton JL, Paust S, et al. Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006439.
27. Liu S, Kelvin DJ, Leon AJ, Jin L, Farooqui A. Induction of Fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by *Armigeres subalbatus* saliva. PLoS ONE. 2012;7:e41145.
28. Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. Parasite Immunol. 2003;25:127–34.
29. Koga C, Sugita K, Kabashima K, Matsuoka H, Nakamura M, Tokura Y. High responses of peripheral lymphocytes to mosquito salivary gland extracts in patients with Wells syndrome. J Am Acad Dermatol. 2010;63:160–1.
30. Tokura Y, Matsuoka H, Koga C, Asada H, Seo N, Ishihara S, et al. Enhanced T-cell response to mosquito extracts by NK cells in hypersensitivity to mosquito bites associated with EBV infection and NK cell lymphocytosis. Cancer Sci. 2005;96:519–26.
31. Depinay N, Hacini F, Beghdadi W, Peronet R, Mécheri S. Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites. J Immunol. 2006;176:4141–6.
32. Menten-Dedoyart C, Couvreur B, Thellin O, Drion PV, Herry M, Jolois O, et al. Influence of the *Ixodes ricinus* tick blood-feeding on the antigen-specific antibody response in vivo. Vaccine. 2008;26:6956–64.
33. Sarr JB, Remoue F, Samb B, Dia I, Guindo S, Sow C, et al. Evaluation of antibody response to *Plasmodium falciparum* in children according to exposure of *Anopheles gambiae* s.l. or *Anopheles funestus* vectors. Malar J. 2007;6:117.
34. Sarr JB, Samb B, Sagna AB, Fortin S, Doucoure S, Sow C, et al. Differential acquisition of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* according to intensity of exposure to *Anopheles* bites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;106:460–7.
35. Sagna A, Poinsignon A, Remoue F. Epidemiological applications of assessing mosquito exposure in a malaria-endemic area. In: Sagna A, editor. Arthropod vector: controller of disease transmission, vol. 2. New York: Elsevier; 2017. p. 209–29.
36. Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. PLoS ONE. 2008;3:e2472.
37. Traoré DF, Sagna AB, Adja AM, Zoh DD, Adou KA, Lingué KN, et al. Exploring the heterogeneity of human exposure to malaria vectors in an urban setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, using an immuno-epidemiological biomarker. Malar J. 2019;18:68.
38. Ya-Umphan P, Cerqueira D, Parker DM, Cottrell G, Poinsignon A, Remoue F, et al. Use of an *Anopheles* salivary biomarker to assess malaria transmission risk along the Thailand-Myanmar border. J Infect Dis. 2017;215:396–404.
39. Traoré DF, Sagna AB, Adja AM, Zoh DD, Lingué KN, Coulibaly I, et al. Evaluation of malaria urban risk using an immuno-epidemiological biomarker of human exposure to *Anopheles* bites. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1353–9.

40. Toure OA, Landry TNG, Assi SB, Kone AA, Gbessi EA, Ako BA, et al. Malaria parasite clearance from patients following artemisinin-based combination therapy in Côte d'Ivoire. Infect Drug Resist. 2018;11:2031–8.
41. Koffi AA, Ahoua Alou LP, Adja MA, Chandre F, Pennetier C. Insecticide resistance status of *Anopheles gambiae s.s.* population from M'Bé: a WHOPES-labelled experimental hut station, 10 years after the political crisis in Côte d'Ivoire. Malar J. 2013;12:151.
42. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. Parasit Vectors. 2011;4:187.
43. Wanasen N, Nussenzveig RH, Champagne DE, Soong L, Higgs S. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Med Vet Entomol. 2004;18:191–9.
44. Drame PM, Machault V, Diallo A, Cornélie S, Poinsignon A, Lalou R, et al. IgG responses to the gSG6-P1 salivary peptide for evaluating human exposure to *Anopheles* bites in urban areas of Dakar region, Sénégal. Malar J. 2012;11:72.
45. Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Cornelie S, Le Mire J, Toto JC, et al. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. PLoS ONE. 2010;5:e15596.
46. Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, Diamond MS, Rico-Hesse R. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. J Virol. 2012;86:7637–49.
47. Zeidner NS, Higgs S, Happ CM, Beaty BJ, Miller BR. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. Parasite Immunol. 1999;21:35–44.
48. Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. Infect Immun. 2004;72:1240–7.
49. Ya-Umphan P, Cerqueira D, Cottrell G, Parker DM, Fowkes FJI, Nosten F, et al. *Anopheles* salivary biomarker as a proxy for estimating *Plasmodium falciparum* malaria exposure on the Thailand-Myanmar border. Am J Trop Med Hyg. 2018;99:350–6.
50. Mejri N, Rutti B, Brossard M. Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. Parasitol Res. 2002;88:192–7.
51. Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traoré B, Crompton PD, et al. Ethnic differences in susceptibility to malaria: what have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? Acta Trop. 2015;146:152–6.
52. Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Färnert A, et al. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. Microbes Infect. 2005;7:110–7.
53. Ribeiro JMC, Charlab R, Pham VM, Garfield M, Valenzuela JG. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34:543–63.
54. Calvo E, Sanchez-Vargas I, Favreau AJ, Barbian KD, Pham VM, Olson KE, et al. An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, *Culex tarsalis*. BMC Genomics. 2010;11:51.
55. Zahedifard F, Gholami E, Taheri T, Taslimi Y, Doustdari F, Seyed N, et al. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *Leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2751.
56. Mamo H, Esen M, Ajua A, Theisen M, Mordmuller B, Petros B. Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. Malar J. 2013;12:51.
57. Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez J-F, Tall A, et al. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. Microbes Infect. 2002;4:31–5.

Publisher's Note

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

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Chapitre 2 : Influence de l'exposition aux moustiques *Anopheles* et *Aedes* sur la dynamique de la réponse anticorps anti-*Plasmodium* : analyse longitudinale.

Description de l'étude

Cette deuxième étude s'intègre dans le volet « Sens Vivo » développé dans le projet PalEvaLut qui visait à évaluer *in vivo* l'efficacité de 2 CTA selon un protocole opérationnel standard établi par les acteurs du projet. L'étude porte sur les patients vus en consultation au niveau des formations sanitaires et présentant un accès palustre diagnostiqué par un TDR et par une goutte épaisse. Notre étude intègre le suivi de 120 personnes (2 bras de 60 personnes) respectant les critères d'inclusion qui ont reçu un des 2 traitements à base de CTA évalués. Ces patients ont été suivis pendant 42 jours. Des échantillons sanguins recueillis sur papiers buvards ont été effectués à J0 et J42 et ont permis les dosages immunologiques par ELISA. Le design de ce suivi de cohorte nous offre l'opportunité de suivre la dynamique dans le temps (42 jours) de l'immunité anti-*Plasmodium*, représentée par la réponse IgG aux Ag de *P. falciparum* étudiés. Notre objectif était d'étudier les facteurs relatifs à l'hôte, au parasite et environnementaux (exposition aux piqûres de moustiques) qui étaient associés à cette dynamique. La demi-vie des Ac IgG étant d'environ 3 semaines, tous les patients inclus dans l'étude ont été identifiés porteurs de *Plasmodium*, donc ont forcément développé une réponse immune anti-*Plasmodium* avant la mise en place du traitement à J0. L'efficacité du traitement a été évaluée par un suivi de l'infection par goutte épaisse. On a pu donc suivre le maintien de la réponse Ac anti-*Plasmodium* dans le temps sans l'effet stimulateur d'une nouvelle infection sur la réponse immune humorale à certains antigènes candidats vaccins de *Plasmodium falciparum*.

Dans le cadre de cette thèse nous avons évalué les réponses IgG à *Pf*AMA-1, *Pf*MSP-1, *Pf*CSP, *Pf*MSP-3, *Pf*GLURP(R0) et aux extraits totaux de schizontes de *P. falciparum* à J0 et à J42 chez les patients dont les sérums étaient disponibles et qui ne présentaient pas de nouvelle infection au cours du suivi (n=68). Nous avons analysé l'évolution de ces réponses Ac (profils immunologiques) en fonction de leur niveau d'exposition au cours de l'étude par l'utilisation des biomarqueurs individuels d'exposition représentés par l'évaluation de la réponse IgG contre le peptide salivaire gSG6-P1 pour *Anopheles* et contre le peptide N-term 34kDA pour *Aedes*. L'exposition aux moustiques a été analysée soit de manière individuelle pour chaque genre de moustiques et également de manière combinée afin de prendre en compte les 2 expositions ensemble. L'intensité d'infection et le niveau initial d'IgG à J0 ont également été pris en compte dans les analyses.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique publié en 2021 dans le journal Tropical Medicine and Infectious Disease.

Influence of Host-Related Factors and Exposure to Mosquito Bites on the Dynamics of Antibody Response to *Plasmodium falciparum* Antigens

Kakou Ghislain Aka, Serge Stephane Yao, Eric A. Gbessi, Akré M. Adja, Vincent Corbel, Alphonsine A. Koffi, Christophe Rogier, Serge B. Assi, Offianan A. Touré, Franck Remoue and Anne Poinsignon

Trop Med Infect Dis 2021 Dec; 6(4):185.
Published online 2021 Oct 18. doi: 10.3390/tropicalmed6040185

Tropical Medicine and Infectious Disease

MDPI

Article

Influence of Host-Related Factors and Exposure to Mosquito Bites on the Dynamics of Antibody Response to *Plasmodium falciparum* Antigens

Kakou G. Aka [1,2], Serge S. Yao [3], Eric A. Gbessi [3], Akré M. Adja [1,4], Vincent Corbel [2], Alphonsine A. Koffi [1], Christophe Rogier [5,6], Serge B. Assi [1,7], Offianan A. Toure [3], Franck Remoue [1,2] and Anne Poinsignon [1,2,*]

1 Institut Pierre Richet/Institut National de Santé Publique, Bouaké, Côte d'Ivoire; ghislain.aka@gmail.com (K.G.A.); adjamaurice@yahoo.fr (A.M.A.); koffi_alphonsine@yahoo.fr (A.A.K.); assisergi@yahoo.fr (S.B.A.); franck.remoue@ird.fr (F.R.)
2 MIVEGEC, University of Montpellier, IRD, CNRS, 34000 Montpellier, France; vincent.corbel@ird.fr
3 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan 01 BP 490, Côte d'Ivoire; yaoserstephane@gmail.com (S.S.Y.); ericadji@yahoo.fr (E.A.G.); andre_offianan@yahoo.fr (O.A.T.)
4 UFR Biosciences, University Felix Houphouet Boigny, Abidjan 01 BP V34, Côte d'Ivoire
5 Primum Vitare!, Paris, France; christophe.rogier@gmail.com
6 Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo 101, Madagascar
7 Programme National de Lutte contre le Paludisme, Abidjan, Côte d'Ivoire
* Correspondence: anne.poinsignon@ird.fr

Citation: Aka, K.G.; Yao, S.S.; Gbessi, E.A.; Adja, A.M.; Corbel, V.; Koffi, A.A.; Rogier, C.; Assi, S.B.; Toure, O.A.; Remoue, F.; Poinsignon, A. Influence of Host-Related Factors and Exposure to Mosquito Bites on the Dynamics of Antibody Response to *Plasmodium falciparum* Antigens. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 185. https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040185

Academic Editor: Paul Horrocks

Received: 9 September 2021
Accepted: 11 October 2021
Published: 18 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Humoral immunity to *Plasmodium falciparum* is acquired after repeated infections, and can lead to clinical protection. This study aimed to evaluate how human-, parasite-, and environment-related determinants can modulate the dynamics of IgG responses to *Plasmodium falciparum* after an infection. Individuals (n = 68, average age = 8.2 years) with uncomplicated malaria were treated with ACT and followed up for 42 days. IgG responses to *P. falciparum* merozoite antigens (*Pf*MSP1, *Pf*MSP3, *Pf*AMA1, *Pf*GLURP-R0), to whole schizont extract (*Pf*Schz), and to *Anopheles* gSG6-P1 and *Aedes* Nterm–34 kDa salivary peptides were measured. Regression analyses were used to identify factors that influence the dynamics of IgG response to *P. falciparum* antigen between D0 and D42, including demographic and biological factors and the level of exposure to mosquito bites. The dynamics of IgG response to *P. falciparum* differed according to the antigen. According to multivariate analysis, IgG responses to *Pf*Schz and to *Pf*GLURP-R0 appear to be affected by exposure to *Aedes* saliva and are associated with age, parasite density, and anti-*Plasmodium* pre-existing immune response at study inclusion. The present work shows that human exposure to *Aedes* saliva may contribute, in addition to other factors, to the regulation of anti-*Plasmodium* immune responses during a natural infection.

Keywords: *Plasmodium falciparum*; malaria; *Anopheles*; *Aedes*; humoral acquired immunity; saliva; immunomodulation; exposure

1. Introduction

In malaria-endemic settings, human populations acquire humoral immunity to *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) after repeated infections, which can lead to clinical protection in reducing blood-stage parasitemia and life-threatening symptoms. Natural protective acquired immunity was first highlighted in studies where passive transfer of purified immunoglobulin G (IgG) obtained from malaria-immune adults successfully reduced *Plasmodium* parasitemia in children [1,2]. Although the targets and mechanisms of this protective immunity are not completely understood, several studies suggest that high antibody (Ab) levels against certain blood-stage merozoite antigens play an important

role in clinical protection, making these *Plasmodium* antigens potential anti-malaria vaccine candidates. Clinical protective immunity is dependent on high concentrations of IgG as well as of cytophilic IgG1 and IgG3 Abs to blood-stage antigens, including apical membrane antigen 1 (*Pf*AMA1) [3,4], merozoite surface protein 1 and 3 (*Pf*MSP1, *Pf*MSP3) [5–7], and glutamate-rich protein (*Pf*GLURP-R0) [8]. However, recent study has found greater associations with protection when measuring functional antibodies that fix complement than antibodies that inhibit growth [9]. Longitudinal immunological studies have reported anti-*P. falciparum* Ab responses increase and peak within 1–2 weeks after a malaria infection, and then generally decline rapidly, suggesting a short-lived duration of circulating IgG to merozoite antigens (2–3 weeks) [10,11]. On the other hand, Ab responses may last for many years, and this persistence was positively associated with age, as a reflection of cumulative exposure to *Plasmodium* infections [12,13]. Immune responses are complex traits and may be influenced by different determinants in addition to intrinsic Ab half-life. A deeper understanding of host- and parasite-related factors, as well as of environmental factors, modulating the antigen-specific Ab response dynamics after a *Plasmodium* infection is important in selecting which antigens are valuable for the development of serological surveillance tools or anti-malaria vaccines.

Age, genetic factors, parasite density, previous exposure to *Plasmodium*, pathogen co-infection, and nutritional status are known to influence anti-*Plasmodium* Ab responses [14–17]. Environmental factors may also influence vertebrate immunity activity; annual seasonality is found to be an important environmental factor influencing cytokine production [18]. Immunomodulatory components of mosquito saliva are an interesting but often overlooked environmental factor.

In malaria-endemic areas, human populations are repeatedly exposed to salivary components of blood-feeding mosquitoes that possess a variety of pharmacologically active biomolecules with anti-hemostatic, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties [19]. Mosquito immunomodulatory salivary proteins act both on innate and adaptive immunity [20], and studies suggested that T-cell populations are particularly susceptible to the effects of mosquito saliva [21,22]. T- and B-cell proliferation seems to be inhibited in a dose-dependent manner. High concentrations of saliva or repeated pre-exposure to mosquito saliva create an immunosuppressed environment, whereas decreasing saliva concentrations, instead, modulate the Th1/Th2 immune response [23–26]. A study examining immune responses to the bites of *An. stephensi* reported mast cell degranulation leading to local fluid and neutrophil influx and lymph node hyperplasia as a result of the recruitment of lymphocytes, dendritic cells, and monocytes [27]. *Anopheles* saliva also induced IL-10 in draining lymph nodes and downregulated antigen-specific T-cell responses [21]. Repeated pre-exposure to *Anopheles* bites also seems to skew the response towards that of the Th1 phenotype and to protect against *Plasmodium yoelii* infection [28], but these results are controversial [29,30]. Thus, human immune responses modulated by mosquito saliva are significant and complex in altering the frequencies of several immune cell populations and of cytokine production in multiple tissues, and can last for several days in the skin and at the systemic level [26].

However, there is presently only a limited understanding of the immune microenvironment initiated by arthropod salivary components in the vertebrate host and their role in the modulation of specific immunity against pathogens. A limited number of experimental studies showed that mice exposed to arthropod bites had a down-regulated antigen-specific immune response compared with naïve mice [21,31]. Studies in human populations living in malaria-endemic areas showed that acquired anti-*Plasmodium* Ab responses differed in children with varying exposure to *Anopheles* bites. A difference in the cytophilic Ab response to *Plasmodium* according to the intensity of exposure to *Anopheles* bites was reported, with a down-regulated IgG1 level seen in children with higher exposure, while IgG3 levels were similar in children with low or high exposure to *Anopheles* bites [32]. More recently, a study suggested that, in addition to other factors, *Anopheles* saliva may also down-modulate the anti-*Pf*MSP1 IgG, IgG1, and IgG3 immunity [33].

The major aims of the present study were to explore the key human-, parasite-, and environment-related factors that modulate anti-*Plasmodium falciparum* Ab dynamics after an infection. To address these aims, individuals with an uncomplicated clinical malaria attack visiting a health center in Bouaké (Côte d'Ivoire) were enrolled in the study, treated with artemisinin-based combination therapy (ACT), and followed up for 42 days. The variation in the anti-*Plasmodium* IgG response during follow-up and the identification of factors that may influence its dynamics were assessed through univariate and multivariate regression analysis. *Plasmodium* merozoite-stage specific antigens (*Pf*MSP1, *Pf*MSP3, *Pf*AMA1, and *Pf*GLURP-R0) and schizont extract (*Pf*Schz) were selected for their differences in immunogenicity and persistence [34,35] and for their potential in an advanced malaria vaccine [36].

The intensity of *Anopheles* and *Aedes* exposure was assessed at the individual level by evaluating the IgG response to the *Anopheles* gSG6-P1 and *Aedes* Nterm–34-kDa salivary peptides. During the last decade, these serological biomarkers were developed and aimed at evaluating the level of exposure to mosquito bites [37,38]. Specific human IgG against salivary peptides from *Anopheles* (gSG6-P1) and *Aedes* (Nterm–34 kDa) represents a proxy of human exposure to *Anopheles* and *Aedes* bites and is a reliable tool for assessing the spatial and temporal heterogeneity of exposure at the individual level [39,40].

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The present study followed the ethical principles recommended by the Edinburgh revision of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Côte d'Ivoire Ministry of Health (June 2014; No. 41/MSLS/CNER-dkn). Site leaders provided prior permission to survey on each site and written informed consent of all parents or guardians of children who participated in the study was obtained before inclusion.

2.2. Study Area

The study was conducted in Dar-es-Salam, a neighborhood of Bouaké city located in the center of Côte d'Ivoire, from April to June 2016. The local climate and malaria epidemiology have been previously described [33,41]. The area has intense malaria transmission and *P. falciparum* accounts for more than 95% of all human malaria infections [42], with *An. gambiae s.l.* being the major vector [43,44]. The climate is tropical humid with two seasons: The dry season runs from November through March, and the rainy season from April to October. Malaria transmission is perennial with seasonal upsurges during the rainy season.

2.3. Study Design, Procedure, and Sample Collection

The study was carried out during a clinical trial that aimed to assess the in vivo efficacy of artemisinin-based anti-malarial combination therapies. Details of the study, clinical procedures, and drug administration are described elsewhere [45]. Briefly, patients (n = 120, age > 6 months) with uncomplicated malaria and monospecific *P. falciparum* infestation confirmed by microscopy (parasite density between 2000 and 200,000 asexual parasites/μL of blood), axillary temperature of ≥37.5 °C, or a history of fever over the past 24 h, with body weight ≥5 kg, and who were able to take oral medications and follow study procedures were included in the study. All participants were treated with artemisinin-based combination therapies—artesunate + amodiaquine (AS + AQ) or artemether + lumefantrine (AL) —for 3 days (day 0 (D0), D1, D2), and then visited every week (between D7 and D42). Blood samples were collected repeatedly on D0, D3, and weekly from D7 to the end point of the follow-up (D42), for thick and thin blood smears. Dried blood spots (DBS) on Whatman 3 MM filter paper were collected on D0 and D42, air-dried and stored in plastic bags at +4 °C until immunological analysis. Thick blood smears were fixed and

stained with 10% Giemsa and read double-blind by two certified microscopists; discordant readings were re-examined by a third qualified independent microscopist. Asexual parasite densities were counted against 200 microscope fields assuming 8000 white blood cells per microliter. A blood smear was considered negative if no parasites were observed.

The present study was carried out with the blood samples collected on D0 and D42 from 68 individuals out of the initial 120, including only individuals not lost to follow-up, without therapeutic failure, not becoming re-infected during the follow-up, and whose blood samples on D0 and D42 were available.

2.4. Parasite and Salivary Antigens

The *Plasmodium* merozoite-stage specific antigens (*Pf*MSP1, *Pf*MSP3, *Pf*AMA1, and *Pf*GLURP-R0) were produced in recombinant form and kindly provided by collaborators. *Pf*MSP-1p19 (Uganda-Palo-Alto strain) was expressed in a Baculovirus/insect cell system [46]; the recombinant *Pf*AMA1 (amino-acids 25–545, FVO strain) was expressed in *Pichia pastoris* [47]; and *Pf*MSP3 (amino acids 212–380, F32 strain) and *Pf*GLURP-R0 (amino acids 25–514, F32 strain) were expressed in *Escherichia coli* [48,49]. The schizont extracts (*Pf*Schz) were produced from *P. falciparum* cultures (strain 07/03, [50]). The gSG6-P1 and Nterm–34 kDa salivary peptides [51,52] were synthesized and purified (purity: >95%) by Genepep (St-Jean de Vedas, France). Peptides were shipped in lyophilized form and then resuspended separately in milliQ water and stored in aliquots at −20 °C until use.

2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Human Antibody Response to P. falciparum Antigens, gSG6-P1 and Nterm–34 kDa Salivary Peptides

Standardized dried blood spots (diameter: 1 cm) of each participant at two time points (D0 and D42) were eluted each in 350 µL phosphate buffered saline containing 0.1% Tween 20 (0.1% PBST) at +4 °C for 48 h. Human IgG levels against the gSG6-P1, Nterm–34 kDa, *Pf*Schz, *Pf*AMA1, *Pf*MSP1, *Pf*MSP3, and *Pf*GLURP-R0 antigens were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Subsequently, 96-well Maxisorp micro-assay plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4 °C at a dilution of 1/1200 for *Pf*Schz, 1 µg/mL for *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1, and 2 µg/mL for *Pf*MSP3 and *Pf*GLURP-R0. Plates were blocked with 5% skimmed milk powder (*w/v*) in 0.1% PBST for 1 h at room temperature. Individual eluates diluted in buffer (1% milk powder in 0.1% PBST) were added for incubation (2 h at room temperature) at a final dilution of 1/10 for *Pf*Schz, 1/50 for *Pf*MSP3 and *Pf*GLURP-R0, and 1/200 for *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1. Plates were washed three times between each step with washing buffer (0.1% PBST). HRP-conjugated goat anti-human IgG (Frederick, USA), diluted at 1/1000 for *Pf*MSP3, 1/2500 for *Pf*GLURP-R0, and 1/5000 for all the other *P. falciparum* antigens, was added, and samples were incubated for 1 h at room temperature. After four further washes, TMB (Kementec, Taastrup, Denmark) was used as a substrate and the reaction was stopped by adding 0.2 M H_2SO_4 (100 µL/well). The optical density (OD) was read after 30 min at 450 nm. All samples were tested in duplicate, and if there was a discrepancy of greater than 25% between duplicates, the sample was retested. Individual results (ΔOD) are expressed as: ΔOD = ODx − ODn, where ODx represents the mean of the individual OD value in both wells with *P. falciparum* antigen and ODn the individual OD value for each eluate without antigen. A pool of positive hyperimmune serum collected from adult residents in a malaria-endemic area [32] was included on each plate to allow for standardization of day-to-day and plate-to-plate variation. Standard curves were established using human purified IgG protein (The Binding Site, Saint-Egreve, France) to convert ΔOD values for each sample into IgG concentrations (*CPf* in ng/mL). Each plate included a calibration (standard) curve with eight doubling dilutions of human purified IgG (3.12–400 ng/mL for schizont extract; 0.78–100 ng/mL for *Pf*AMA1 and *Pf*MSP1; 0.58–75 ng/mL for *Pf*GLURP-R0 and *Pf*MSP3). To construct the standard curve, we plotted the OD values at the corresponding known concentrations of purified human

IgG, and then defined the standard curve using linear regression analysis. The IgG concentration of blood samples from participants were predicted from this equation based on the OD value. European nonimmune individual sera (n = 16, France) served as negative controls to determine the cut-off value for seropositivity for each *Plasmodium* antigen, defined as mean OD plus three standard deviations (mean[ΔODneg] +3 SDneg).

Serology testing of human exposure to mosquito salivary antigens (Nterm–34 kDa and gSG6-P1) was carried out by ELISA as described in [33] but with some modifications. Sera were incubated in duplicate wells at 4 °C overnight at a dilution of 1/40 in 0.1% PBST, mouse biotinylated Ab to human IgG (BD Pharmingen, San Diego CA, USA) was incubated at a dilution of 1/2000 in 1% PBST, and streptavidin biotin peroxidase was then added (1/1000; 1 h at 37 °C). Individual results are expressed as the ΔOD value: ΔOD = ODx-ODn, as mentioned above. Specific anti-gSG6-P1 and Nterm–34 kDa IgG levels were also assessed in European individuals (n = 16, France) to calculate the cut-off value for seropositivity for mosquito exposure (mean[ΔODneg] + 3 SDneg).

2.6. Immunological Data Analysis

The dynamics of specific IgG responses to *P. falciparum* antigens were investigated for each individual during the follow-up. Results are expressed as a $\Delta CPf_{D42\text{-}D0}$ value, calculated according to the formula $\Delta CPf_{D42\text{-}D0} = CPf_{D42} - CPf_{D0}$.

In the present study, we were interested in the effect of mosquito exposure on the evolution of humoral immunity to *Plasmodium* following an infection. Assuming that anti-salivary peptide IgG responses are transient and wane within a few weeks [53], evaluating the exposure on D42 may reflect exposure since current infection. Thus, individuals were separated into groups of exposure according to their IgG responses to the gSG6-P1 and Nterm–34 kDa peptides on D42. The mean values of the IgG responses to the salivary peptides were determined as the thresholds to define two groups of participants with different exposures (single-genus exposure) to *Anopheles* (lower exposure [LE_{Ano}] < $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ = 1.41 < higher exposure [HE_{Ano}]) and two groups with different exposures to *Aedes* (lower exposure [LE_{Ae}] < $\Delta OD_{Nterm\text{-}34\,kDa}$ = 1.10 < higher exposure [HE_{Ae}]). Then, from these four groups of single-genus exposure, three exposure groups (combined *Anopheles* and *Aedes* exposure) were defined as follows: individuals with lower exposure to both *Anopheles* and *Aedes* were included in group E2 (Low); individuals with higher exposure to both *Anopheles* and *Aedes* were included in group E4 (High); and individuals from the lower-exposure group to one mosquito genus and from the higher-exposure group to the other mosquito genus were included in group E3 (Intermediate).

2.7. Covariates

Individual characteristics were analyzed as categorical (gender, ACT treatment) or continuous (age, weight, hemoglobin) variables to estimate their influence on the dynamics of Ab responses. Parasite density and immunologic responses (anti-*Plasmodium* IgG concentration on D0 and anti-salivary peptide IgG levels on D42) were analyzed as continuous variables in the linear analyses.

2.8. Statistical Analysis

Data generated from assays in the form of ΔOD values were entered into Microsoft Excel worksheets, and raw ΔOD representing IgG responses to *P. falciparum* were converted into concentration (*CPf* ng/mL). All statistical analyses were conducted in R (Version 3.3.3; R Core Team, Vienna, Austria) with "tidyverse lattice" and "moment" packages. Figures were generated in R using the "ggplot2" package. A cut-off for seropositivity was determined for each antigen, and individuals were categorized as seropositive if their Ab response was above the cut-off value.

As immunologic data were not normally distributed, nonparametric tests were used for statistical analyses. The Wilcoxon signed-rank test was used to examine individual

differences in Ab during the follow-up, the Mann–Whitney U (Wilcoxon rank-sum) test was run for comparison of Ab levels between two independent groups, and the Kruskal–Wallis test was used for differences among more than two groups. The association between two continuous variables was determined through Spearman's correlation coefficient (Spearman's rho, and p values are reported).

Multivariate linear regression models were then used for all covariates with a p-value of < 0.20 in univariate analysis. Final models were adjusted by backward selection and by removing non-significant variables of $p > 0.05$. Maximum likelihood method tests were used to identify the best-fitting models according to the Akaike information criterion (AIC) value. All differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Population Baseline Characteristics

A total of 68 individuals were included in this study: 41 (60.3%) females and 27 (39.7%) males with an average age of 8.2 years (95% confidence interval (CI), (6.9–9.5)). The age structure of the population was 22 children ≤5 years, 24 children between 6 and 9 years of age, and 22 participants ≥10 years. The overall mean *P. falciparum* density at study inclusion was 54,965 parasites/µL (95% CI, (42,673–70,798)), and there was no difference in parasite density between age groups ($p = 0.369$). The mean hemoglobin (Hb) concentration was 12.38 g/dL and 11.82 g/dL, respectively, on D0 and D42 ($p = 0.665$).

3.2. Human IgG Response to P. falciparum and Mosquito Salivary Antigens during Follow-Up

The concentration levels of IgG to *P. falciparum* antigens (ng/mL) and to mosquito salivary peptides (in OD value), as well as seroprevalence both at the time of inclusion (D0) and at the end of the follow-up (D42), are presented in Table 1.

Table 1. IgG seroprevalence and level of IgG response to *Plasmodium falciparum* antigens and to gSG6-P1 and Nterm–34 kDa salivary peptides on D0 and D42.

	D0		D42		p Value [b]
	IgG Prevalence [a] (%)	Median (IQR)	IgG Prevalence (%)	Median (IQR)	
*Pf*AMA1	70.58	5.78 (0.43–1.28)	73.52%	2.64 (0.70–9.53)	0.110
*Pf*GLURP-R0	70.58	0.20 (0.02–0.64)	17.65%	0.04 (0–0.12)	**<0.001**
*Pf*MSP1	61.76	1.95 (0.30–25.0)	51.47%	2.27 (0.40–9.65)	0.541
*Pf*MSP3	82.35	0.13 (0–0.37)	61.76%	0.12 (0–0.50)	0.987
*Pf*Schz	100	1.15 (0.78–1.76)	100%	2.09 (1.31–2.85)	**<0.0001**
gSG6-P1	100	1.32 (1.12–1.60)	100%	1.41 (1.07–1.61)	0.760
Nterm–34 kDa	100	1.06 (0.91–1.25)	100%	1.1 (0.86–1.31)	0.638

IQR: Interquartile range. Median values of IgG concentration to *P. falciparum* antigens expressed at 10–3 ng/µL. [a] European nonimmune individual sera ($n = 16$, France) served as negative controls to determine the cut-off value for seropositivity for each *Plasmodium* antigen, defined as mean OD plus three standard deviations (mean[ΔODneg] + 3 SDneg). [b] p value for the comparison of the antibody levels between D0 and D42 for each antigen, determined by Wilcoxon rank-sum test.

On D0, most of the individuals had a specific IgG response to *P. falciparum* antigens, ranging from 61.8% for *Pf*MSP1 to 100% for *Pf*Schz. For all merozoite antigens, the seroprevalence decreased during the follow-up, except for *Pf*AMA1, for which a similar rate was noted between D0 and D42. All individuals had a specific IgG response to *Pf*Schz at the two time points.

A wide range of anti-*Pf*AMA1, anti-*Pf*MSP1, and anti-*Pf*Schz IgG concentration levels on D0 and D42 were observed in individuals, whereas other anti-*Plasmodium* IgG responses were much more limited. Anti-*Pf*Schz IgG median levels increased significantly during the follow-up ($p < 0.0001$), whereas participants had significantly lower anti-

*Pf*GLURP-R0 IgG median levels at the end of the follow-up ($p < 0.001$). No significant differences were noted in the median levels of IgG responses to *Pf*AMA1, *Pf*MSP1, and *Pf*MSP3 between D0 and D42.

We also evaluated the individual level of exposure to *Anopheles* and *Aedes* bites at the two time points by assessing the IgG response to the *Anopheles* gSG6-P1 and *Aedes* Nterm–34 kDa salivary peptides. The seroprevalence of anti-salivary peptide IgG was 100% and the wide range of $\Delta OD_{gSG6\text{-}P1}$ and $\Delta OD_{Nterm\text{-}34\,kDa}$ values indicated that all participants were exposed to mosquito bites, albeit at different levels of exposure. However, no differences in the IgG median levels were noted between D0 and D42 (Wilcoxon test, $p > 0.05$) for the two salivary antigens, indicating a similar exposure to *Anopheles* and *Aedes* bites before (exposure estimated on D0) and during the cohort follow-up (exposure estimated on D42).

3.3. Dynamics of IgG Responses to P. Falciparum According to Anopheles and Aedes Exposure

We assessed the evolution of the concentration of IgG against *P. falciparum* antigens ($\Delta C\mathit{Pf}_{D42\text{-}D0}$) in participants according to their individual levels of exposure to *Anopheles* and *Aedes* bites. Exposure was considered first at a single-genus level (*Anopheles* [LE_{Ano} and HE_{Ano}] or *Aedes* [LE_{Ae} and HE_{Ae}] separately) and, secondly, at a combined level (*Anopheles* and *Aedes* taken together: E2 = low-, E3 = intermediate-, E4 = high-exposure groups).

First, we compared the dynamics of IgG responses to *Plasmodium* antigens ($\Delta C\mathit{Pf}_{D42\text{-}D0}$) between the groups with lower and higher exposure to *Anopheles* or *Aedes* bites (Figure 1). The dynamics of immune responses were calculated as the concentration at D42 minus the concentration at D0, which meant that the median values close to zero showed similar response levels between the 2 time points, not zero antibodies.

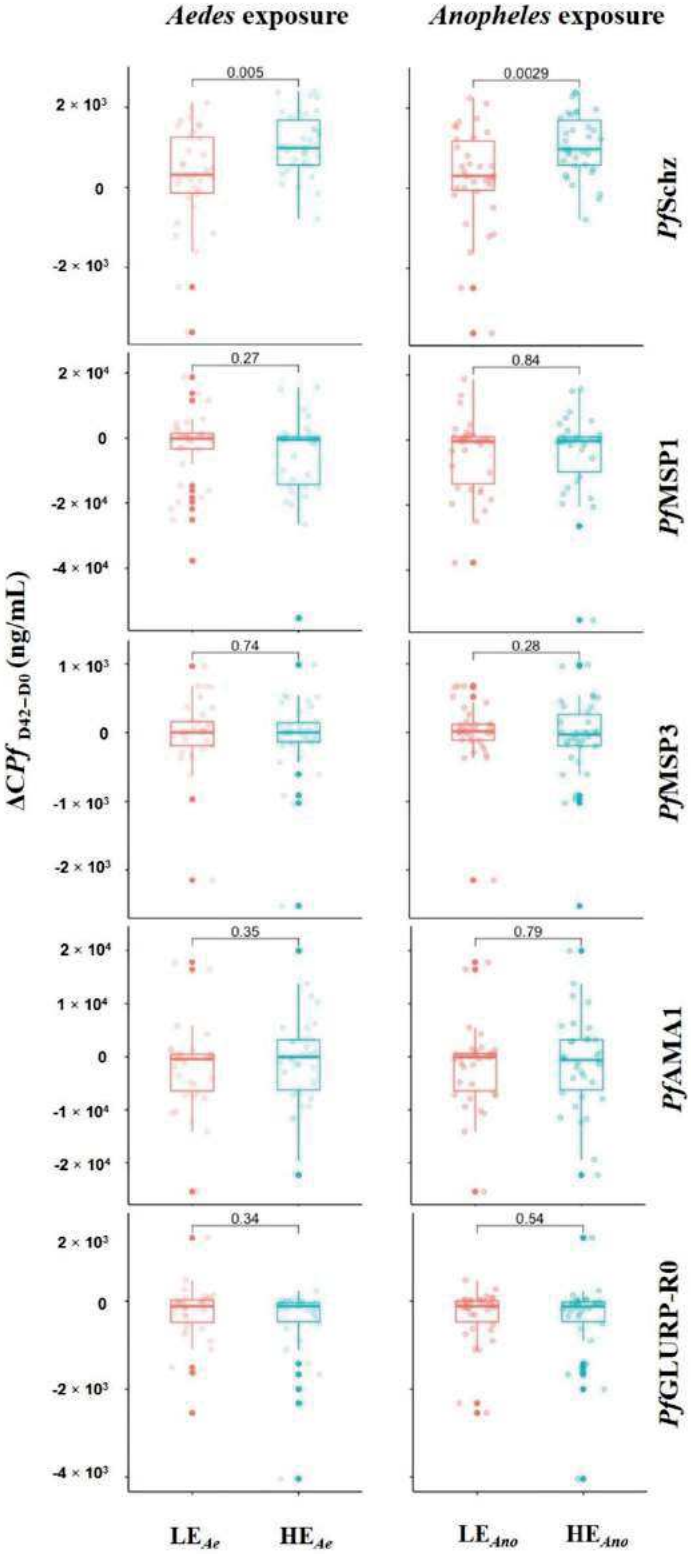

Aedes exposure
Anopheles exposure
0.005
0.0029
0.27
0.84
0.74
0.28
0.35
0.79
0.34
0.54
2 × 10³
0
-2 × 10³
2 × 10⁴
-2 × 10⁴
-4 × 10⁴
1 × 10³
-1 × 10³
1 × 10⁴
-1 × 10⁴
-4 × 10³
ΔCPf D42−D0 (ng/mL)
PfSchz
PfMSP1
PfMSP3
PfAMA1
PfGLURP-R0
LEAe
HEAe
LEAno
HEAno

Figure 1. Variation in concentration of IgG response to *P. falciparum* antigens according to group of exposure to *Anopheles* and to *Aedes* (single-genus exposure). Participants were grouped according to their level of IgG response to *Anopheles* (lower exposure (LEAno) < ΔODgSG6-P1 = 1.41 < higher -exposure (HEAno)) and to *Aedes* (lower exposure (LEAe) < ΔODNterm-34 kDa = 1.10 < higher exposure (HEAe)) salivary peptide. Each dot represents an individual, and box plots indicate the median values, 25th and 75th percentile antibody concentration for each *P. falciparum* blood-stage antigen. Statistically significant difference in median value between the two groups is indicated (Mann–Whitney U test).

Individuals who had a higher exposure to *Anopheles* (HE_{Ano}) or to *Aedes* (HE_{Ae}) bites exhibited a greater increase in anti-*Pf*Schz IgG levels than those with a lower exposure ($p = 0.0029$ for *Anopheles* and $p = 0.005$ for *Aedes*). No significant differences in the variation of IgG responses to merozoite antigens were noted between the two groups exposed to *Anopheles* or *Aedes* bites.

Second, we compared the dynamics of anti-*Plasmodium* immune responses according to the level of combined exposure to both *Anopheles* and *Aedes* bites (E2 = low, E3 = intermediate, E4 = high; Figure 2). We observed a positive association between the increase in the IgG response to *Pf*Schz and the level of mosquito exposure during the follow-up. Indeed, individuals with higher exposure to *Anopheles* and *Aedes* (E4 group) had a significantly greater increase in anti-*Pf*Schz IgG response compared with individuals from the group with intermediate exposure (E3 group, $p = 0.027$) and from the group with lower exposure (E2 group, $p = 0.0024$). No significant differences in the dynamics of anti-merozoite antigen IgG responses were noted between the exposure groups, with all median values close to null for any exposure group (combined exposure).

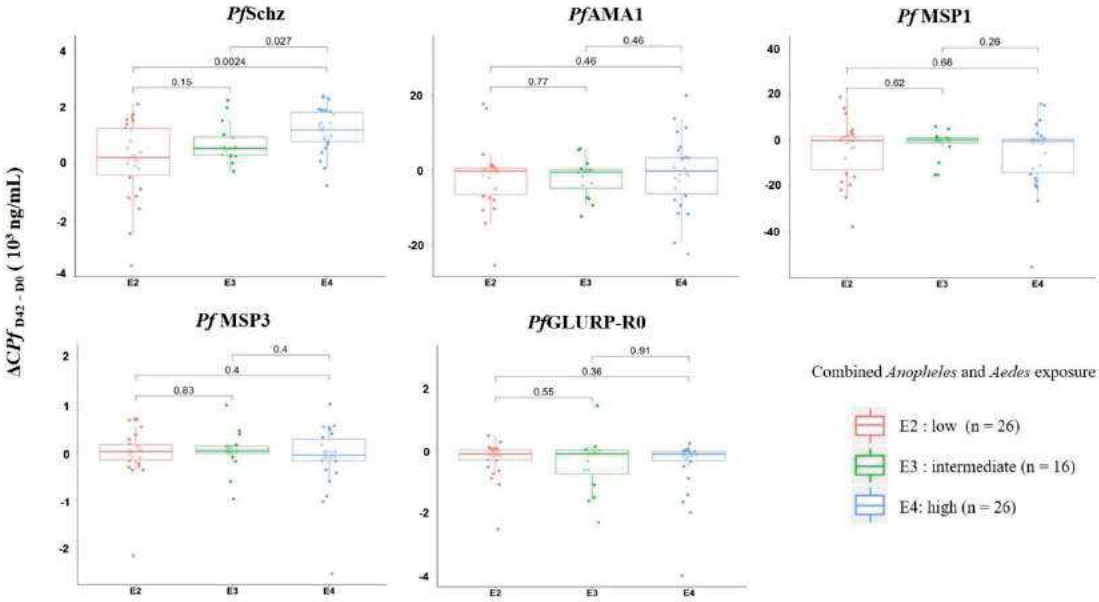


Figure 2. Variation in concentration of IgG response to *P. falciparum* antigens according to group of exposure to *Anopheles* and to *Aedes* (combined exposure). Each dot represents an individual, and box plots indicate the median value, 25th and 75th percentile antibody concentration for each blood-stage antigen. Individuals were divided into three groups (E2, E3, E4) where E2 includes individuals with lower exposure to both *Anopheles* and *Aedes*, E4 includes individuals with higher exposure to both *Anopheles* and *Aedes*, and E3 includes individuals with weak exposure to one mosquito genus and high exposure to the other. Statistically significant difference in median value between two groups is indicated (Mann–Whitney U test).

3.4. Human-, Parasite-, and Environment-Related Factors Associated with the Evolution of Immune Responses to Plasmodium

Univariate analyses were first performed to investigate the relationship between the individual variation in specific anti-*Plasmodium* IgG responses and different demographic, biological, parasitological, and environmental variables (Table 2).

Table 2. Influence of covariates on the dynamics of IgG antibody levels to various *Plasmodium* and mosquito salivary antigens.

Covariate Factors	Antigens	ΔCPf_{D42-D0} (ng/mL)	*p* Value
Gender (female/male) [a]	*Pf*Schz	968.6 (178.2;1544)/561.3 (92.68;1213)	0.250
	*Pf*AMA1	−1151 (−6045;525.5)/413.2 (−9406;3340)	0.322
	*Pf*MSP1	−480.2 (−14,723;1322)/−267 (−3129;442.8)	0.744
	*Pf*MSP3	0 (−165.8;154.5)/0 (−181.5;300.1)	0.970
	*Pf*GLURP-R0	−109.6(−349.6;17.33)/−118.8(−750.8;0)	0.408
Age (years) [b]	*Pf*Schz	0.240	**0.049**
	*Pf*AMA1	−0.013	**0.051**
	*Pf*MSP1	−0.208	0.088
	*Pf*MSP3	0.055	0.653
	*Pf*GLURP-R0	−0.162	0.186
Weight (kg) [b]	*Pf*Schz	0.252	**0.037**
	*Pf*AMA1	0.405	**0.006**
	*Pf*MSP1	−0.128	0.298
	*Pf*MSP3	0.084	0.495
	*Pf*GLURP-R0	−0.173	0.158
Hemoglobin (D42) [b]	*Pf*Schz	−0.123	0.330
	*Pf*AMA1	−0.125	0.317
	*Pf*MSP1	−0.112	0.273
	*Pf*MSP3	−0.141	0.261
	*Pf*GLURP-R0	−0.344	0.061
Treatment (ASAQ/AL) [a]	*Pf*Schz	725.2 (178.2;1544)/704.3 (92.68;1213)	0.840
	*Pf*AMA1	−224.0 (−6045;525.5)/−793.9 (−9406;3340)	0.888
	*Pf*MSP1	−414.6 (−14,723;1322)/−237.0 (−3129;442.8)	0.577
	*Pf*MSP3	−100.2 (−165.8;154.5)/20.53 (−181.5;300.1)	**0.021**
	*Pf*GLURP-R0	−152.7 (−349.6;17.33)/−92.63 (−750.8;0)	0.535
Parasite density on D0 [b]	*Pf*Schz	0.176	0.149
	*Pf*AMA1	0.096	0.433
	*Pf*MSP1	0.050	0.692
	*Pf*MSP3	0.053	0.670
	*Pf*GLURP-R0	0.036	0.768
IgG concentration on D0 (ng/mL) [b]	*Pf*Schz	−0.361	**0.002**
	*Pf*AMA1	−0.360	**0.002**
	*Pf*MSP1	−0.625	**<0.001**
	*Pf*MSP3	−0.540	**<0.001**
	*Pf*GLURP-R0	−0.851	**<0.001**
anti-gSG6-P1 IgG [b] (*Anopheles* exposure)	*Pf*Schz	0.405	**<0.001**
	*Pf*AMA1	−0.069	0.574
	*Pf*MSP1	−0.043	0.727
	*Pf*MSP3	−0.060	0.623
	*Pf*GLURP-R0	−0.129	0.294

	*Pf*Schz	0.389	**0.001**
anti Nterm-34 kDa IgG [b] (*Aedes* exposure)	*Pf*AMA1	0.055	0.652
	*Pf*MSP1	−0.164	0.180
	*Pf*MSP3	−0.140	0.251
	*Pf*GLURP-R0	−0.228	0.060

[a]: Median (25th; 75th percentile) of variation of IgG to *P. falciparum* antigens during the follow-up. [b]: Spearman's rho.

Gender, hemoglobin concentration, and parasite density on D0 were not associated with any variation in IgG response to *Plasmodium* antigens ($p > 0.05$). The type of ACT treatment was also not associated with any variation in immune responses to *Plasmodium* antigens except for *Pf*MSP3 ($p = 0.021$), while age and weight were associated with variations in IgG against *Pf*Schz ($p = 0.049$ and $p = 0.037$, respectively) and *Pf*AMA1 ($p = 0.051$ and $p = 0.006$, respectively). In addition, variations in IgG against all antigens were negatively associated with the initial concentration on D0 ($p < 0.002$). We also assessed the effect of exposure to *Anopheles* or *Aedes* bites (continuous variable) on the variation in the specific anti-*Plasmodium* IgG responses. Only the anti-*Pf*Schz IgG level was positively associated with the level of exposure to *Anopheles* ($R = 0.405$, $p < 0.001$) and *Aedes* ($R = 0.389$, $p = 0.001$) bites. Other specific IgG response variations were not associated with the intensity of exposure to mosquito bites, although there was a borderline correlation between anti-*Pf*GLURP-R0 IgG and *Aedes* exposure ($R = -0.228$, $p = 0.06$).

3.5. Multivariate Analysis: Final Models

To further understand the contribution of each factor (confounding variables) to the evolution of anti-*Pf*Schz and anti-*Pf*GLURP-R0 IgG responses, multivariate analyses were carried out, and the final models are shown in Table 3. Multivariate analyses showed a positive and significant relationship between age and variation in IgG response to *Pf*Schz and *Pf*GLURP-R0, while no relationships were noted for weight. The level of *P. falciparum* parasite density on D0 was only associated with an increase in anti-*Pf*Schz IgG level. The models also showed that the variation in IgG responses to *Pf*Schz and *Pf*GLURP-R0 was strongly and negatively correlated with the pre-existing IgG level at D0 ($p < 0.01$). Individuals with higher specific IgG levels at the time of inclusion had lower levels on D42. Interestingly, a strong association was detected between the level of exposure to *Aedes* bites and the variation in anti-*Pf*Schz ($p < 0.001$) and anti-*Pf*GLURP-R0 ($p < 0.05$) IgG response, while *Anopheles* exposure was not found to be associated with the evolution of IgG response to *P. falciparum* antigens.

Table 3. Results of multivariate analysis indicating factors associated with variation in IgG responses to *P. falciparum* antigens during the follow-up.

Variation in Anti-*Pf*Schz IgG					Variation in Anti-*Pf*GLURP−R0 IgG				
Variables	**β1**	**Sd Error**	***p* Value**	R^2	**Variables**	**β1**	**Sd Error**	***p* Value**	R^2
				0.60					0.81
Age	49.30	16.32	<0.01		Age	29.723	7.566	<0.01	
Weight	-	-	-		Weight	-	-	-	
Parasite density on D0	0.004	0.001	<0.001		Hemoglobin	-	-	-	
Anti-*Pf*SchzIgG on D0 (ng/mL)	−0.753	0.100	<0.001		Anti-*Pf*GLURP-R0 IgG on D0 (ng/mL)	−0.806	0.049	<0.01	
Anti−Nterm-34 kDa IgG	1185	277.3	<0.001		Anti-Nterm-34 kDa IgG	−276.11	132.261	<0.05	
Anti-gSG6-P1 IgG	-	-	-						

4. Discussion

In the present study, we described the variation in anti-*Plasmodium* IgG responses from study inclusion (D0) to the end of follow-up (D42) in relation to factors that might

influence the kinetics of specific Ab responses. To exclude the antigenic boost of a *P. falciparum* infection on the immune responses examined, only individuals who were not re-infected were included in the final analysis. Multivariate analysis showed that age, parasite density (only for schizont extracts), anti-*Plasmodium* IgG response on the day of malaria diagnosis, and exposure to *Aedes* saliva were significantly associated with the variation in anti-*Plasmodium* IgG responses.

At the time of inclusion, a high inter-individual variability in IgG responses was observed for *Pf*AMA1, *Pf*MSP1, and *Pf*Schz antigens, while a lower level and range of IgG responses were seen for the other antigens, highlighting the difference in immunogenicity against *Plasmodium* antigens [35]. During the 6-week follow-up period, the evolution of the prevalence and median values of IgG specific to *P. falciparum* differed depending on the merozoite antigens. We observed a significant increase in IgG responses to the schizont extract and a significant decrease in anti-*Pf*GLURP-R0 IgG responses, while similar levels of IgG responses were noted for the other merozoite antigens. Longitudinal immunological studies have reported that following a clinical malaria infection, the specific IgG responses peak approximately 1–2 weeks after infection and then generally decline rapidly because of the short-lived duration of natural IgG responses to merozoite antigens [10–13,54,55]. It has also been shown that IgG Ab responses have a different half-life depending on the antigens [56], and this could contribute to the differences in the dynamics of immune responses to the various *Plasmodium* antigens observed during the follow-up. Parasite- and host-related or environmental factors may also play a role, in addition to intrinsic antibody half-life, in the modulation of the IgG response to *P. falciparum* over time.

We used an innovative serological assessment method to define a proxy of human exposure to *Anopheles* and *Aedes* bites at the individual level for each participant. This approach takes into account the individual heterogeneity of exposure to mosquitoes. Indeed, environmental factors generating hot spots of exposure (e.g., proximity to breeding sites), the attraction an individual exerts on mosquitoes, and the use of personal protection against mosquito bites (nets, coils, etc.) suggest that exposure to mosquito bites is highly variable from house to house and also between people living in the same house. The relevance of the gSG6-P1 and Nterm–34 kDa biomarker for epidemiological studies has been validated in various settings [37,40,41,57,58]. At the two time points of the follow-up, all of the participants had specific IgG to salivary peptides, indicating that they had all been exposed to *Anopheles* and *Aedes* bites before and during the follow-up, with an inter-individual heterogeneity in intensity of responses. According to their individual anti-gSG6-P1 and anti-Nterm–34 kDa IgG levels, individuals were separated into different groups of exposure according to a single-genus exposure and to combined exposure. Assuming that anti-salivary peptide IgG responses are transient and wane within a few weeks without new exposure [53,59], evaluating the exposure on D42 may reflect exposure since study initiation.

We first compared the dynamics of IgG titers against *P. falciparum* antigens between the different exposure groups both at the single-genus and at the combined-exposure level. We noted a positive association between the evolution of IgG responses to whole schizont extract and the intensity of exposure to *Culicidae* bites. Individuals with a higher exposure to *Anopheles* or *Aedes* (considered at the single-exposure level), as well as taken together (combined exposure), had a significantly increased IgG response to *Pf*Schz during the 6-week follow-up. The evolution of IgG responses to merozoite antigens did not seem to be modulated by the intensity of mosquito exposure.

The contribution of immunomodulatory components of mosquito saliva in the variation of anti-*Pf*Schz and anti-*Pf*GLURP-R0 IgG responses was then assessed using univariate analysis complete with multivariate models taking into account other co-factors. Among the different factors selected, gender, weight, hemoglobin concentration, and ACT treatment were not significantly associated with variations in IgG response to *Pf*Schz and to *Pf*GLURP-R0 during the follow-up.

The evolution of IgG responses to *Pf*Schz and to *Pf*GLURP-R0 had a strong positive association with the age of the individual. Indeed, in general, antibody levels increase with both age and higher transmission intensity [60,61]. History of infection and cumulative malaria exposure may contribute to the inter-individual differences in the dynamics of immune responses [15]. Older individuals may have experienced more malaria infections and thus may have developed more memory B cells that will rapidly proliferate upon reinfection and differentiate into long-lived antibody-secreting cells that may last longer and induce a greater magnitude and longevity of IgG response to antigens [10,13]. Nevertheless, in the present study, most participants were under 10 years old, thus limiting the comparison with older people, and therefore, further investigations are needed. The parasite density at the time of diagnosis was significantly positively associated with the evolution of IgG response to schizont extracts. It can be expected that a higher parasite load will induce a greater immune response to *Plasmodium* parasites [12]. Interestingly, the initial level of IgG response to *Plasmodium* merozoite antigens (*PfSchz*, *Pf*GLURP-R0) at the time of diagnosis was negatively associated with the variation in immune responses during the follow-up. This result indicates that participants with higher levels of Abs at the time of diagnosis might produce lower levels of IgG specific to *Plasmodium*. In malaria infection, natural regulatory T cells and positive/negative regulators have been shown to play a role in balancing immune responses to maintain vertebrate defense and immune balance. *Plasmodium* exploits regulatory mechanisms to prevent the development of adaptive immunity by enhancing negative regulators and/or inhibiting positive regulators including reduced T-cell proliferative responses to *Plasmodium* antigens and production of immunosuppressive IL-10 [62]. Negative regulators such as BTLA have been reported to dampen innate and T-/B-cell-mediated immune response to malaria infection [63,64]. However, antibodies measured at inclusion (D0) might have been acquired during previous infections but also by the current one. Indeed, there is obviously a delay between the infection and onset of symptoms, and then the visit to a health center, during which immune responses to *Plasmodium* are mounted.

The exposure to *Aedes* bites was associated with the evolution of IgG response to *Pf*Schz and *Pf*GLURP-R0, while *Anopheles* exposure was not found to modulate anti-*Plasmodium* immunity in the 6-week follow-up period. It is increasingly recognized that the immune modulatory properties of mosquito saliva act both on the innate and adaptive immune responses of the vertebrate host, but only a few studies have assessed the consequences of *Plasmodium* immune responses in a natural population [14,32,33,65]. These studies investigated the immune relationship within a homologous malaria context (*Anopheles–Plasmodium*), while in the present study, we observed different anti-*Plasmodium* immunity modulation according to the mosquito genus with a significant effect of *Aedes* exposure. Immunomodulatory properties of mosquito saliva on the specific immune responses to heterologous antigens have also been observed in murine studies [21,31]. Previous work indicated that *Culicidae* saliva has different immunomodulatory effects on the vertebrate immune system depending on the mosquito genus. Wanasen et al. suggested that the production of both Th1 and Th2 cytokines was reduced in the presence of salivary gland extract from *Aedes aegypti*, but not from *Culex quinquefasciatus* [22]. Mosquito saliva is known to contain close to 100 secretory proteins, and comparative analyses indicated that some salivary proteins are ubiquitous in various genera and/or species, while others are species or genus specific [66,67]. This suggests that mosquito saliva from various mosquito species should have common effects as well as genus- or species-specific immunomodulatory effects. Here, compared with *Anopheles* saliva, the immunomodulatory activities of *Aedes* saliva on anti-*Plasmodium* immunity seemed to be more pronounced. *Aedes* saliva has been investigated extensively and studies reported a profound effect on lymphocyte and macrophage activity [68,69]. In the present study, we showed that *Aedes* exposure was negatively associated with the anti-*Pf*GLURP-R0 immune response, whereas it was positively associated with the anti-*Pf*Schz IgG response. The epi-

demiological observation for the down-regulated IgG response to *Pf*GLURP-R0 in individuals with higher exposure is consistent with previous studies that reported a down-regulated immune response to a specific antigen in hosts exposed to arthropod saliva compared with naive vertebrate hosts [21,32,33]. Schizonts comprise a set of antigens with varying immunogenicity, while *Pf*GLURP-R0 is a unique antigen at the surface of infected erythrocytes. A schizont may thus activate a higher number of immune cells (memory B cells or long-lived plasma cells), which may obviously result in a stronger IgG response that may last longer.

There are several important limitations of this study. First, the number and average age of the participants were low, limiting the statistical power of our analyses and limiting the comparison with immune response evolution in older individuals. The 42-day follow-up was too short to study the decrease in the IgG response after *Plasmodium* infection. We observed that most individuals exhibited very little variation in their IgG responses to certain merozoite antigens between D0 and D42. The peak of the immune response occurs approximately 2 weeks after infection and then gradually wanes. The 42-day follow-up may be the time when the level of immune response returns to its level at the time of inclusion. A more intensive and long-term sampling would be needed to track the decrease in Abs more accurately over a longer period; furthermore, the study should ideally assess the asymptomatic re-infection by *Plasmodium* during follow-up, which might cause a boost in immune responses.

The present work is the first to report that exposure to *Aedes* saliva may contribute, in addition to other factors, to the regulation of anti-*Plasmodium* immune responses. Additional studies are needed to characterize separately the effects of saliva of different blood-feeding arthropods on the human immune system, by analyzing ex vivo cytokine production after stimulation of peripheral blood mononuclear cells. The immunomodulatory properties of mosquito saliva and their consequences for malaria transmission need further investigation and may contribute to a better understanding of the human–vector–parasite immune relationships.

Author Contributions: Conceptualization, F.R. and A.P.; Formal analysis, K.G.A.; Funding acquisition, A.A.K., C.R. and F.R.; Investigation, K.G.A., S.S.Y. and E.A.G.; Methodology, K.G.A., F.R. and A.P.; Resources, A.M.A., S.B.A. and O.A.T.; Supervision, V.C. and A.P.; Visualization, K.G.A. and A.P.; Writing—original draft, K.G.A. and A.P.; Writing—review and editing, V.C., C.R., F.R. and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French Initiative 5% and Expertise France, Grant N°12 INI210. K.G. Aka was supported by a PhD fellowship provided by the Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection Foundation, Marseille, France.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of Côte d'Ivoire (June 2015; No. 029/MSLS/CNER-dkn).

Informed Consent Statement: Written informed consent of all parents or guardians of children who participated in the study was obtained before inclusion and any sample collection.

Data Availability Statement: The dataset analyzed during the current study is available from the last author on reasonable request.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the populations of Dar-es-Salam neighborhood (Bouaké), especially participants and health workers for their kind support and collaboration. We kindly thank S. Longagre (Vaximax, France) for providing the *Pf*MSP1p19 recombinant protein, E.J. Remarque (Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, The Netherlands) for the *Pf*AMA1 recombinant protein, and Michael Theisen (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) for the *Pf*GLURP-R0 and *Pf*MSP3 recombinant proteins. We would also like to especially thank Isabella Athanassiou (Bonn, Germany) for language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Sabchareon, A.; Burnouf, T.; Ouattara, D.; Attanath, P.; Bouharoun-Tayoun, H.; Chantavanich, P.; Foucault, C.; Chongsuphajaisiddhi, T.; Druilhe, P. Parasitologic and Clinical Human Response to Immunoglobulin Administration in Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *45*, 297–308.
2. Cohen, S.; McGREGOR, I.A.; Carrington, S. Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria. *Nature* **1961**, *192*, 733–737.
3. Stanisic, D.I.; Fowkes, F.J.I.; Koinari, M.; Javati, S.; Lin, E.; Kiniboro, B.; Richards, J.S.; Robinson, L.J.; Schofield, L.; Kazura, J.W.; et al. Acquisition of Antibodies against Plasmodium Falciparum Merozoites and Malaria Immunity in Young Children and the Influence of Age, Force of Infection, and Magnitude of Response. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 646–660, doi:10.1128/IAI.02398-14.
4. Akpogheneta, O.J.; Dunyo, S.; Pinder, M.; Conway, D.J. Boosting Antibody Responses to Plasmodium Falciparum Merozoite Antigens in Children with Highly Seasonal Exposure to Infection. *Parasite Immunol.* **2010**, *32*, 296–304, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01193.x.
5. Wang, Q.; Zhao, Z.; Zhang, X.; Li, X.; Zhu, M.; Li, P.; Yang, Z.; Wang, Y.; Yan, G.; Shang, H.; et al. Naturally Acquired Antibody Responses to Plasmodium Vivax and Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 KDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151900, doi:10.1371/journal.pone.0151900.
6. Murungi, L.M.; Kamuyu, G.; Lowe, B.; Bejon, P.; Theisen, M.; Kinyanjui, S.M.; Marsh, K.; Osier, F.H.A. A Threshold Concentration of Anti-Merozoite Antibodies Is Required for Protection from Clinical Episodes of Malaria. *Vaccine* **2013**, *31*, 3936–3942, doi:10.1016/j.vaccine.2013.06.042.
7. Roussilhon, C.; Oeuvray, C.; Müller-Graf, C.; Tall, A.; Rogier, C.; Trape, J.-F.; Theisen, M.; Balde, A.; Pérignon, J.-L.; Druilhe, P. Long-Term Clinical Protection from Falciparum Malaria Is Strongly Associated with IgG3 Antibodies to Merozoite Surface Protein 3. *PLoS Med.* **2007**, *4*, e320, doi:10.1371/journal.pmed.0040320.
8. Courtin, D.; Oesterholt, M.; Huismans, H.; Kusi, K.; Milet, J.; Badaut, C.; Gaye, O.; Roeffen, W.; Remarque, E.J.; Sauerwein, R.; et al. The Quantity and Quality of African Children's IgG Responses to Merozoite Surface Antigens Reflect Protection against Plasmodium Falciparum Malaria. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7590, doi:10.1371/journal.pone.0007590.
9. Reiling, L.; Boyle, M.J.; White, M.T.; Wilson, D.W.; Feng, G.; Weaver, R.; Opi, D.H.; Persson, K.E.M.; Richards, J.S.; Siba, P.M.; et al. Targets of Complement-Fixing Antibodies in Protective Immunity against Malaria in Children. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 610, doi:10.1038/s41467-019-08528-z.
10. Yman, V.; White, M.T.; Asghar, M.; Sundling, C.; Sondén, K.; Draper, S.J.; Osier, F.H.A.; Färnert, A. Antibody Responses to Merozoite Antigens after Natural Plasmodium Falciparum Infection: Kinetics and Longevity in Absence of Re-Exposure. *BMC Med.* **2019**, *17*, 22, doi:10.1186/s12916-019-1255-3.
11. Kinyanjui, S.M.; Conway, D.J.; Lanar, D.E.; Marsh, K. IgG Antibody Responses to Plasmodium Falciparum Merozoite Antigens in Kenyan Children Have a Short Half-Life. *Malar J.* **2007**, *6*, 82, doi:10.1186/1475-2875-6-82.
12. Proietti, C.; Verra, F.; Bretscher, M.T.; Stone, W.; Kanoi, B.N.; Balikagala, B.; Egwang, T.G.; Corran, P.; Ronca, R.; Arcà, B.; et al. Influence of Infection on Malaria-Specific Antibody Dynamics in a Cohort Exposed to Intense Malaria Transmission in Northern Uganda. *Parasite Immunol.* **2013**, *35*, 164–173, doi:10.1111/pim.12031.
13. Akpogheneta, O.J.; Duah, N.O.; Tetteh, K.K.A.; Dunyo, S.; Lanar, D.E.; Pinder, M.; Conway, D.J. Duration of Naturally Acquired Antibody Responses to Blood-Stage Plasmodium Falciparum Is Age Dependent and Antigen Specific. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 1748–1755, doi:10.1128/IAI.01333-07.
14. Dechavanne, C.; Sadissou, I.; Bouraima, A.; Ahouangninou, C.; Amoussa, R.; Milet, J.; Moutairou, K.; Massougbodji, A.; Theisen, M.; Remarque, E.J.; et al. Acquisition of Natural Humoral Immunity to P. Falciparum in Early Life in Benin: Impact of Clinical, Environmental and Host Factors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33961, doi:10.1038/srep33961.
15. Gonçalves, R.M.; Lima, N.F.; Ferreira, M.U. Parasite Virulence, Co-Infections and Cytokine Balance in Malaria. *Pathog. Glob. Health* **2014**, *108*, 173–178, doi:10.1179/2047773214Y.0000000139.
16. Fillol, F.; Sarr, J.B.; Boulanger, D.; Cisse, B.; Sokhna, C.; Riveau, G.; Simondon, K.B.; Remoué, F. Impact of Child Malnutrition on the Specific Anti-Plasmodium Falciparum Antibody Response. *Malar. J.* **2009**, *8*, 116, doi:10.1186/1475-2875-8-116.
17. Hogh, B.; Petersen, E.; Crandall, I.; Gottschau, A.; Sherman, I.W. Immune Responses to Band 3 Neoantigens on Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes in Subjects Living in an Area of Intense Malaria Transmission Are Associated with Low Parasite Density and High Hematocrit Value. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 4362–4366.
18. Ter Horst, R.; Jaeger, M.; Smeekens, S.P.; Oosting, M.; Swertz, M.A.; Li, Y.; Kumar, V.; Diavatopoulos, D.A.; Jansen, A.F.M.; Lemmers, H.; et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell* **2016**, *167*, 1111-1124.e13, doi:10.1016/j.cell.2016.10.018.
19. Ribeiro, J.M. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **1987**, *32*, 463–478, doi:10.1146/annurev.en.32.010187.002335.
20. Fontaine, A.; Diouf, I.; Bakkali, N.; Missé, D.; Pagès, F.; Fusai, T.; Rogier, C.; Almeras, L. Implication of Haematophagous Arthropod Salivary Proteins in Host-Vector Interactions. *Parasit Vectors* **2011**, *4*, 187, doi:10.1186/1756-3305-4-187.
21. Depinay, N.; Hacini, F.; Beghdadi, W.; Peronet, R.; Mécheri, S. Mast Cell-Dependent down-Regulation of Antigen-Specific Immune Responses by Mosquito Bites. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 4141–4146.
22. Wanasen, N.; Nussenzveig, R.H.; Champagne, D.E.; Soong, L.; Higgs, S. Differential Modulation of Murine Host Immune Response by Salivary Gland Extracts from the Mosquitoes Aedes Aegypti and Culex Quinquefasciatus. *Med. Vet. Entomol.* **2004**, *18*, 191–199, doi:10.1111/j.1365-2915.2004.00498.x.

23. Schneider, B.S.; Soong, L.; Zeidner, N.S.; Higgs, S. Aedes aegypti salivary gland extract modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral. Immunol.* **2004**, *17*, 565–573.
24. Schneider, B.S.; Higgs, S. The Enhancement of Arbovirus Transmission and Disease by Mosquito Saliva Is Associated with Modulation of the Host Immune Response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 400–408, doi:10.1016/j.trstmh.2008.01.024.
25. Zeidner, N.S.; Higgs, S.; Happ, C.M.; Beaty, B.J.; Miller, B.R. Mosquito Feeding Modulates Th1 and Th2 Cytokines in Flavivirus Susceptible Mice: An Effect Mimicked by Injection of Sialokinins, but Not Demonstrated in Flavivirus Resistant Mice. *Parasite Immunol.* **1999**, *21*, 35–44, doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00199.x.
26. Vogt, M.B.; Lahon, A.; Arya, R.P.; Kneubehl, A.R.; Spencer Clinton, J.L.; Paust, S.; Rico-Hesse, R. Mosquito Saliva Alone Has Profound Effects on the Human Immune System. *PLoS Negl. Trop Dis.* **2018**, *12*, e0006439, doi:10.1371/journal.pntd.0006439.
27. Demeure, C.E.; Brahimi, K.; Hacini, F.; Marchand, F.; Péronet, R.; Huerre, M.; St-Mezard, P.; Nicolas, J.-F.; Brey, P.; Delespesse, G.; et al. Anopheles Mosquito Bites Activate Cutaneous Mast Cells Leading to a Local Inflammatory Response and Lymph Node Hyperplasia. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3932–3940, doi:10.4049/jimmunol.174.7.3932.
28. Donovan, M.J.; Messmore, A.S.; Scrafford, D.A.; Sacks, D.L.; Kamhawi, S.; McDowell, M.A. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection with Malaria Parasites. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 2523–2530, doi:10.1128/IAI.01928-06.
29. Pollock, T.; Leitao, R.; Galan-Rodriguez, C.; Wong, K.A.; Rodriguez, A. Daily Plasmodium Yoelii Infective Mosquito Bites Do Not Generate Protection or Suppress Previous Immunity against the Liver Stage. *Malar J.* **2011**, *10*, 97, doi:10.1186/1475-2875-10-97.
30. Kebaier, C.; Voza, T.; Vanderberg, J. Neither Mosquito Saliva nor Immunity to Saliva Has a Detectable Effect on the Infectivity of Plasmodium Sporozoites Injected into Mice. *Infect. Immun* **2010**, *78*, 545–551, doi:10.1128/IAI.00807-09.
31. Menten-Dedoyart, C.; Couvreur, B.; Thellin, O.; Drion, P.V.; Herry, M.; Jolois, O.; Heinen, E. Influence of the Ixodes Ricinus Tick Blood-Feeding on the Antigen-Specific Antibody Response in Vivo. *Vaccine* **2008**, *26*, 6956–6964, doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.072.
32. Sarr, J.B.; Samb, B.; Sagna, A.B.; Fortin, S.; Doucoure, S.; Sow, C.; Senghor, S.; Gaayeb, L.; Guindo, S.; Schacht, A.-M.; et al. Differential Acquisition of Human Antibody Responses to Plasmodium Falciparum According to Intensity of Exposure to Anopheles Bites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *106*, 460–467, doi:10.1016/j.trstmh.2012.05.006.
33. Aka, K.G.; Traoré, D.F.; Sagna, A.B.; Zoh, D.D.; Assi, S.B.; Tchiekoi, B.N.; Adja, A.M.; Remoue, F.; Poinsignon, A. Pattern of Antibody Responses to Plasmodium Falciparum Antigens in Individuals Differentially Exposed to Anopheles Bites. *Malar J.* **2020**, *19*, 83, doi:10.1186/s12936-020-03160-5.
34. Ambrosino, E.; Dumoulin, C.; Orlandi-Pradines, E.; Remoue, F.; Toure-Baldé, A.; Tall, A.; Sarr, J.B.; Poinsignon, A.; Sokhna, C.; Puget, K.; et al. A Multiplex Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against 15 Plasmodium Falciparum and Anopheles Gambiae Saliva Antigens. *Malar. J.* **2010**, *9*, 317, doi:10.1186/1475-2875-9-317.
35. Drakeley, C.J.; Corran, P.H.; Coleman, P.G.; Tongren, J.E.; McDonald, S.L.R.; Carneiro, I.; Malima, R.; Lusingu, J.; Manjurano, A.; Nkya, W.M.M.; et al. Estimating Medium- and Long-Term Trends in Malaria Transmission by Using Serological Markers of Malaria Exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5108–5113, doi:10.1073/pnas.0408725102.
36. Crompton, P.D.; Pierce, S.K.; Miller, L.H. Advances and Challenges in Malaria Vaccine Development. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 4168–4178, doi:10.1172/JCI44423.
37. Sagna, A.B.; Yobo, M.C.; Elanga Ndille, E.; Remoue, F. New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Aedes Vector Bites: From Concept to Applications. *Trop Med. Infect. Dis.* **2018**, *3*, doi:10.3390/tropicalmed3030080.
38. Sagna, A.; Poinsignon, A.; Remoue, F. Epidemiological applications of assessing mosquito exposure in a malaria-endemic area. In *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 2, pp. 209–229. ISBN 978-0-12-805360-7.
39. Traoré, D.F.; Sagna, A.B.; Adja, A.M.; Zoh, D.D.; Adou, K.A.; Lingué, K.N.; Coulibaly, I.; Tchiekoi, N.B.; Assi, S.B.; Poinsignon, A.; et al. Exploring the Heterogeneity of Human Exposure to Malaria Vectors in an Urban Setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, Using an Immuno-Epidemiological Biomarker. *Malar. J.* **2019**, *18*, 68, doi:10.1186/s12936-019-2696-z.
40. Sagna, A.B.; Kassié, D.; Couvray, A.; Adja, A.M.; Hermann, E.; Riveau, G.; Salem, G.; Fournet, F.; Remoue, F. Spatial Assessment of Contact between Humans and Anopheles and Aedes Mosquitoes in a Medium-Sized African Urban Setting, Using Salivary Antibody–Based Biomarkers. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1199–1208, doi:10.1093/infdis/jiz289.
41. Traoré, D.F.; Sagna, A.B.; Adja, A.M.; Zoh, D.D.; Lingué, K.N.; Coulibaly, I.; N'Cho Tchiekoi, B.; Assi, S.B.; Poinsignon, A.; Dagnogo, M.; et al. Evaluation of Malaria Urban Risk Using an Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Anopheles Bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 1353–1359, doi:10.4269/ajtmh.17-0231.
42. Toure, O.A.; Assi, S.B.; N'Guessan, T.L.; Adji, G.E.; Ako, A.B.; Brou, M.J.; Ehouman, M.F.; Gnamien, L.A.; Coulibaly, M.A.A.; Coulibaly, B.; et al. Open-Label, Randomized, Non-Inferiority Clinical Trial of Artesunate-Amodiaquine versus Artemether-Lumefantrine Fixed-Dose Combinations in Children and Adults with Uncomplicated Falciparum Malaria in Côte d'Ivoire. *Malar. J.* **2014**, *13*, 439, doi:10.1186/1475-2875-13-439.
43. Zoh, D.D.; Yapi, A.; Adja, M.A.; Guindo-Coulibaly, N.; Kpan, D.M.S.; Sagna, A.B.; Adou, A.K.; Cornelie, S.; Brengues, C.; Poinsignon, A.; et al. Role of Anopheles Gambiae s.s. and Anopheles Coluzzii (Diptera: Culicidae) in Human Malaria Transmission in Rural Areas of Bouaké, in Côte d'Ivoire. *J. Med. Entomol.* **2020**, *57*, 1254–1261, doi:10.1093/jme/tjaa001.
44. Koffi, A.A.; Ahoua Alou, L.P.; Adja, M.A.; Chandre, F.; Pennetier, C. Insecticide Resistance Status of Anopheles Gambiae s.s Population from M'Bé: A WHOPES-Labelled Experimental Hut Station, 10 Years after the Political Crisis in Côte d'Ivoire. *Malar J.* **2013**, *12*, 151, doi:10.1186/1475-2875-12-151.

45. Toure, O.A.; Landry, T.N.; Assi, S.B.; Kone, A.A.; Gbessi, E.A.; Ako, B.A.; Coulibaly, B.; Kone, B.; Ouattara, O.; Beourou, S.; et al. Malaria Parasite Clearance from Patients Following Artemisinin-Based Combination Therapy in Côte d'Ivoire. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 2031–2038, doi:10.2147/IDR.S167518.
46. Bonnet, S.; Pêtres, S.; Holm, I.; Fontaine, T.; Rosario, S.; Roth, C.; Longacre, S. Soluble and Glyco-Lipid Modified Baculovirus Plasmodium Falciparum C-Terminal Merozoite Surface Protein 1, Two Forms of a Leading Malaria Vaccine Candidate. *Vaccine* **2006**, *24*, 5997–6008, doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.069.
47. Faber, B.W.; Remarque, E.J.; Kocken, C.H.M.; Cheront, P.; Cingolani, D.; Xhonneux, F.; Jurado, M.; Haumont, M.; Jepsen, S.; Leroy, O.; et al. Production, Quality Control, Stability and Pharmacotoxicity of CGMP-Produced Plasmodium Falciparum AMA1 FVO Strain Ectodomain Expressed in Pichia Pastoris. *Vaccine* **2008**, *26*, 6143–6150, doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.055.
48. Theisen, M.; Vuust, J.; Gottschau, A.; Jepsen, S.; Høgh, B. Antigenicity and Immunogenicity of Recombinant Glutamate-Rich Protein of Plasmodium Falciparum Expressed in Escherichia Coli. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* **1995**, *2*, 30–34, doi:10.1128/cdli.2.1.30-34.1995.
49. Amoah, L.E.; Acquah, F.K.; Ayanful-Torgby, R.; Oppong, A.; Abankwa, J.; Obboh, E.K.; Singh, S.K.; Theisen, M. Dynamics of Anti-MSP3 and Pfs230 Antibody Responses and Multiplicity of Infection in Asymptomatic Children from Southern Ghana. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 13, doi:10.1186/s13071-017-2607-5.
50. Niass, O.; Saint-Pierre, P.; Niang, M.; Diop, F.; Diouf, B.; Faye, M.M.; Sarr, F.D.; Faye, J.; Diagne, N.; Sokhna, C.; et al. Modelling Dynamic Change of Malaria Transmission in Holoendemic Setting (Dielmo, Senegal) Using Longitudinal Measures of Antibody Prevalence to Plasmodium Falciparum Crude Schizonts Extract. *Malar J.* **2017**, *16*, 409, doi:10.1186/s12936-017-2052-0.
51. Elanga Ndille, E.; Doucoure, S.; Damien, G.; Mouchet, F.; Drame, P.M.; Cornelie, S.; Noukpo, H.; Yamadjako, S.; Djenontin, A.; Moiroux, N.; et al. First Attempt to Validate Human IgG Antibody Response to Nterm-34kDa Salivary Peptide as Biomarker for Evaluating Exposure to Aedes Aegypti Bites. *PLoS Negl. Trop Dis.* **2012**, *6*, e1905, doi:10.1371/journal.pntd.0001905.
52. Poinsignon, A.; Cornelie, S.; Mestres-Simon, M.; Lanfrancotti, A.; Rossignol, M.; Boulanger, D.; Cisse, B.; Sokhna, C.; Arcà, B.; Simondon, F.; et al. Novel Peptide Marker Corresponding to Salivary Protein GSG6 Potentially Identifies Exposure to Anopheles Bites. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2472, doi:10.1371/journal.pone.0002472.
53. Drame, P.M.; Poinsignon, A.; Besnard, P.; Cornelie, S.; Le Mire, J.; Toto, J.-C.; Foumane, V.; Dos-Santos, M.A.; Sembène, M.; Fortes, F.; et al. Human Antibody Responses to the Anopheles Salivary GSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15596, doi:10.1371/journal.pone.0015596.
54. Boutlis, C.S.; Fagan, P.K.; Gowda, D.C.; Lagog, M.; Mgone, C.S.; Bockarie, M.J.; Anstey, N.M. Immunoglobulin G (IgG) Responses to Plasmodium Falciparum Glycosylphosphatidylinositols Are Short-Lived and Predominantly of the IgG3 Subclass. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 862–865, doi:10.1086/367897.
55. Cavanagh, D.R.; Elhassan, I.M.; Roper, C.; Robinson, V.J.; Giha, H.; Holder, A.A.; Hviid, L.; Theander, T.G.; Arnot, D.E.; McBride, J.S. A Longitudinal Study of Type-Specific Antibody Responses to Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein-1 in an Area of Unstable Malaria in Sudan. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 347–359.
56. Fowkes, F.JI.; McGready, R.; Cross, N.J.; Hommel, M.; Simpson, J.A.; Elliott, S.R.; Richards, J.S.; Lackovic, K.; Viladpai-Nguen, J.; Narum, D.; et al. New Insights into Acquisition, Boosting, and Longevity of Immunity to Malaria in Pregnant Women. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 1612–1621, doi:10.1093/infdis/jis566.
57. Ya-Umphan, P.; Cerqueira, D.; Parker, D.M.; Cottrell, G.; Poinsignon, A.; Remoue, F.; Brengues, C.; Chareonviriyaphap, T.; Nosten, F.; Corbel, V. Use of an Anopheles Salivary Biomarker to Assess Malaria Transmission Risk along the Thailand-Myanmar Border. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 396–404, doi:10.1093/infdis/jiw543.
58. Drame, P.M.; Diallo, A.; Poinsignon, A.; Boussari, O.; Dos Santos, S.; Machault, V.; Lalou, R.; Cornelie, S.; LeHesran, J.-Y.; Remoue, F. Evaluation of the Effectiveness of Malaria Vector Control Measures in Urban Settings of Dakar by a Specific Anopheles Salivary Biomarker. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66354, doi:10.1371/journal.pone.0066354.
59. Doucoure, S.; Mouchet, F.; Cornelie, S.; Drame, P.M.; D'Ortenzio, E.; DeHecq, J.S.; Remoue, F. Human Antibody Response to Aedes Albopictus Salivary Proteins: A Potential Biomarker to Evaluate the Efficacy of Vector Control in an Area of Chikungunya and Dengue Virus Transmission. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 746509, doi:10.1155/2014/746509.
60. King, C.L.; Davies, D.H.; Felgner, P.; Baum, E.; Jain, A.; Randall, A.; Tetteh, K.; Drakeley, C.J.; Greenhouse, B. Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *Am. J. Trop Med. Hyg.* **2015**, *93*, 16–27, doi:10.4269/ajtmh.15-0037.
61. McCallum, F.J.; Persson, K.E.M.; Fowkes, F.J.I.; Reiling, L.; Mugyenyi, C.K.; Richards, J.S.; Simpson, J.A.; Williams, T.N.; Gilson, P.R.; Hodder, A.N.; et al. Differing Rates of Antibody Acquisition to Merozoite Antigens in Malaria: Implications for Immunity and Surveillance. *J. Leukoc Biol.* **2017**, *101*, 913–925, doi:10.1189/jlb.5MA0716-294R.
62. Cai, C.; Hu, Z.; Yu, X. Accelerator or Brake: Immune Regulators in Malaria. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 610121, doi:10.3389/fcimb.2020.610121.
63. Adler, G.; Steeg, C.; Pfeffer, K.; Murphy, T.L.; Murphy, K.M.; Langhorne, J.; Jacobs, T. B and T Lymphocyte Attenuator Restricts the Protective Immune Response against Experimental Malaria. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 5310–5319, doi:10.4049/jimmunol.1101456.
64. Sun, Y.; Brown, N.K.; Ruddy, M.J.; Miller, M.L.; Lee, Y.; Wang, Y.; Murphy, K.M.; Pfeffer, K.; Chen, L.; Kaye, J.; et al. B and T Lymphocyte Attenuator Tempers Early Infection Immunity. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 1946–1951, doi:10.4049/jimmunol.0801866.
65. Sarr, J.B.; Remoue, F.; Samb, B.; Dia, I.; Guindo, S.; Sow, C.; Maiga, S.; Tine, S.; Thiam, C.; Schacht, A.-M.; et al. Evaluation of Antibody Response to Plasmodium Falciparum in Children According to Exposure of Anopheles Gambiae s.l or Anopheles Funestus Vectors. *Malar J.* **2007**, *6*, 117, doi:10.1186/1475-2875-6-117.

66. Calvo, E.; Sanchez-Vargas, I.; Favreau, A.J.; Barbian, K.D.; Pham, V.M.; Olson, K.E.; Ribeiro, J.M. An Insight into the Sialotranscriptome of the West Nile Mosquito Vector, Culex Tarsalis. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 51, doi:10.1186/1471-2164-11-51.
67. Ribeiro, J.M.C.; Charlab, R.; Pham, V.M.; Garfield, M.; Valenzuela, J.G. An Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of the Adult Female Mosquito Culex Pipiens Quinquefasciatus. *Insect Biochem Mol. Biol.* **2004**, *34*, 543–563, doi:10.1016/j.ibmb.2004.02.008.
68. Barros, M.S.; Lara, P.G.; Fonseca, M.T.; Moretti, E.H.; Filgueiras, L.R.; Martins, J.O.; Capurro, M.L.; Steiner, A.A.; Sá-Nunes, A. Aedes Aegypti Saliva Impairs M1-Associated Proinflammatory Phenotype without Promoting or Affecting M2 Polarization of Murine Macrophages. *Parasit Vectors* **2019**, *12*, 239, doi:10.1186/s13071-019-3487-7.
69. Bizzarro, B.; Barros, M.S.; Maciel, C.; Gueroni, D.I.; Lino, C.N.; Campopiano, J.; Kotsyfakis, M.; Amarante-Mendes, G.P.; Calvo, E.; Capurro, M.L.; et al. Effects of Aedes Aegypti Salivary Components on Dendritic Cell and Lymphocyte Biology. *Parasit Vectors* **2013**, *6*, 329, doi:10.1186/1756-3305-6-329.

.

QUATRIEME PARTIE : Discussion générale, conclusion et perspectives

Le rôle des arthropodes vecteurs dans la transmission d'agents pathogènes responsables de maladies vectorielles est primordial en assurant une transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré vers un autre vertébré. Le paludisme fait partie des maladies tropicales les plus importantes et constitue encore une menace majeure en santé publique et au développement économique des populations en dépit des efforts fournis pour son élimination.

La lutte contre la transmission de cette pathologie est complexe car elle est confrontée à la fois aux vecteurs et aux agents pathogènes. Les stratégies se multiplient donc pour limiter la morbidité et la mortalité palustre associant à la fois des mesures de lutte contre les vecteurs, et contre le parasite. Cependant l'émergence des cas de résistance du parasite aux molécules antipaludiques et des vecteurs aux insecticides dans de nombreuses régions endémiques, réduisent l'efficacité de ces stratégies. A cela s'ajoute la capacité du parasite à échapper au système immunitaire de l'hôte et à être séquestré dans les tissus. Ainsi malgré l'émergence de nouvelles stratégies de lutte et le grand nombre de candidats vaccins, l'élimination du paludisme reste un défi. Une meilleure compréhension des interactions entre les trois protagonistes Homme/parasite/vecteur, et notamment les relations immunologiques qui existe entre eux, est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes de transmission et pourrait aboutir au développement de nouvelles stratégies de lutte.

Les relations immunologiques développées entre l'Homme et les *Plasmodium* ont fait l'objet de nombreux travaux depuis des décennies et ont permis de mettre en évidence l'importance de l'immunité anti-*Plasmodium* dans le contrôle naturel de la maladie par les populations résidant en zone d'endémie palustre. Quant aux relations immunologiques Homme-vecteur, elles reposent sur les propriétés immunologiques des protéines salivaires de l'insecte et semblent être une composante importante dans la transmission des pathogènes et dans le développement des pathologies associées. Il existe maintenant des preuves convaincantes que les vecteurs ne sont pas seulement des seringues injectant des pathogènes, mais que la salive co-injectée module la réponse immunitaire innée et adaptative de l'homme au site de la piqûre (peau) et au niveau systémique (Vogt et al., 2018). Des études chez des modèles murins ont montré que la modulation du système immunitaire de l'hôte vertébré par la salive des insectes hématophages intervient ainsi dans la transmission des pathogènes (Norsworthy et al., 2004; Titus et al.,

2006a; Abdeladhim et al., 2014) et dans la progression vers les formes plus graves de paludisme (Schneider et al., 2011).

Les populations humaines résidant en zone endémique pour le paludisme sont fréquemment exposées aux piqûres de moustiques vecteurs (majoritairement non infectantes) et ainsi à leurs sécrétions salivaires. Ainsi cette exposition régulière et durable aux composés immunomodulateurs pourrait avoir des conséquences sur la transmission et le contrôle naturel du paludisme par les populations. A l'heure actuelle très peu d'études se sont intéressées aux effets immunomodulateurs de la salive des vecteurs sur les réponses anticorps anti-*Plasmodium* chez l'Homme. Nos travaux de thèse s'inscrivent donc dans ce contexte et nous proposons par une approche immuno-épidémiologique, d'évaluer l'effet de l'exposition aux principaux moustiques hématophages sur les profils immunitaires spécifiques à certains antigènes (candidats vaccins) de *P. falciparum* impliqués dans la prémunition.

1. Réponses Ac IgG anti- anti-peptide salivaire comme biomarqueurs d'exposition individuelle aux piqûres de moustiques et pertinence de leur utilisation

L'élaboration de méthodes permettant d'identifier avec précision les zones de transmission des maladies transmises par les moustiques semble être cruciale, surtout dans le cas du paludisme à l'ère où l'on envisage son élimination. Les indicateurs actuellement utilisés pour évaluer l'intensité de la transmission comme le taux de piqûres reçues par un Homme (HBR), le taux d'inoculation entomologique (EIR) ou la parasitémie (pour le paludisme) et les indices entomologiques pour les vecteurs d'arboviroses comme les moustiques du genre *Aedes* (indices maison, de Breteau et pondoirs pièges), présentent des limites majeures notamment liées à la sensibilité, la fiabilité, au coût et au faite qu'ils soient laborieux à évaluer. Cela est d'autant plus vrai en absence d'infections patentes et dans des contextes de faible transmission. Des méthodes alternatives et complémentaires pour estimer l'exposition directe de l'Homme aux vecteurs seraient donc très utiles. Depuis les années 1990, des premiers travaux ont montré que chez l'Homme, le niveau de la réponse Ac (principalement IgG) spécifique à la salive d'un certain nombre de vecteurs représenterait un proxy de l'exposition de l'Homme à la piqûre des arthropodes vecteurs de pathogènes, tels que les *Ixodes*, *Glossines*, *Anopheles*, *Aedes* et *Lutzomia*.

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons mené des investigations visant à quantifier la réponse IgG dirigée contre les peptides salivaires d'*Anopheles* (gSG6-P1) et d'*Aedes* (Nterm-34 kDa) en vue d'évaluer le niveau d'exposition à ces 2 genres de moustiques. Le peptide salivaire gSG6-P1 est connu pour être hautement antigénique et hautement spécifique au genre *Anopheles* (Arcà et al., 2005), sans réactivité croisée pertinente avec les épitopes d'autres protéines ou vecteurs de parasites (Poinsignon et al., 2008a). La réponse IgG anti-gSG6-P1 décline beaucoup plus rapidement (quelques semaines) que les réponses spécifiques aux antigènes *de P. falciparum* et à ce jour n'est pas connue pour conférer une protection contre le paludisme, évitant ainsi les facteurs de confusion associés à l'immunité et à l'incidence du paludisme. Quant au peptide Nterm-34kDa, il est tout aussi antigénique et spécifique du genre *Aedes*, mais des suspicions de réaction croisés avec les protéines salivaires des espèces *Ae. aegypti*, *Ae. vittatus* ou *Ae. albopictus* subsistent (Elanga Ndille et al., 2012).
Les études présentées ici se sont déroulées lors de saison des pluies (période de forte transmission). Ce choix a été motivé par le fait qu'il est rapporté en général que les densités des populations de *Culicidae* (notamment *Anopheles* et *Aedes*) et leurs agressivités sont associées aux pluies (Kpan et al., 2021; Adja et al., 2021; Assouho et al., 2020).
Ceci suppose que l'exposition de l'homme aux piqûres des moustiques peut être différente d'une saison à une autre et donc peut influencer le niveau de réponse IgG anti- peptides salivaires des deux genres de moustiques. Cette hypothèse semblait être vérifiée d'autant que les études dans lesquelles sont incluent nos travaux de thèse notamment celle de la JEAI-EVAPALCI ont révélé que les taux d'agressivité des anophèles entres les saisons étaient positivement associés au niveau de réponse spécifique au peptide salivaire (gSG6-P1). Les réponses spécifiques au peptide salivaire était significativement plus élevé en saison des pluies (période de fortes densités de moustiques) qu'en saison sèche (période de faible densité de moustiques) (Traoré et al., 2018).

De plus nos études (article N°1 et 2), ont révélé une forte intensité et une grande séroprévalence des réponses Ac spécifiques aux deux peptides dans les populations étudiées au cours des saisons des pluies. Pour l'étude *Sens in vivo* ces réponses IgG anti- gSG6-P1 et anti- Nterm-34 kDa de l'inclusion (J0) à la fin du suivi (J42), suggéraient que les individus étaient exposés de la même manière aux piqûres des moustiques durant tout le long de l'étude.
Ces résultats sont en accords avec les études qui ont rapporté une association entre la densité des populations de vecteurs et la réponse Ac spécifique à des protéines recombinantes ou des

peptides synthétiques issue des protéines salivaires en Afrique (Drame et al., 2015, 2012, 2010; Elanga Ndille et al., 2012; Poinsignon et al., 2008b, 2008a; Sagna et al., 2019, 2018; Rizzo et al., 2014a), en Amérique (Londono-Renteria et al., 2015) et en Asie (Ya-Umphan et al., 2017).

Toutefois, dans le cadre des travaux de l'article N°1, l'évaluation de l'exposition au niveau communautaire (site) avec des indicateurs entomologiques (captures sur Homme) et au niveau individuel en utilisant le biomarqueur immunologique contre gSG6-P1 évaluant l'exposition aux piqûres des *Anopheles* suggère une discordance dans le niveau d'exposition. En effet, sur la base de la comparaison du nombre de piqûres/Homme/nuit (HBR), les enfants de Petessou ont été significativement plus exposés aux piqûres d'anophèles que les enfants de Dar-es-Salam, alors que la comparaison du niveau médian de la réponse IgG anti-gSG6-P1 suggère plutôt que l'exposition aux piqûres d'anophèles était similaire entre les deux sites. Les données parasitologiques ont indiqué que la prévalence et la densité parasitaire étaient similaires entre les deux sites, suggérant ainsi que les enfants étaient exposés de la même manière au risque de transmission du paludisme. Ces résultats convergents entre les données parasitologiques et immunologiques mettent en évidence les limites des méthodes entomologiques.

La méthode de capture sur Homme renseigne sur le nombre moyen de piqûres qu'un individu peut recevoir par nuit, donnée obtenue par extrapolation des résultats de captures réalisées dans un nombre limité de points de capture (ici 3 par site). Ainsi, elle apprécie approximativement le niveau d'exposition pour chaque espèce de *Culicidae* à l'échelle du site mais ne prend pas en compte l'hétérogénéité interindividuelle de l'exposition en milieu naturel.

En effet, la proximité des gîtes larvaires, l'attraction qu'un individu exerce sur les moustiques, l'utilisation de protections individuelles contre les piqûres de moustiques (MIIs ou MILDA, serpentins...) ainsi que les caractéristiques des habitations (nature du toit et matériaux de construction…), suggèrent que l'exposition aux piqûres d'anophèles peut être très variable d'une maison à l'autre et également entre les personnes vivant dans la même maison. A Dar-es-Salam, le faible nombre de femelles d'anophèles capturées lors des enquêtes entomologiques peut s'expliquer par la faible disponibilité de sites de reproduction pour les anophèles en milieu urbain. Les anophèles aiment les petites flaques d'eaux stagnantes, ouvertes, ensoleillées et fraîches, ce qui suggère qu'il existe des poches isolées de sites de reproduction d'anophèles dans le contexte urbain, pouvant conduire à des « hot-spot » locaux d'exposition aux anophèles qui pourraient ne pas être identifiés par les captures entomologiques. De plus, les captures sur

homme sont effectuées par des hommes adultes et donc pourrait présenter des limites quant à l'évaluation de l'exposition entomologique chez les enfants (Smith et al., 2004).

L'ensemble des différents travaux réalisés au cours de la présente thèse a aussi révélé que les réponses Ac IgG spécifiques aux deux peptides salivaires présentaient une importante variabilité interindividuelle. Ces observations indiquent que les individus auraient été exposés différemment aux piqûres des moustiques et cela au sein de même site. Ainsi, bien que certains facteurs propres à chaque individu (âge, sexe, facteurs génétiques, exposition passée, état nutritionnel, infection par des pathogènes etc…) peuvent avoir une probable influence sur les réponses IgG anti-peptides salivaires, il ressort clairement de précédentes études que l'évaluation de ces réponses pourrait permettre de discriminer l'exposition aux piqûres de moustiques entre des individus d'une population données vivant dans un même site ou dans des sites différents (Elanga Ndille et al., 2012; Traoré et al., 2018, 2019).

Pris ensemble, nos résultats montrent que les réponses IgG anti-peptide gSG6-P1 et Nterm-34 kDa fourniraient pour chaque participant un proxy du niveau individuel d'exposition aux piqûres des moustiques (*Anopheles et Aedes*) et sont donc plus appropriées pour refléter l'hétérogénéité interindividuelle, et spatiale de l'exposition en milieu naturel, ce qui permettrait de discriminer/déterminer les individus et groupes d'individus les plus exposés aux piqûres de moustiques.

2. Influence de l'exposition aux piqûres de moustiques sur la réponse Ac anti-*Plasmodium* naturellement acquise

L'immunité des infections transmises par des insectes vecteurs peut être influencée et régulée par différents facteurs épidémiologiques relatifs à l'homme, à l'agent pathogène et à l'environnement. L'effet de l'âge, de facteurs génétiques, les co-infections et l'état nutritionnel ont été étudiés de manière approfondie et il est reconnu qu'ils influent sur les réponses Ac anti-*Plasmodium* (Fillol et al., 2009; Gonçalves et al., 2014; Dechavanne et al., 2016). De nombreux facteurs environnementaux (facteurs chimiques, biologiques et physiques) peuvent également influencer l'activité immunitaire (MacGillivray & Kollmann, 2014) et les réponses vaccinales (Zimmermann & Curtis, 2019). Des facteurs parasitaires tels que la virulence et la charge parasitaire interviennent également dans le développement de l'immunité anti-*Plasmodium*.

A cet effet plusieurs études dans le modèle animal ont été entreprises pour mettre en exergue l'influence de certains de ces facteurs dans le cas du paludisme. Mais ces approches expérimentales ne sont pas représentatives de la dynamique naturelle des interactions immunologiques entre les trois protagonistes qui composent le triptyque Homme/parasite/vecteur dans le cas du paludisme en zone d'endémie. Pour combler les insuffisances observées lors des études en laboratoire, les études immuno-épidémiologiques semblent être une alternative qui permettrait de comprendre la relation hôte-parasite en tenant compte des paramètres environnementaux.

2.1 Influence de l'exposition aux piqûres des *Anopheles* sur les profils de la réponse anticorps anti-*P. falciparum*

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche immuno-épidémiologique pour évaluer l'influence de différents facteurs incluant l'âge, le genre ainsi que l'exposition individuelle aux piqûres d'*Anopheles* sur le développement des réponses Ac-anti-*Plasmodium* évaluées à un temps donné. Pour ce faire les réponses Ac IgG, IgG1 et IgG3 spécifiques aux antigènes candidats vaccins AMA-1 et MSP-1 de *P. falciparum*, ont été analysées au cours d'une enquête transversale réalisée à Bouaké (Côte d'Ivoire) pendant la période de transmission chez des enfants vivant dans des villages/sites différemment exposés aux piqûres de *Culicidae*.
Nos résultats montrent que les enfants plus exposés aux piqûres d'*Anopheles* présentaient des réponses IgG, IgG1 et IgG3 plus faibles à *Pf*MSP1 lorsque la population totale ou uniquement le village de Petessou étaient considérés. L'âge et le genre des participants ne semblent pas influencer le niveau des réponses anticorps alors que les profils immunologiques étaient significativement différents entre les deux sites. En effet les enfants de Dar-es-Salam présentaient un profil immunologique avec des réponses quasi nulles pour les deux Ag plasmodiaux alors que les enfants de Petessou présentent des niveaux de réponses anticorps différents selon les Ags. Les enfants présentaient un niveau de réponses Ac significativement supérieur à Petessou par rapport à Dar-es-Salam pour l'ensemble des Ag. Aucune association n'a pu être mise en évidence entre les réponses Ac spécifiques de *Pf*AMA1 et les facteurs étudiés (âge, genre et exposition) ; une différence a été observée uniquement au niveau des villages Cette étude suggère ainsi que l'exposition aux *Anopheles* serait associée à certaines réponses Ac anti-*Plasmodium*.

L'exposition aux piqûres des moustiques influence t'elle l'intensité des réponses Ac anti-Plasmodium ?

Pour répondre à cette question les enfants ont été séparés en deux groupes d'exposition en fonction de leur niveau individuel de réponse IgG anti-gSG6-P1 selon une valeur seuil (moyenne de la population totale): un groupe faiblement exposé et un groupe fortement exposé. Les niveaux d'IgG, IgG1 et IgG3 aux Ag de *PfAMA-1* et *PfMSP-1* ont été comparés en fonction des facteurs démographiques (âge, sexe) et entre les deux groupes d'exposition. Les résultats rapportent que, les titres d'Ac spécifiques à *PfMSP*-1 diffèrent significativement entre les groupes d'exposition dans la population totale (IgG et IgG3) et dans le village de Petessou (IgG, IgG1 et IgG3). Une exposition plus élevée aux piqûres d'anophèles était associée à des titres de réponses plus faibles en IgG, IgG1 et IgG3 spécifiques à *PfMSP*-1. On pourrait s'attendre à ce que les réponses Ac soient plus élevées chez les enfants les plus exposés aux anophèles eu égard à la prévalence parasitaire qui était un peu plus de 50%. Néanmoins, les résultats dans cette étude sont cohérents avec les études qui ont rapporté des observations similaires qui suggèrent que l'exposition des souris à la salive d'arthropodes (*Anopheles* et tiques) entraîne une inhibition des réponses immunitaires spécifiques à l'Ag du pathogène (Depinay et al., 2006; Menten-Dedoyart et al., 2008).

Mécanisme d'action potentiel

Les interactions immunologiques conduisant à la modulation de la réponse immune anti-*Plasmodium* par les composés salivaires sont certainement complexes. Des études approfondies dans des modèles murins ou expérimentaux permettraient de caractériser les populations de cellules immunitaires activées par la salive ainsi que les cytokines sécrétées. L'exposition à la salive des moustiques et donc aux molécules bioactives qu'elle contient peut entraîner une modification des fonctions effectrices des cellules immunitaires et créer un déséquilibre de la production de cytokines de type Th1 et Th2 (Vogt et al., 2018). Des études expérimentales dans un modèle murin ont montré que les cytokines IL-4, inhibitrice IL-10 et la cytokine pro-inflammatoire TNF-α, étaient régulées à la hausse après une exposition aux piqûres non infectantes de moustiques *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles* (Zeidner et al., 1999; Depinay et al., 2006; Cox et al., 2012). L'activité immunosuppressive de l'IL-10 sécrétée pourrait augmenter la prolifération des cellules régulatrices T et réguler à la baisse la réponse Ac spécifique car elle inhibe l'activité des cellules dendritiques en empêchant la présentation

de l'Ag, l'expression de l'IFN-γ et l'activation des macrophages. Ainsi, il serait concevable que la diminution potentielle des niveaux d'Ac chez les enfants plus exposés puisse être associée à une plus forte production d'IL10. Cette hypothèse pourrait être étudiée en comparant le niveau de cette cytokine entre individus différemment exposés aux piqûres de moustiques et en analysant la production d'Ac anti-*Plasmodium in vitro* après stimulation par différentes cytokines de cellules immunitaires T provenant de ces mêmes individus.

Un faible nombre d'études épidémiologiques ont précédemment rapporté une association entre l'exposition aux *Anopheles* et l'acquisition d'une immunité naturelle contre *Plasmodium* en milieu naturel. Dechavanne et al. (2017) ont rapporté qu'une variable environnementale (indice quantitatif lié au risque spatio-temporel d'exposition aux moustiques anophèles) était significativement associé à des niveaux élevés d'Ac anti-*Plasmodium* chez les nourrissons. Sarr et al. (2007) ont rapporté que les enfants plus exposés aux piqûres d'anophèles présentaient une réponse IgG1 plus faible à des extraits de schizontes et à l'Ag *Pf*-CSP de *Plasmodium* par rapport aux enfants moins exposés, alors qu'aucun effet n'a été observé pour la réponse IgG3 contre les antigènes. Les différences dans les effets observés entre les études pourraient être attribuées au contexte différent d'exposition aux piqûres d'anophèles et l'âge des participants. En effet, l'historique (fréquence, durée et l'intensité) de l'exposition aux piqûres de moustiques modulerait le système immunitaire différemment, comme le mentionne une étude expérimentale chez des souris exposées aux tiques qui a rapporté un effet immuno stimulateur avec de faibles concentrations de salive alors que des concentrations élevées étaient immunosuppressives (Mejri et al., 2002). Des études chez l'Homme dans différents contextes de paludisme sont donc nécessaire pour mieux élucider ces observations.

De plus afin de s'affranchir du biais de l'intensité d'infection récente sur le niveau de réponses anti-*Plasmodium*, l'étude a inclus uniquement les enfants non parasités. L'historique d'infection des enfants n'est pas connu et ceci constitue une des principales limites de notre étude en plus du faible nombre d'individus inclus. En effet le temps écoulé depuis l'infection précédente par *P. falciparum* peut également participer aux différences observées entre les individus appartenant à différents groupes d'exposition.

Aucune association entre les groupes d'exposition aux piqûres d'*Anopheles* et les réponses humorales (IgG, IgG1 et IgG3) anti-*PfAMA*-1 n'as été observée. Cette différence d'effet selon les Ags de *Plasmodium* peut être due à des caractéristiques intrinsèques aux Ags mérozoïtes (Akpogheneta et al., 2008)(330)(Akpogheneta et al., 2008).

2.2 L'exposition aux autres insectes hématophages modulerait-elle la réponse anti-*Plasmodium* ?

Fait troublant, alors que l'intensité de la transmission du paludisme (DP similaire) et les niveaux de réponses IgG anti-gSG6-P1 des enfants étaient similaires entre les deux villages, les enfants de Dar-es-Salam présentaient un très faible niveau d'Ac anti-*Plasmodium*. Cela suggère que des facteurs autres que la seule exposition au parasite peuvent moduler les réponses humorales anti-*Plasmodium.* Dans notre étude , nous n'excluons pas l'effet de facteurs génétiques humains, puisque les enfants étudiés n'appartenaient pas au même groupe ethnique (Farouk et al., 2005; Arama et al., 2015). La population de Dar-es-Salam est principalement composée de Dioula et de Mandingue, tandis que les Baoulés autochtones vivent dans le village rural de Petessou. La présence de *Culex* (anthropophiles) a été signalée uniquement dans le village de Dar-es-Salam par les données entomologiques. La salive des moustiques est connue pour contenir près de 100 protéines et des analyses comparatives ont indiqué que la salive de *Culex* et d'*Aedes* contient des protéines salivaires spécifiques qui ne sont pas produites dans la salive d'*Anopheles* (Ribeiro et al., 2004; Calvo et al., 2010). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'exposition aux composants immunomodulateurs de la salive de *Culex* peut également contribuer, en plus d'autres facteurs, à la régulation négative des réponses immunitaires observées chez les enfants de Dar-es-Salam. La disponibilité d'un biomarqueur sérologique d'exposition évaluant spécifiquement l'exposition individuelle aux piqûres de *Culex spp*. serait précieuse dans une analyse multivariée pour renforcer cette hypothèse.

Des études sur le terrain, dans des contextes épidémiologiques différents, doivent apporter davantage de preuves de ses effets immunomodulateurs sur l'immunité naturellement acquise contre *Plasmodium*. Par ailleurs, des études expérimentales sont nécessaires afin de caractériser les effets de la salive de moustique sur le système immunitaire humain, par exemple en analysant les populations de cellules immunitaires activées ainsi que les cytokines sécrétées après stimulation de PBMC par différentes concentrations de salive et/ou provenant d'individus exposés de manière différentielle aux piqûres de moustiques.

2.3 Influence de l'exposition aux piqûres de moustique et d'autres facteurs sur la dynamique de la réponse anticorps anti-*Plasmodium falciparum* acquise après une infection.

La première étude transversale a suggéré que l'intensité des réponses anticorps anti-*Plasmodium* pouvaient être associée au degré d'exposition des individus aux piqûres d'*Anopheles*. En outre, nous avions émis l'hypothèse de l'implication d'autres facteurs, notamment les facteurs liés à l'hôte (susceptibilité génétique), au parasite et également l'exposition aux piqûres des vecteurs du genre *Culex.* Ces moustiques vecteurs ne transmettent pas le parasite *P. falciparum*. En absence d'un marqueur immuno-sérologique spécifique de l'exposition aux *Culex*, nous n'avons pas pu tester cette dernière hypothèse. Une autre limite de cette première étude était le caractère transversal de l'étude, qui ne nous permettait pas de prendre en compte l'historique d'infection des individus.

A cet effet, afin d'étudier le pouvoir immunomodulateur de la salive des vecteurs sur la réponse immune anti-*P. falciparum* acquise après infection, il était donc important d'étudier cet état de fait au cours d'une étude longitudinale en incluant d'autres facteurs confondants qui pourraient influencer cette réponse. En plus, en complément des réponses Ac anti-gSG6-P1 il semble donc opportun d'étudier l'influence du degré d'exposition aux piqûres d'autres genres de moustique notamment des *Aedes*. La réponse IgG spécifique au peptide salivaire d'Ae. aegypti N-term 34kDa représente un proxy de l'exposition à *Aedes* et a ainsi été incluse dans notre deuxième étude. Cette deuxième étude vise à évaluer l'influence de facteurs humains, parasitaires et environnementaux, incluant le niveau d'exposition aux piqûres des moustiques *Anopheles* et *Aedes*, sur la modulation de la réponse Ac (IgG) aux Ags d'extrait de schizontes (*Pf*shz) et de mérozoïtes (*Pf*AMA-1, *Pf*GLURP, *Pf*MSP-1 et *Pf*MSP-3) de *P. falciparum* après une infection naturelle sur une période de 42 jours. La cinétique d'évolution offre l'avantage de pouvoir décrire la variation des réponses IgG anti-*Plasmodium* de l'inclusion à la fin du suivi en relation avec les facteurs qui pourraient influencer la dynamique de la réponse.

Les résultats montrent une variabilité interindividuelle des réponses Ac et une dynamique d'évolution différentes selon les Ag. Seules les réponses Ac anti-*Pf*shz et anti-*Pf*GLURP varient au cours du suivi ; celle dirigée contre *Pf*shz augmente alors qu'elle diminue pour *Pf*GLURP ; ces résultats viennent souligner la différence d'immunogénicité des Ag de *Plasmodium* (Drakeley et al., 2005) et le sobservations classiquement rencontrées au cours des études immunologiques longitudinales. Après une infection palustre clinique, les réponses

immunitaires atteignent un pic approximativement au bout d'une à deux semaines après l'infection puis déclinent rapidement (Yman et al., 2019; Proietti et al., 2013). Néanmoins certaines réponses Ac anti-*Plasmodium* ont pu être détectées de nombreuses années après l'arrêt d'exposition aux parasites (Drakeley et al., 2005; Fowkes et al., 2012; White et al., 2014) alors que d'autres études ont montré le contraire (Perraut et al., 2000). Cependant, le délai des 42 jours dans notre étude pourrait ne pas permettre de détecter le pic d'IgG classiquement observé dans ces études (Kinyanjui et al., 2007; Akpogheneta et al., 2008). En outre, les IgG ont une demi-vie différente selon les Ag (Fowkes et al., 2016) et cela pourrait participer aux disparités dans la dynamique de la réponse immunitaire aux différents Ag de *Plasmodium* observées au cours du suivi. D'autres facteurs liés au parasite et à l'hôte ou environnementaux (exposition aux moustiques) pourraient également participer à la modulation dans le temps de la réponse IgG à *P. falciparum*.

Comme dans la précédente étude, nous avons utilisé le même niveau d'analyse des réponses IgG anti-gSG6-P1 et anti N-term 34kDa pour évaluer l'intensité d'exposition aux piqûres de vecteurs des individus. Fait intéressant, la combinaison des deux réponses nous a permis de définir un proxy mixte d'exposition aux piqûres d'*Anopheles* et d'*Aedes*. Toutefois à la différence de la précédente étude, comme les réponses IgG anti-peptides salivaires sont transitoires et s'estompent en quelques semaines sans nouvelle exposition, nous avons considéré que l'évaluation de l'exposition aux moustiques à J42, pouvait refléter l'exposition passée depuis l'inclusion des individus dans l'étude.

Pour mieux comprendre la contribution des composants immunomodulateurs de la salive des moustiques dans la modulation des réponses immunitaires anti-*Plasmodium*, nous avons évalué ce facteur environnemental ainsi que différents facteurs humains et parasitaires par une approche multivariée.

Les résultats ont montré que l'augmentation des réponses IgG pour *Pf*Shz et la diminution pour *Pf*GLURP était positivement associée à l'âge. En effet, l'histoire de l'infection et l'exposition cumulative au paludisme peuvent participer à la différence interindividuelle dans la dynamique des réponses immunitaires (Proietti et al., 2013). Les individus plus âgés peuvent avoir connu plus d'infections dues à *Plasmodium* et donc avoir développé plus de cellules B mémoires qui vont rapidement proliférer lors d'une réinfection et se différencier en cellules sécrétant des Ac à longue durée de vie qui peuvent induire une grande amplitude de réponse IgG aux Ag (Yman et al., 2019; Akpogheneta et al., 2008). Néanmoins, dans la présente étude, la plupart des participants avaient moins de 10 ans, ce qui limite la comparaison avec des personnes plus

âgées. Plus intéressant encore, ces variations étaient négativement associées au niveau initial (lors de l'infection à J0) d'IgG dirigé contre les Ag. On peut donc considérer que les individus ayant un niveau plus élevé d'Ac au moment de l'infection pourraient produire moins d'IgG spécifiques au *Plasmodium*.

Les résultats de l'analyse multivariée indiquent que les dynamiques d'évolution des réponses IgG anti-*Pf*shz et d'anti-*Pf*GLURP-R0 étaient associées à l'intensité d'exposition aux piqûres de *Aedes*. Le sens de cette association était différent suivant la réponse anticorps considérée.

Contrairement à ce qui est observé dans les relations immunitaires dans les cas d'infection homologue (*Anopheles–Plasmodium*), c'est l'exposition aux piqûres des *Aedes* qui était associée aux variations des réponses IgG anti-*Plasmodium*. Une exposition plus intense à *Aedes* affectait négativement la réponse immunitaire IgG anti-*Pf*GLURP alors qu'elle régulait à la hausse les IgG anti-*Pf*Shz. Des études précédentes ont indiqué que la salive des *Culicidae* a des effets immunomodulateurs différents sur le système immunitaire des vertébrés selon le genre de moustique. Wanasen et al. (2004) ont suggéré que la production de cytokines Th1 et Th2 était réduite en présence d'un extrait de glande salivaire d'*Aedes aegypti*, mais pas de *Culex quinquefasciatus* (Wanasen et al., 2004). Ainsi dans le cadre de notre étude nous avons donc observé une modulation différente de l'immunité anti-*Plasmodium* selon le genre de moustique avec un effet significatif de l'exposition à *Aedes*. Par ailleurs, l'ensemble des facteurs énumérés dans notre étude précédente comme pouvant avoir une incidence sur les réponses immunes anti-*Plasmodium*, notamment celles liées à la diversité et la spécificité des molécules bioactives contenues dans la salive des moustiques, peuvent en partie expliquer ces observations. Ces études suggèrent que la salive de diverses espèces de moustiques devrait avoir à la fois des effets similaires et des effets immunomodulateurs spécifiques au genre voire à l'espèce. Ici, par rapport à la salive d'*Anopheles*, les activités immunomodulatrices de la salive d'*Aedes* sur l'immunité anti-*Plasmodium* semblent plus prononcées. La salive d'*Aedes* a été largement étudiée et des études ont rapporté un effet profond sur l'activité des lymphocytes et des macrophages (Ribeiro et al., 2004; Bizzarro et al., 2013)

3. Implication des résultats dans la lutte contre le paludisme

Les réponses immunitaires sont complexes et multifactorielles. Les informations sur les effets immunomodulateurs de facteurs environnementaux sur l'immunité acquise contre *P.*

falciparum et la prémunition reste limitées, et ce malgré le rôle essentiel de cette immunité dans l'issue clinique des infections palustres et dans le développement de l'immunité vaccinale. L'étude de l'association entre l'exposition aux moustiques et la réponse immune protectrice anti- *P. falciparum* est importante et pourrait permettre d'optimiser de nouvelles stratégies de lutte contre le paludisme. Nous avons mis en évidence que l'intensité des réponses Ac aux infections plasmodiales peut être influencer par le degré d'exposition des populations aux piqûres des moustiques. Ainsi on peut imaginer que les individus fortement exposés aux piqûres de moustiques dont la conséquence serait la baisse des réponses Ac dirigés contre les Ag candidats vaccins des stades sanguins impliqués dans la prémunition seraient plus sujettes à faire des épisodes réguliers d'accès palustres graves. Le niveau d'exposition aux piqûres de moustiques pourrait avoir des conséquences sur la transmission des *Plasmodium* en zone d'endémies palustre. Ainsi, l'immunité initiée par la salive pourrait être une composante immunologique pouvant favoriser l'infection palustre et la transmission des *Plasmodium* (Leitner et al., 2010; Le Coupanec et al., 2013). A l'inverse l'immunité initiée par la salive pourrait tout aussi être une composante pouvant compléter l'établissement de l'immunité de prémunition des populations résidant en zone d'endémie et avoir un effet protecteur sur la transmission des pathogènes, comme nous l'avons observé au cours de la deuxième partie de nos travaux de thèse, avec l'implication de l'exposition aux piqûres des *Aedes* sur la dynamique d'évolution des réponses Ac anti-schizontes de *P. falciparum*.

Ainsi, les composés salivaires aux propriétés immunomodulatrices pourraient être les principales cibles pour le développement de vaccins bloquant la transmission. En effet, tirer parti de la modulation induite par la salive (par exemple, la neutralisation de l'immunosuppression ou la potentialisation par un Ag salivaire) aiderait le système immunitaire de l'hôte à répondre aux agents pathogènes. Fait intéressant, au cours de ces dernières années, la combinaison d'Ag de pathogènes et salivaires dans un seul vaccin est considérée comme une option précieuse (Zahedifard et al., 2014; Dragovic et al., 2018b). Tout compte fait d'autres preuves sur les effets immunomodulateurs de la salive des moustiques sur l'immunité naturelle contre Plasmodium *doivent* être fournies avec des études sur le terrain dans différents contextes épidémiologiques avec une cohorte plus grande et un suivi plus régulier. Des études expérimentales sont indispensables pour mieux comprendre et élucider les mécanismes impliqués, et pourraient conduire à la découverte de nouvelles molécules (immunosuppressives et/ou potentialisatrices jouant le rôle d'adjuvant) d'intérêt thérapeutique. Par exemple par une approche expérimentale (modèle animal), on pourrait évaluer si une exposition différente à la

salive des différents moustiques (*Anophèles*, *Aedes* et *Culex*) non infectieux pourrait avoir des conséquences détectables sur le développement et l'acquisition de la réponse immune spécifique aux Ag plasmodiaux étudiés dans notre thèse. Ceci permettrait premièrement, d'étudier l'influence des protéines salivaires sur la réponse cellulaire (par exemple en analysant la production de cytokines ex vivo), deuxièmement d'évaluer l'influence des protéines salivaires sur la production et l'orientation des réponses Ac anti-*P. falciparum* et troisièmement d'identifier une protéine salivaire spécifique qui jouerait ce rôle de protéine immunosuppressive ou potentialisatrice de la réponse immune protectrice.

Nos résultats peuvent également avoir un impact important sur l'évaluation de l'efficacité de vaccin contre la transmission du paludisme. La variabilité interindividuelle des réponses immunitaires humorales à un antigène spécifique de *P. falciparum* a été signalée dans différentes études évaluant l'immunogénicité des candidats vaccinaux (Perraut et al., 2002; Mamo et al., 2013). L'exposition aux protéines salivaires immunomodulatrices des insectes pendant ou après la période de vaccination pourrait moduler l'acquisition ainsi que la durabilité des réponses Ac à l'Ag candidat vaccin, comme indiqué pour les vaccins contre la rage ou la typhoïde (Moore et al., 2006b). Cela pourrait également avoir des conséquences sur les profils immunologiques induits en termes d'intensité et/ou de distribution des isotypes, et donc sur l'efficacité de l'immunité protectrice. Dans un essai vaccinal antipaludique, il est tout à fait concevable qu'un candidat vaccin puisse induire différents niveaux de protection chez les individus vaccinés qui ont été différemment exposés aux piqûres de moustiques (nature/intensité) ou aux infections plasmodiales ou aux deux. Par conséquent, outre la diversité des souches plasmodiales et les facteurs liés à l'hôte, l'impact de la salive des vecteurs (moustiques, tiques glossines etc.) sur le développement des réponses immunes anti-pathogènes devrait être étudié dans le développement et la mise en place de stratégies vaccinales (évaluation de l'efficacité lors des essais cliniques vaccinaux) et le contrôle des maladies transmises par ces vecteurs car l'immunité protectrice acquise peut varier selon le niveau d'exposition d'un individu aux piqûres. Pour vérifier cette assertion il serait donc utile d'évaluer l'influence de l'exposition aux piqûres des *culicidae* sur l'acquisition et le maintien dans le temps d'une immunité spécifique induite par vaccination.

D'une manière générale, d'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser les effets de la salive des moustiques sur le système immunitaire humain. Mieux connaitre les effets de la pression immunologique d'exposition aux moustiques est d'autant plus important

dans le contexte actuel des politiques de prévention du paludisme et des maladies à transmission vectorielle, reposant en général sur la réduction du contact Homme-vecteur.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de cette thèse, nous avons montré par une approche immuno-épidémiologique que l'exposition aux piqûres des moustiques et donc aux composants immunodulateurs de leur salive peut être associé à l'intensité de la réponse immune anti-*Plasmodium falciparum*. De manière intéressante, nos travaux ont montré que i) les individus différemment exposés aux piqûres de moustiques présentaient différents niveaux de réponses anticorps aux antigènes des stade mérozoïtes de *Plasmodium*, ii) l'exposition humaine à la salive d'*Aedes* en plus d'autres facteurs humains et parasitaires, contribuent à la régulation des réponses immunes anti-*Plasmodium* lors d'infection naturelle. Ces travaux de thèse constituent donc une contribution significative dans la compréhension des conséquences des composants bioactifs de la salive sur les réponses immunitaires spécifiques aux agents pathogènes. Ces observations pourraient être prises en compte dans les études épidémiologiques et les essais vaccinaux. Toutefois d'autres études s'avèrent nécessaire pour une compréhension des interactions immunologiques qui existent entre les vecteurs, l'Homme et les pathogènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdeladhim M., Coutinho-Abreu I. V., Townsend S., Pasos-Pinto S., Sanchez L., Rasouli M., et al. 2016. Molecular diversity between salivary proteins from new world and old world sand flies with mmphasis on Bichromomyia olmeca, the sand fly sector of Leishmania mexicana in Mesoamerica. PLoS Negl Trop Dis 10: e0004771.

Abdeladhim M., Jochim R. C., Ben Ahmed M., Zhioua E., Chelbi I., Cherni S., Louzir H., Ribeiro J. M. C., Valenzuela J. G. 2012. Updating the salivary gland transcriptome of Phlebotomus papatasi (Tunisian strain): the search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans. PLoS One 7: e47347.

Abdeladhim M., Kamhawi S., Valenzuela J. G. 2014. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. Infect Genet Evol 28: 691–703.

Abdella Y. M., Deribew A., Kassahun W. 2009. Does insecticide treated mosquito nets (ITNs) prevent clinical malaria in children aged between 6 and 59 months under program setting? J Community Health 34: 102–112.

Abdel-Naser M. B., Lotfy R. A., Al-Sherbiny M. M., Sayed Ali N. M. 2006. Patients with papular urticaria have IgG antibodies to bedbug (Cimex lectularius) antigens. Parasitol Res 98: 550–556.

Abdi A. I., Hodgson S. H., Muthui M. K., Kivisi C. A., Kamuyu G., Kimani D., et al. 2017. Plasmodium falciparum malaria parasite var gene expression is modified by host antibodies: longitudinal evidence from controlled infections of Kenyan adults with varying natural exposure. BMC Infect Dis 17: 585.

ACCESS-SMC Partnership. 2020. Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and central Africa: an observational study. Lancet 396: 1829–1840.

Acquah F. K., Adjah J., Williamson K. C., Amoah L. E. 2019. Transmission-blocking vaccines: old friends and new prospects. Infect Immun 87: e00775-18.

Adams T. S. 1999. Hematophagy and Hormone Release. Ann Entomol Soc America 92: 1–13.

Adja A. M., N'Goran K. E., Kengne P., Koudou G. B., Toure M., Koffi A. A., Tia E., Fontenille D., Chandre F. 2006. Vectorial transmission of malaria in shrubby Savannah area at Ganse, Ivory Coast. Med Trop (Mars) 66: 449–455.

Adja A. M., Zoh D. D., Sagna A. B., Kpan D. M. S., Guindo-Coulibaly N., Yapi A., Chandre F. 2021. Diversity of Anopheles Gambiae s.l., Giles (Diptera: Culicidae) Larval Habitats in Urban Areas and Malaria Transmission in Bouaké, Côte d'Ivoire. Vector Borne Zoonotic Dis 21: 593–601.

Adu B., Jepsen M. P. G., Gerds T. A., Kyei-Baafour E., Christiansen M., Dodoo D., Theisen M. 2014. Fc gamma receptor 3B (FCGR3B-c.233C>A-rs5030738) polymorphism modifies the protective effect of malaria specific antibodies in Ghanaian children. J Infect Dis 209: 285–289.

Ageep T. B., Damiens D., Alsharif B., Ahmed A., Salih E. H., Ahmed F. T., et al. 2014. Participation of irradiated Anopheles arabiensis males in swarms following field release in Sudan. Malar J 13: 484.

Agusto F. B., Del Valle S. Y., Blayneh K. W., Ngonghala C. N., Goncalves M. J., Li N., Zhao R., Gong H. 2013. The impact of bed-net use on malaria prevalence. J Theor Biol 320: 58–65.

Aidoo M., Lalvani A., Gilbert S. C., Hu J. T., Daubersies P., Hurt N., Whittle H. C., Druihle P., Hill A. V. 2000. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. Infect Immun 68: 227–232.

Aïkpon R., Agossa F., Osse R., Oussou O., Aizum N., Oke-Agbo F., Akogbeto M. 2013. Bendiocarb resistance in Anopheles gambiae s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. Parasit Vectors 6: 192.

Akpogheneta O. J., Duah N. O., Tetteh K. K. A., Dunyo S., Lanar D. E., Pinder M., Conway D. J. 2008. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. Infect. Immun. 76: 1748–1755.

Allison A. C. 2009. Genetic control of resistance to human malaria. Curr Opin Immunol 21: 499–505.

de Almeida M. E. M., de Vasconcelos M. G. S., Tarragô A. M., Mariúba L. A. M. 2021. Circumsporozoite surface protein-based malaria vaccines: a review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 63: e11.

Alout H., Labbé P., Chandre F., Cohuet A. 2017. Malaria vector control still matters despite insecticide resistance. Trends Parasitol 33: 610–618.

Amaratunga C., Lopera-Mesa T. M., Brittain N. J., Cholera R., Arie T., Fujioka H., Keefer J. R., Fairhurst R. M. 2011. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to Plasmodium falciparum malaria. PLoS One 6: e14798.

Amoah L. E., Nuvor S. V., Obboh E. K., Acquah F. K., Asare K., Singh S. K., Boampong J. N., Theisen M., Williamson K. C. 2017. Natural antibody responses to Plasmodium falciparum MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. Parasites & Vectors 10: 395.

Ampomah P., Stevenson L., Ofori M. F., Barfod L., Hviid L. 2014. Kinetics of B cell responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites. J Immunol 192: 5236–5244.

Anders R. F., Adda C. G., Foley M., Norton R. S. 2010. Recombinant protein vaccines against the asexual blood stages of Plasmodium falciparum. Hum Vaccin 6: 39–53.

Andrade B. B., Teixeira C. R., Barral A., Barral-Netto M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. An Acad Bras Cienc 77: 665–693.

Anstey N. M., Weinberg J. B., Hassanali M. Y., Mwaikambo E. D., Manyenga D., Misukonis M. A., et al. 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between

malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. J Exp Med 184: 557–567.

Antinori S., Galimberti L., Milazzo L., Corbellino M. 2012. *Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. Mediterr J Hematol Infect Dis*.

Aponte J. J., Menendez C., Schellenberg D., Kahigwa E., Mshinda H., Vountasou P., Tanner M., Alonso P. L. 2007. Age interactions in the development of naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum and its clinical presentation. PLoS Med 4: e242.

Arama C., Giusti P., Boström S., Dara V., Traore B., Dolo A., Doumbo O., Varani S., Troye-Blomberg M. 2011. Interethnic Differences in Antigen-Presenting Cell Activation and TLR Responses in Malian Children during Plasmodium falciparum Malaria. PLoS One 6: e18319.

Arama C., Maiga B., Dolo A., Kouriba B., Traoré B., Crompton P. D., et al. 2015. Ethnic differences in susceptibility to malaria: what have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? Acta Trop. 146: 152–156.

Arcà B., Lombardo F., Capurro M., della Torre A., Spanos L., Dimopoulos G., Louis C., James A. A., Coluzzi M. 1999. Salivary gland-specific gene expression in the malaria vector Anopheles gambiae. Parassitologia 41: 483–487.

Arcà B., Lombardo F., Francischetti I. M. B., Pham V. M., Mestres-Simon M., Andersen J. F., Ribeiro J. M. C. 2007. An insight into the sialome of the adult female mosquito Aedes albopictus. Insect Biochem Mol Biol 37: 107–127.

Arcà B., Lombardo F., Struchiner C. J., Ribeiro J. M. C. 2017. Anopheline salivary protein genes and gene families: an evolutionary overview after the whole genome sequence of sixteen Anopheles species. BMC Genomics 18: 153.

Arcà B., Lombardo F., Valenzuela J. G., Francischetti I. M., Marinotti O., Coluzzi M., Ribeiro J. M. 2005. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Anopheles gambiae. J Exp Biol 208: 3971–3986.

Arcà B., Ribeiro J. M. 2018. Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. Curr Opin Insect Sci 29: 102–109.

Arora G., Hart G. T., Manzella-Lapeira J., Doritchamou J. Y., Narum D. L., Thomas L. M., et al. 2018. NK cells inhibit Plasmodium falciparum growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. eLife 7: e36806.

Artavanis-Tsakonas K., Eleme K., McQueen K. L., Cheng N. W., Parham P., Davis D. M., Riley E. M. 2003. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol 171: 5396–5405.

Artavanis-Tsakonas K., Riley E. M. 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol 169: 2956–2963.

Assouho K. F., Adja A. M., Guindo-Coulibaly N., Tia E., Kouadio A. M. N., Zoh D. D., et al. 2020. Vectorial Transmission of Malaria in Major Districts of Côte d'Ivoire. J Med Entomol 57: 908–914.

Audibert C., Tchouatieu A.-M. 2021. Perception of malaria chemoprevention interventions in infants and children in eight sub-saharan African countries: an End user perspective study. Trop Med Infect Dis 6: 75.

Audran R., Cachat M., Lurati F., Soe S., Leroy O., Corradin G., Druilhe P., Spertini F. 2005. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. Infect Immun 73: 8017–8026.

Ayala D., Akone-Ella O., Rahola N., Kengne P., Ngangue M. F., Mezeme F., et al. 2019. Natural Wolbachia infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. Evol Appl 12: 1583–1594.

Ayi K., Turrini F., Piga A., Arese P. 2004. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. Blood 104: 3364–3371.

Badu K., Siangla J., Larbi J., Lawson B. W., Afrane Y., Ong'echa J., et al. 2012. Variation in exposure to Anopheles gambiae salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. Malar J 11: 318.

Baird J. K., Jones T. R., Danudirgo E. W., Annis B. A., Bangs M. J., Basri H., Purnomo null, Masbar S. 1991. Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria. Am J Trop Med Hyg 45: 65–76.

Baird J. K., Purnomo null, Basri H., Bangs M. J., Andersen E. M., Jones T. R., et al. 1993. Age-specific prevalence of Plasmodium falciparum among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. Am J Trop Med Hyg 49: 707–719.

Baird K. J., Maguire J. D., Price R. N. 2012. Diagnosis and treatment of Plasmodium vivax malaria. Adv Parasitol 80: 203–270.

Bakli M., Fraisier C., Almeras L. 2014. From Culex exposure to West Nile Virus infection: screening of specific biomarkers. OJVM 04: 145–161.

Baldini F., Rougé J., Kreppel K., Mkandawile G., Mapua S. A., Sikulu-Lord M., Ferguson H. M., Govella N., Okumu F. O. 2018. First report of natural Wolbachia infection in the malaria mosquito Anopheles arabiensis in Tanzania. Parasit Vectors 11: 635.

Baldini F., Segata N., Pompon J., Marcenac P., Shaw W. R., Dabiré R. K., Diabaté A., Levashina E. A., Catteruccia F. 2014. Evidence of natural Wolbachia infections in field populations of Anopheles gambiae. Nat Commun 5: 3985.

Barreaux A. M. G., Brou N., Koffi A. A., N'Guessan R., Oumbouke W. A., Tia I. Z., Thomas M. B. 2018. Semi-field studies to better understand the impact of eave tubes on mosquito mortality and behaviour. Malar J 17: 306.

Barry A. E., Arnott A. 2014. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. Front Immunol 5: 359.

Bartoloni A., Zammarchi L. 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. Mediterr J Hematol Infect Dis 4: e2012026.

Baruch D. I., Pasloske B. L., Singh H. B., Bi X., Ma X. C., Feldman M., Taraschi T. F., Howard R. J. 1995. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell 82: 77–87.

Baxter R. H. G. 2016. Chemosterilants for Control of Insects and Insect Vectors of Disease. Chimia (Aarau) 70: 715–720.

Beeson J. G., Drew D. R., Boyle M. J., Feng G., Fowkes F. J. I., Richards J. S. 2016. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. FEMS Microbiology Reviews 40: 343–372.

Behet M. C., Kurtovic L., van Gemert G.-J., Haukes C. M., Siebelink-Stoter R., Graumans W., et al. 2018. The complement system contributes to functional antibody-mediated responses induced by immunization with Plasmodium falciparum malaria sporozoites. Infect Immun 86: e00920-17.

Behr C., Poupot R., Peyrat M. A., Poquet Y., Constant P., Dubois P., Bonneville M., Fournie J. J. 1996. Plasmodium falciparum stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. Infect Immun 64: 2892–2896.

Beier J. C., Müller G. C., Gu W., Arheart K. L., Schlein Y. 2012. Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of Anopheles malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. Malar J 11: 31.

Bejon P., Warimwe G., Mackintosh C. L., Mackinnon M. J., Kinyanjui S. M., Musyoki J. N., Bull P. C., Marsh K. 2009. Analysis of immunity to febrile malaria in children that distinguishes immunity from lack of exposure. Infect Immun 77: 1917–1923.

Bejon P., Williams T. N., Nyundo C., Hay S. I., Benz D., Gething P. W., et al. 2014. A micro-epidemiological analysis of febrile malaria in Coastal Kenya showing hotspots within hotspots. Elife 3: e02130.

Bélard S., Issifou S., Hounkpatin A. B., Schaumburg F., Ngoa U. A., Esen M., et al. 2011. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. PLoS One 6: e22525.

Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J., Sacks D. L. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. J. Exp. Med. 188: 1941–1953.

Bell J. F., Stewart S. J., Wikel S. K. 1979. Resistance to tick-borne Francisella tularensis by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. Am J Trop Med Hyg 28: 876–880.

Ben Hadj Ahmed S., Kaabi B., Chelbi I., Cherni S., Derbali M., Laouini D., Zhioua E. 2011. Colonization of Phlebotomus papatasi changes the effect of pre-immunization with saliva from lack of protection towards protection against experimental challenge with Leishmania major and saliva. Parasit Vectors 4: 126.

Benelli G., Jeffries C. L., Walker T. 2016. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. Insects 7: E52.

Bergman D. K. 1996. Mouthparts and feeding mechanisms of haematophagous arthropods. In: Wikel, S.K. (Ed.), The Immunology of Host-ectoparasitic Arthropod Relationships. CAB International, p. pp.30-61.

Berry A., Fabre R., Benoit-Vical F., Cassaing S., Magnaval J. F. 2005. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. Med Trop (Mars) 65: 176–183.

Bhatt S., Weiss D. J., Cameron E., Bisanzio D., Mappin B., Dalrymple U., et al. 2015. The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. Nature 526: 207–211.

Bhattarai A., Ali A. S., Kachur S. P., Mårtensson A., Abbas A. K., Khatib R., et al. 2007. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. PLoS Med 4: e309.

Bian G., Joshi D., Dong Y., Lu P., Zhou G., Pan X., Xu Y., Dimopoulos G., Xi Z. 2013. Wolbachia invades Anopheles stephensi populations and induces refractoriness to Plasmodium infection. Science 340: 748–751.

Bijker E. M., Bastiaens G. J. H., Teirlinck A. C., van Gemert G.-J., Graumans W., van de Vegte-Bolmer M., et al. 2013. Protection against malaria after immunization by chloroquine prophylaxis and sporozoites is mediated by preerythrocytic immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 7862–7867.

Bijker E. M., Teirlinck A. C., Schats R., van Gemert G.-J., van de Vegte-Bolmer M., van Lieshout L., et al. 2014. Cytotoxic markers associate with protection against malaria in human volunteers immunized with Plasmodium falciparum sporozoites. J Infect Dis 210: 1605–1615.

Billingsley P. F., Baird J., Mitchell J. A., Drakeley C. 2006. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. Parasite Immunol 28: 143–153.

Bizzarro B., Barros M. S., Maciel C., Gueroni D. I., Lino C. N., Campopiano J., et al. 2013. Effects of Aedes aegypti salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. Parasit Vectors 6: 329.

Bliss C. M., Drammeh A., Bowyer G., Sanou G. S., Jagne Y. J., Ouedraogo O., et al. 2017. Viral vector malaria vaccines induce high-level T cell and antibody responses in west African children and infants. Mol Ther 25: 547–559.

Bolad A., Farouk S. E., Israelsson E., Dolo A., Doumbo O. K., Nebié I., et al. 2005. Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody

responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa. Scand J Immunol 61: 380–386.

Bosco A. B., Nankabirwa J. I., Yeka A., Nsobya S., Gresty K., Anderson K., et al. 2020. Limitations of rapid diagnostic tests in malaria surveys in areas with varied transmission intensity in Uganda 2017-2019: Implications for selection and use of HRP2 RDTs. PLoS One 15: e0244457.

Boström S., Giusti P., Arama C., Persson J.-O., Dara V., Traore B., Dolo A., Doumbo O., Troye-Blomberg M. 2012. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. Malar J 11: 109.

Bouharoun-Tayoun H., Attanah P., Sabchareon A., Chongsuphajaisiddhi T., Druilhe P. 1990. Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. J. Exp. Med 172: 1633–1641.

Bouharoun-Tayoun H., Druilhe P. 1992b. Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. Infect Immun 60: 1473–1481.

Bousema T., Roeffen W., Meijerink H., Mwerinde H., Mwakalinga S., van Gemert G.-J., et al. 2010. The dynamics of naturally acquired immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a low endemic area in Tanzania. PLoS ONE 5: e14114.

Boutlis C. S., Fagan P. K., Gowda D. C., Lagog M., Mgone C. S., Bockarie M. J., Anstey N. M. 2003. Immunoglobulin G (IgG) responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass. J Infect Dis 187: 862–865.

Bouyer J., Vreysen M. J. B. 2020. Yes, Irradiated Sterile Male Mosquitoes Can Be Sexually Competitive! Trends Parasitol 36: 877–880.

Boyle M. J., Chan J. A., Handayuni I., Reiling L., Feng G., Hilton A., et al. 2019. IgM in human immunity to Plasmodium falciparum malaria. Sci Adv 5: eaax4489.

Boyle M. J., Reiling L., Osier F. H., Fowkes F. J. I. 2017. Recent insights into humoral immunity targeting Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria. Int. J. Parasitol. 47: 99–104.

Briant L., Desprès P., Choumet V., Missé D. 2014. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. Virology 464–465: 26–32.

Brown K. N., Brown I. N. 1965. Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of Plasmodium knowlesi. Nature 208: 1286–1288.

Bruce-Chwatt L. J., Draper C. C., Avramidis D., Kazandzoglou O. 1975. Sero-epidemiological surveillance of disappearing malaria in Greece. J Trop Med Hyg 78: 194–200.

Brummer-Korvenkontio H., Lappalainen P., Reunala T., Palosuo T. 1994. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. J Allergy Clin Immunol 93: 551–555.

Brummer-Korvenkontio H., Palosuo T., François G., Reunala T. 1997. Characterization of Aedes communis, Aedes aegypti and Anopheles stephensi mosquito saliva antigens by immunoblotting. Int Arch Allergy Immunol 112: 169–174.

Bruniquel D., Schwartz R. H. 2003. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. Nat. Immunol. 4: 235–240.

Burt A., Coulibaly M., Crisanti A., Diabate A., Kayondo J. K. 2018. Gene drive to reduce malaria transmission in sub-Saharan Africa. Journal of Responsible Innovation 5: S66–S80.

Cairns M., Roca-Feltrer A., Garske T., Wilson A. L., Diallo D., Milligan P. J., Ghani A. C., Greenwood B. M. 2012. Estimating the potential public health impact of seasonal malaria chemoprevention in African children. Nat Commun 3: 881.

Calissano C., Modiano D., Sirima B. S., Konate A., Sanou I., Sawadogo A., Perlmann H., Troye-Blomberg M., Perlmann P. 2003. IgE antibodies to Plasmodium falciparum and severity of malaria in children of one ethnic group living in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg 69: 31–35.

Caljon G., Van Den Abbeele J., Sternberg J. M., Coosemans M., De Baetselier P., Magez S. 2006a. Tsetse fly saliva biases the immune response to Th2 and induces anti-vector antibodies that are a useful tool for exposure assessment. Int J Parasitol 36: 1025–1035.

Caljon G., Van Den Abbeele J., Stijlemans B., Coosemans M., De Baetselier P., Magez S. 2006b. Tsetse fly saliva accelerates the onset of Trypanosoma brucei infection in a mouse model associated with a reduced host inflammatory response. Infect Immun 74: 6324–6330.

Calvo. E., Dao A., Pham V. M., Ribeiro J. M. 2007. An insight into the sialome of Anopheles funestus reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. Insect Biochem Mol Biol 37: 164–175.

Calvo E., Mans B. J., Ribeiro J. M., Andersen J. F. 2009. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito anti-inflammatory protein. Proceed Nat Academ. Sciences 106: 3728–3733.

Calvo E., Mizurini D. M., Sá-Nunes A., Ribeiro J. M. C., Andersen J. F., Mans B. J., Monteiro R. Q., Kotsyfakis M., Francischetti I. M. B. 2011. Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. J Biol Chem 286: 27998–28010.

Calvo E., Pham V. M., F. L., B. A., M R. J. 2006. The sialotranscriptome of adult male Anopheles gambiae mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 36: 570–575.

Calvo E., Sanchez-Vargas I., Favreau A. J., Barbian K. D., Pham V. M., Olson K. E., Ribeiro J. M. 2010. An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, Culex tarsalis. BMC Genomics 11: 51.

Calvo E., Tokumasu F., Marinotti O., Villeval J.-L., Ribeiro J. M. C., Francischetti I. M. B. 2007. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. J Biol Chem 282: 26928–26938.

Camara B., Kantambadouno J.-B., Martin-Blondel G., Berry A., Alvarez M., Benoit-Vical F., Delmont J., Bouchaud O., Marchou B. 2009. [Hyperreactive malarial splenomegaly: three clinical cases and literature review]. Med Mal Infect 39: 29–35.

Camara S., Koffi A. A., Ahoua Alou L. P., Koffi K., Kabran J.-P. K., Koné A., Koffi M. F., N'Guessan R., Pennetier C. 2018. Mapping insecticide resistance in Anopheles gambiae (s.l.) from Côte d'Ivoire. Parasit Vectors 11: 19.

Camargos Costa D., Pereira de Assis G. M., de Souza Silva F. A., Araújo F. C., de Souza Junior J. C., Braga Hirano Z. M., et al. 2015. Plasmodium simium, a Plasmodium vivax-related malaria parasite: genetic variability of Duffy binding protein II and the Duffy antigen/receptor for chemokines. PLoS One 10: e0131339.

Candolfi E. 2005. [Transfusion-transmitted malaria, preventive measures]. Transfus Clin Biol 12: 107–113.

Carneiro I., Roca-Feltrer A., Griffin J. T., Smith L., Tanner M., Schellenberg J. A., Greenwood B., Schellenberg D. 2010. Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: a systematic review and pooled analysis. PLoS One 5: e8988.

Carnevale P., Robert V. (eds). 2009. *Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Éditions.

Carvalho L. J. M., Alves F. A., Bianco C., Oliveira S. G., Zanini G. M., Soe S., et al. 2005. Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the Plasmodium falciparum antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. Clin Diagn Lab Immunol 12: 242–248.

Carvalho L. J. M., Oliveira S. G., Theisen M., Alves F. A., Andrade M. C. R., Zanini G. M., et al. 2004. Immunization of Saimiri sciureus monkeys with Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. Scand J Immunol 59: 363–372.

Ceesay S. J., Casals-Pascual C., Erskine J., Anya S. E., Duah N. O., Fulford A. J. C., et al. 2008. Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis. Lancet 372: 1545–1554.

Chadee D. D., Beier J. C. 1997. Factors influencing the duration of blood-feeding by laboratory-reared and wild Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) from Trinidad, West Indies. Ann Trop Med Parasitol 91: 199–207.

Chakravarty S., Cockburn I. A., Kuk S., Overstreet M. G., Sacci J. B., Zavala F. 2007. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. Nat Med 13: 1035–1041.

Champagne D. E. 2004. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders 4. pp. 375–396.

Chan J.-A., Boyle M. J., Moore K. A., Reiling L., Lin Z., Hasang W., et al. 2019. Antibody targets on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes that are associated with immunity to severe malaria in young children. J Infect Dis 219: 819–828.

Chan J.-A., Fowkes F. J. I., Beeson J. G. 2014. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. Cell Mol Life Sci 71: 3633–3657.

Chan J.-A., Howell K. B., Reiling L., Ataide R., Mackintosh C. L., Fowkes F. J. I., et al. 2012. Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity. J Clin Invest 122: 3227–3238.

Chan J.-A., Stanisic D. I., Duffy M. F., Robinson L. J., Lin E., Kazura J. W., et al. 2017. Patterns of protective associations differ for antibodies to P. falciparum-infected erythrocytes and merozoites in immunity against malaria in children. Eur J Immunol 47: 2124–2136.

Chandramohan D., Dicko A., Zongo I., Sagara I., Cairns M., Kuepfer I., et al. 2020. Seasonal malaria vaccination: protocol of a phase 3 trial of seasonal vaccination with the RTS,S/AS01E vaccine, seasonal malaria chemoprevention and the combination of vaccination and chemoprevention. BMJ Open 10: e035433.

Charlab R., Rowton E. D., Ribeiro J. M. 2000. The Salivary Adenosine Deaminase from the Sand fly Lutzomyia longipalpis. Exp Parasitol 95: 45–53.

Chaumeau V., Andolina C., Fustec B., Tuikue Ndam N., Brengues C., Herder S., et al. 2016. Comparison of the Performances of Five Primer Sets for the Detection and Quantification of Plasmodium in Anopheline Vectors by Real-Time PCR. PLoS One 11: e0159160.

Cherif M., Amoako-Sakyi D., Dolo A., Pearson J.-O., Gyan B., Obiri-Yeboah D., et al. 2016. Distribution of FcγR gene polymorphisms among two sympatric populations in Mali: differing allele frequencies, associations with malariometric indices and implications for genetic susceptibility to malaria. Malar J 15: 29.

Cherif M. K., Ouédraogo O., Sanou G. S., Diarra A., Ouédraogo A., Tiono A., et al. 2017. Antibody responses to P. falciparum blood stage antigens and incidence of clinical malaria in children living in endemic area in Burkina Faso. BMC Res Notes 10.

Cherif M. K., Sanou G. S., Bougouma E. C., Diarra A., Ouédraogo A., Dolo A., et al. 2015. Is Fc gamma receptor IIA (FcγRIIA) polymorphism associated with clinical malaria and Plasmodium falciparum specific antibody levels in children from Burkina Faso? Acta Trop 142: 41–46.

Chmelar J., Calvo E., Pedra J. H. F., Francischetti I. M. B., Kotsyfakis M. 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. J Proteomics 75: 3842–3854.

Chotivanich K., Udomsangpetch R., Simpson J. A., Newton P., Pukrittayakamee S., Looareesuwan S., White N. J. 2000. Parasite multiplication potential and the severity of Falciparum malaria. J Infect Dis 181: 1206–1209.

Chouaibou M., Simard F., Chandre F., Etang J., Darriet F., Hougard J. M. 2006. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against Anopheles funestus and pyrethroid-resistant Anopheles gambiae in North Cameroon. Malar J 5: 77.

Choudhury H. R., Sheikh N. A., Bancroft G. J., Katz D. R., de Souza J. B. 2000. Early Nonspecific Immune Responses and Immunity to Blood-Stage Nonlethal Plasmodium yoelii Malaria. Infect Immun 68: 6127–6132.

Choumet V., Carmi-Leroy A., Laurent C., Lenormand P., Rousselle J.-C., Namane A., Roth C., Brey P. T. 2007. The salivary glands and saliva of Anopheles gambiae as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. Proteomics 7: 3384–3394.

Claessens A., Hamilton W. L., Kekre M., Otto T. D., Faizullabhoy A., Rayner J. C., Kwiatkowski D. 2014. Generation of antigenic diversity in Plasmodium falciparum by structured rearrangement of Var genes during mitosis. PLoS Genet 10: e1004812.

Cockburn I. 2013. Chimeric parasites as tools to study Plasmodium immunology and assess malaria vaccines. Methods Mol. Biol. 923: 465–479.

Cockburn I. A., Seder R. A. 2018. Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. Nat Immunol 19: 1199–1211.

Coetzee M., Hunt R. H., Wilkerson R., Della Torre A., Coulibaly M. B., Besansky N. J. 2013. Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex. Zootaxa 3619: 246–274.

Cohen S., McGREGOR I. A., Carrington S. 1961a. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192: 733–737.

Cohen S., McGREGOR I. A., Carrington S. 1961b. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192: 733–737.

Coley A. M., Gupta A., Murphy V. J., Bai T., Kim H., Foley M., Anders R. F., Batchelor A. H. 2007. Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. PLoS Pathog 3: 1308–1319.

Collin N., Gomes R., Teixeira C., Cheng L., Laughinghouse A., Ward J. M., et al. 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for Leishmania. PLoS Pathog 5: e1000441.

Collins W. E., Jeffery G. M. 2005. Plasmodium ovale: Parasite and Disease. Clin Microbiol Rev 18: 570–581.

Collins W. E., Jeffery G. M. 2007. Plasmodium malariae: Parasite and Disease. Clin Microbiol Rev 20: 579–592.

Coluzzi M., Calabrò M. L., Manno D., Chieco-Bianchi L., Schulz T. F., Ascoli V. 2003. Reduced seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), human herpesvirus 8 (HHV8), related to suppression of Anopheles density in Italy. Med Vet Entomol 17: 461–464.

Coluzzi M., Petrarca V., di Deco M. A. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in Anopheles gambiae. Bollettino di zoologia 52: 45–63.

Conway M. J., Colpitts T. M., Fikrig E. 2014. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. Annu Rev Virol 1: 71–88.

Cook J., Aydin-Schmidt B., González I. J., Bell D., Edlund E., Nassor M. H., et al. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J 14: 43.

Corbel V., Darriet F., Chandre F., Hougard J. M. 2002. Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. Parasite 9: 255–259.

Cornelie S., Remoue F., Doucoure S., Ndiaye T., Sauvage F.-X., Boulanger D., Simondon F. 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of Anopheles gambiae in African children. Malar J 6: 75.

Coulibaly J. T., Ouattara M., Keiser J., Bonfoh B., N'Goran E. K., Andrews J. R., Bogoch I. I. 2016. Evaluation of Malaria Diagnoses Using a Handheld Light Microscope in a Community-Based Setting in Rural Côte d'Ivoire. Am J Trop Med Hyg 95: 831–834.

Courtin D., Djilali-Saïah A., Milet J., Soulard V., Gaye O., Migot-Nabias F., Sauerwein R., Garcia A., Luty A. J. F. 2011. Schistosoma haematobium infection affects Plasmodium falciparum-specific IgG responses associated with protection against malaria. Parasite Immunol 33: 124–131.

Courtin D., Oesterholt M., Huismans H., Kusi K., Milet J., Badaut C., et al. 2009. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against Plasmodium falciparum malaria. PLoS One 4: e7590.

Cox J., Mota J., Sukupolvi-Petty S., Diamond M. S., Rico-Hesse R. 2012. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. J. Virol. 86: 7637–7649.

Cox-Singh J. 2018. Plasmodium knowlesi: experimental model, zoonotic pathogen and golden opportunity? Parasitology 145: 1–5.

Culbert N. J., Balestrino F., Dor A., Herranz G. S., Yamada H., Wallner T., Bouyer J. 2018. A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. Sci Rep 8: 16179.

Culbert N. J., Somda N. S. B., Hamidou M., Soma D. D., Caravantes S., Wallner T., Wadaka M., Yamada H., Bouyer J. 2020. A rapid quality control test to foster the development of the sterile insect technique against Anopheles arabiensis. Malar J 19: 44.

Dai J., Wang P., Adusumilli S., Booth C. J., Narasimhan S., Anguita J., Fikrig E. 2009. Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. Cell Host Microbe 6: 482–492.

Datoo M. S., Natama M. H., Somé A., Traoré O., Rouamba T., Bellamy D., et al. 2021. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. Lancet 397: 1809–1818.

Day K. P., Marsh K. 1991. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. Immunol Today 12: A68-71.

De La Cruz N., Crookston B., Dearden K., Gray B., Ivinson N., Alder S., Davis R. 2006. Who sleeps under bednets in Ghana? A doer/non-doer analysis of malaria prevention behaviours. Malar J 5: 21.

De Souza J. B., Williamson K. H., Otani T., Playfair J. H. 1997. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. Infect Immun 65: 1593–1598.

Dechavanne C., Dechavanne S., Sadissou I., Lokossou A. G., Alvarado F., Dambrun M., et al. 2017. Associations between an IgG3 polymorphism in the binding domain for FcRn, transplacental transfer of malaria-specific IgG3, and protection against Plasmodium falciparum malaria during infancy: A birth cohort study in Benin. PLoS Med 14: e1002403.

Dechavanne C., Sadissou I., Bouraima A., Ahouangninou C., Amoussa R., Milet J., et al. 2016. Acquisition of natural humoral immunity to P. falciparum in early life in Benin: impact of clinical, environmental and host factors. Sci Rep 6: 33961.

Deloron P., Dumont N., Nyongabo T., Aubry P., Astagneau P., Ndarugirire F., et al. 1994. Immunologic and biochemical alterations in severe falciparum malaria: relation to neurological symptoms and outcome. Clin Infect Dis 19: 480–485.

Demarta-Gatsi C., Mécheri S. 2021. Vector saliva controlled inflammatory response of the host may represent the Achilles heel during pathogen transmission. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 27: e20200155.

Demeure C. E., Brahimi K., Hacini F., Marchand F., Péronet R., Huerre M., et al. 2005. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. J. Immunol. 174: 3932–3940.

Dent A. E., Nakajima R., Liang L., Baum E., Moormann A. M., Sumba P. O., et al. 2015. Plasmodium falciparum protein microarray antibody profiles correlate with protection from symptomatic malaria in Kenya. J Infect Dis 212: 1429–1438.

Depinay N., Hacini F., Beghdadi W., Peronet R., Mécheri S. 2006. Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites. J. Immunol. 176: 4141–4146.

Diallo T. O., Remoue F., Gaayeb L., Schacht A.-M., Charrier N., De Clerck D., et al. 2010. Schistosomiasis coinfection in children influences acquired immune response against Plasmodium falciparum malaria antigens. PLoS One 5: e12764.

Dicko A., Diemert D. J., Sagara I., Sogoba M., Niambele M. B., Assadou M. H., et al. 2007. Impact of a Plasmodium falciparum AMA1 vaccine on antibody responses in adult Malians. PLoS One 2: e1045.

Dicko A., Sagara I., Ellis R. D., Miura K., Guindo O., Kamate B., et al. 2008. Phase 1 study of a combination AMA1 blood stage malaria vaccine in Malian children. PLoS One 3: e1563.

Dobaño C., Santano R., Vidal M., Jiménez A., Jairoce C., Ubillos I., et al. 2019. Differential Patterns of IgG Subclass Responses to Plasmodium falciparum Antigens in Relation to Malaria Protection and RTS,S Vaccination. Front Immunol 10: 439.

Dodoo D., Aikins A., Kusi K. A., Lamptey H., Remarque E., Milligan P., et al. 2008. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. Malar J 7: 142.

Dodoo D., Omer F. M., Todd J., Akanmori B. D., Koram K. A., Riley E. M. 2002. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis 185: 971–979.

Dodoo D., Theisen M., Kurtzhals J. A., Akanmori B. D., Koram K. A., Jepsen S., Nkrumah F. K., Theander T. G., Hviid L. 2000. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against Plasmodium falciparum malaria. J. Infect. Dis. 181: 1202–1205.

Dolo A., Coulibaly M., Maïga B., Daou M., Arama C., Troye-Blomberg M., Doumbo O. 2012. Réponse humorale anti-Plasmodium falciparum AMA1 et MSP1 dans deux groupes ethniques vivant en sympatrie au Mali. Bulletin de la Société de pathologie exotique 105: 364–369.

Dondorp A. M., Lee S. J., Faiz M. A., Mishra S., Price R., Tjitra E., et al. 2008. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. Clin Infect Dis 47: 151–157.

Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A. P., Tarning J., et al. 2009. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. N Engl J Med 361: 455–467.

Donovan M. J., Messmore A. S., Scrafford D. A., Sacks D. L., Kamhawi S., McDowell M. A. 2007. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. Infect. Immun. 75: 2523–2530.

Doolan D. L., Dobaño C., Baird J. K. 2009. Acquired immunity to malaria. Clin Microbiol Rev 22: 13–36.

Dossou-Yovo J., Diarrassouba S., Doannio J., Darriet F., Carnevale P. 1999. The aggressive cycle of Anopheles gambiae s.s. inside houses and malaria transmission in the Bouake region (Côte d'Ivoire). Value of using impregnated mosquito nets. Bull Soc Pathol Exot 92: 198–200.

Dossou-Yovo J., Doannio J. M., Diarrassouba S., Chauvancy G. 1998. The impact of rice fields on malaria transmission in the city of Bouaké, Côte d'Ivoire. Bull Soc Pathol Exot 91: 327–333.

Doucoure S., Mouchet F., Cornelie S., DeHecq J. S., Rutee A. H., Roca Y., et al. 2012. Evaluation of the human IgG antibody response to Aedes albopictus saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites. PLoS Negl Trop Dis 6: e1487.

Doucoure S., Mouchet F., Cornelie S., Drame P. M., D'Ortenzio E., DeHecq J. S., Remoue F. 2014. Human antibody response to Aedes albopictus salivary proteins: a potential biomarker to evaluate the efficacy of vector control in an area of Chikungunya and Dengue Virus transmission. Biomed Res Int 2014: 746509.

Dragovic S. M., Agunbiade T. A., Freudzon M., Yang J., Hastings A. K., Schleicher T. R., et al. 2018a. Immunization with AgTRIO, a protein in Anopheles saliva, contributes to protection against Plasmodium infection in mice. Cell Host Microbe 23: 523-535.e5.

Dragovic S. M., Agunbiade T. A., Freudzon M., Yang J., Hastings A. K., Schleicher T. R., et al. 2018b. Immunization with AgTRIO, a protein in Anopheles saliva, contributes to protection against Plasmodium infection in mice. Cell Host Microbe 23: 523-535.e5.

Drakeley C. J., Corran P. H., Coleman P. G., Tongren J. E., McDonald S. L. R., Carneiro I., et al. 2005. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5108–5113.

Drame P. M., Diallo A., Poinsignon A., Boussari O., Dos Santos S., Machault V., et al. 2013. Evaluation of the effectiveness of malaria vector control measures in urban settings of Dakar by a specific anopheles salivary biomarker. PLoS One 8: e66354.

Drame P. M., Machault V., Diallo A., Cornélie S., Poinsignon A., Lalou R., et al. 2012. IgG responses to the gSG6-P1 salivary peptide for evaluating human exposure to Anopheles bites in urban areas of Dakar region, Sénégal. Malar J. 11: 72.

Drame P. M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Le Mire J., Toto J.-C., et al. 2010. Human antibody responses to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. PLoS One 5: e15596.

Drame P. M., Poinsignon A., Dechavanne C., Cottrell G., Farce M., Ladekpo R., et al. 2015. Specific antibodies to Anopheles gSG6-P1 salivary peptide to assess early childhood exposure to malaria vector bites. Malar. J. 14: 285.

Draper S. J., Angov E., Horii T., Miller L. H., Srinivasan P., Theisen M., Biswas S. 2015. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. Vaccine 33: 7433–7443.

Draper S. J., Heeney J. L. 2010. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. Nat Rev Microbiol 8: 62–73.

Draper S. J., Sack B. K., King C. R., Nielsen C. M., Rayner J. C., Higgins M. K., Long C. A., Seder R. A. 2018. Malaria vaccines: recent advances and new horizons. Cell Host & Microbe 24: 43–56.

Druilhe P., Spertini F., Soesoe D., Corradin G., Mejia P., Singh S., et al. 2005. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill Plasmodium falciparum. PLoS Med 2: e344.

Duarte J., Deshpande P., Guiyedi V., Mécheri S., Fesel C., Cazenave P.-A., Mishra G. C., Kombila M., Pied S. 2007. Total and functional parasite specific IgE responses in Plasmodium falciparum-infected patients exhibiting different clinical status. Malar J 6: 1.

Duncan C. J. A., Hill A. V. S., Ellis R. D. 2012. Can growth inhibition assays (GIA) predict blood-stage malaria vaccine efficacy? Hum Vaccin Immunother 8: 706–714.

Dutta S., Dlugosz L. S., Drew D. R., Ge X., Ge X., Ababacar D., et al. 2013. Overcoming antigenic diversity by enhancing the immunogenicity of conserved epitopes on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1. PLoS Pathog 9: e1003840.

Dutta S., Sullivan J. S., Grady K. K., Haynes J. D., Komisar J., Batchelor A. H., et al. 2009. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. PLoS One 4: e8138.

Edwards J. F., Higgs S., Beaty B. J. 1998. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. J Med Entomol 35: 261–265.

Elanga Ndille E., Doucoure S., Damien G., Mouchet F., Drame P. M., Cornelie S., et al. 2012. First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to Aedes aegypti bites. PLoS Negl Trop Dis 6: e1905.

Elanga Ndille E., Doucoure S., Poinsignon A., Mouchet F., Cornelie S., D'Ortenzio E., DeHecq J. S., Remoue F. 2016. Human IgG Antibody Response to Aedes Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area. PLoS Negl Trop Dis 10: e0005109.

Enayati A., Hemingway J. 2010. Malaria management: past, present, and future. Annu Rev Entomol 55: 569–591.

Engvall E., Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8: 871–874.

Epstein J. E., Paolino K. M., Richie T. L., Sedegah M., Singer A., Ruben A. J., et al. 2017. Protection against Plasmodium falciparum malaria by PfSPZ Vaccine. JCI Insight 2.

Epstein J. E., Tewari K., Lyke K. E., Sim B. K. L., Billingsley P. F., Laurens M. B., et al. 2011. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic $CD8^+$ T cell immunity. Science 334: 475–480.

Erhart A., Thang N. D., Xa N. X., Thieu N. Q., Hung L. X., Hung N. Q., et al. 2007. Accuracy of the health information system on malaria surveillance in Vietnam. Trans R Soc Trop Med Hyg 101: 216–225.

Esen M., Kremsner P. G., Schleucher R., Gässler M., Imoukhuede E. B., Imbault N., et al. 2009. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. Vaccine 27: 6862–6868.

Esu E. B., Oringanje C., Meremikwu M. M. 2019. Intermittent preventive treatment for malaria in infants. Cochrane Database Syst Rev 2019: CD011525.

Faber B. W., Hellwig S., Houard S., Havelange N., Drossard J., Mertens H., et al. 2016. Production, quality control, stability and pharmacotoxicity of a malaria vaccine comprising three highly similar PfAMA1 protein molecules to overcome antigenic variation. PLoS One 11: e0164053.

Falk N., Kaestli M., Qi W., Ott M., Baea K., Cortés A., Beck H.-P. 2009. Analysis of Plasmodium falciparum var genes expressed in children from Papua New Guinea. J Infect Dis 200: 347–356.

Farouk S. E., Dolo A., Bereczky S., Kouriba B., Maiga B., Färnert A., et al. 2005. Different antibody- and cytokine-mediated responses to Plasmodium falciparum parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. Microbes Infect. 7: 110–117.

Farouk S. E., Mincheva-Nilsson L., Krensky A. M., Dieli F., Troye-Blomberg M. 2004. Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. Eur J Immunol 34: 2248–2256.

Fernandez V., Hommel M., Chen Q., Hagblom P., Wahlgren M. 1999. Small, Clonally Variant Antigens Expressed on the Surface of the Plasmodium falciparum–Infected Erythrocyte Are Encoded by the rif Gene Family and Are the Target of Human Immune Responses. J Exp Med 190: 1393–1404.

Ferreira B. R., Silva J. S. 1998. Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. Vet Immunol Immunopathol 64: 279–293.

Fillol F., Sarr J. B., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Riveau G., Simondon K. B., Remoué F. 2009. Impact of child malnutrition on the specific anti-Plasmodium falciparum antibody response. Malar. J. 8: 116.

Flanagan K. L., Plebanski M., Odhiambo K., Sheu E., Mwangi T., Gelder C., et al. 2006. Cellular reactivity to the p. Falciparum protein trap in adult kenyans: novel epitopes, complex cytokine patterns, and the impact of natural antigenic variation. Am J Trop Med Hyg 74: 367–375.

Flanagan K. L., Wilson K. L., Plebanski M. 2016. Polymorphism in liver-stage malaria vaccine candidate proteins: immune evasion and implications for vaccine design. Expert Rev Vaccines 15: 389–399.

Fontaine A., Diouf I., Bakkali N., Missé D., Pagès F., Fusai T., Rogier C., Almeras L. 2011a. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. Parasit Vectors 4: 187.

Fontaine A., Pascual A., Orlandi-Pradines E., Diouf I., Remoué F., Pagès F., Fusaï T., Rogier C., Almeras L. 2011b. Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts. PLoS ONE 6: e29107.

Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P. H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., et al. 2003. Systematics and biology of Anopheles vectors of Plasmodium in Africa, recent data. Med Trop 63: 247–253.

Fornace K. M., Brock P. M., Abidin T. R., Grignard L., Herman L. S., Chua T. H., et al. 2019. Environmental risk factors and exposure to the zoonotic malaria parasite Plasmodium knowlesi across northern Sabah, Malaysia: a population-based cross-sectional survey. Lancet Planet Health 3: e179–e186.

Fournié J. J., Bonneville M. 1996. Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. Res Immunol 147: 338–347.

Fowkes F. J. I., Boeuf P., Beeson J. G. 2016. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. Parasitology 143: 139–153.

Fowkes F. J. I., Richards J. S., Simpson J. A., Beeson J. G. 2010. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 7: e1000218.

Fowkes F. JI., McGready R., Cross N. J., Hommel M., Simpson J. A., Elliott S. R., et al. 2012. New insights into acquisition, boosting, and longevity of immunity to malaria in pregnant women. J Infect Dis 206: 1612–1621.

Francesquini F. C., Silveira F. T., Passero L. F. D., Tomokane T. Y., Carvalho A. K., Corbett C. E. P., Laurenti M. D. 2014. Salivary gland homogenates from wild-caught sand flies Lutzomyia flaviscutellata and Lutzomyia (Psychodopygus) complexus showed inhibitory effects on Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis infection in BALB/c mice. Int J Exp Pathol 95: 418–426.

Francischetti I. M. B. 2010. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. Toxicon 56: 1130–1144.

Francischetti I. M. B., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I. M., Ribeiro J. M. C. 2009. The role of saliva in tick feeding. Front Biosci (Landmark Ed) 14: 2051–2088.

Franzén L., Westin G., Shabo R., Aslund L., Perlmann H., Persson T., Wigzell H., Pettersson U. 1984. Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from Plasmodium falciparum. A novel approach to malaria diagnosis. Lancet 1: 525–528.

Fried M., Duffy P. E. 1996. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. Science 272: 1502–1504.

Frimpong A., Kusi K. A., Ofori M. F., Ndifon W. 2018. Novel strategies for malaria maccine design. Front Immunol 9.

Gamble C., Ekwaru P. J., Garner P., ter Kuile F. O. 2007. Insecticide-treated nets for the prevention of malaria in pregnancy: a systematic review of randomised controlled trials. PLoS Med 4: e107.

Gatton M. L., Cheng Q. 2002. Evaluation of the pyrogenic threshold for Plasmodium falciparum malaria in naive individuals. Am J Trop Med Hyg 66: 467–473.

Gatton M. L., Cheng Q. 2004. Investigating antigenic variation and other parasite-host interactions in Plasmodium falciparum infections in naïve hosts. Parasitology 128: 367–376.

Genton B., Al-Yaman F., Betuela I., Anders R. F., Saul A., Baea K., et al. 2003. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against Plasmodium falciparum in Papua New Guinean children. Vaccine 22: 30–41.

Ghoshal S., Gajendra P., Datta Kanjilal S., Mitra M., Sengupta S. 2018. Diversity analysis of MSP1 identifies conserved epitope organization in block 2 amidst high sequence variability in Indian Plasmodium falciparum isolates. Malar J 17: 447.

Gillies M. T., Coetzee M. 1987. A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). South African Institute for Medical Research 141.

Gillies M. T., De Meillon B. 1968. *The anophelinae of Africa south of the sahara (Ethiopian zoogeographical region)*.

Gomes F. M., Barillas-Mury C. 2018. Infection of anopheline mosquitoes with Wolbachia: Implications for malaria control. PLoS Pathog 14: e1007333.

Gomes F. M., Hixson B. L., Tyner M. D. W., Ramirez J. L., Canepa G. E., Alves E Silva T. L., et al. 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.

Gomes R., Oliveira F., Teixeira C., Meneses C., Gilmore D. C., Elnaiem D.-E., Kamhawi S., Valenzuela J. G. 2012. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. J Invest Dermatol 132: 2735–2743.

Gomes R., Teixeira C., Teixeira M. J., Oliveira F., Menezes M. J., Silva C., et al. 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 7845–7850.

Gonçalves R. M., Lima N. F., Ferreira M. U. 2014. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. Pathog Glob Health 108: 173–178.

Gonzales S. J., Reyes R. A., Braddom A. E., Batugedara G., Bol S., Bunnik E. M. 2020. Naturally Acquired Humoral Immunity Against Plasmodium falciparum Malaria. Front Immunol 11: 594653.

González R., Ataíde R., Naniche D., Menéndez C., Mayor A. 2012. HIV and malaria interactions: where do we stand? Expert Rev Anti Infect Ther 10: 153–165.

Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruna-Romero O., Nakayama T., et al. 2000. alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8461–8466.

Good M. F., Stanisic D. I. 2020. Whole parasite vaccines for the asexual blood stages of *Plasmodium*. Immunol Rev 293: 270–282.

Greenwood B. M., Bojang K., Whitty C. J. M., Targett G. A. T. 2005. Malaria. Lancet 365: 1487–1498.

Griffin J. T., Hollingsworth T. D., Reyburn H., Drakeley C. J., Riley E. M., Ghani A. C. 2015. Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure. Proc Biol Sci 282: 20142657.

Gu W., Novak R. J. 2005. Habitat-based modeling of impacts of mosquito larval interventions on entomological inoculation rates, incidence, and prevalence of malaria. Am J Trop Med Hyg 73: 546–552.

Gueirard P., Tavares J., Thiberge S., Bernex F., Ishino T., Milon G., et al. 2010. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 18640–18645.

Guerra M., Neres R., Salgueiro P., Mendes C., Ndong-Mabale N., Berzosa P., de Sousa B., Arez A. P. 2016. Plasmodium falciparum Genetic Diversity in Continental Equatorial Guinea before and after Introduction of Artemisinin-Based Combination Therapy. Antimicrob Agents Chemother 61: e02556-15.

Guillet P., Alnwick D., Cham M. K., Neira M., Zaim M., Heymann D., Mukelabai K. 2001. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. Bull World Health Organ 79: 998.

Gysin J., Pouvelle B., Fievet N., Scherf A., Lépolard C. 1999. Ex vivo desequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A. Infect Immun 67: 6596–6602.

Hamon J., Mouchet J. 1961. Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. Med Trop 21: 643–660.

Harp K. O., Botchway F., Dei-Adomakoh Y., Wilson M. D., Hood J. L., Adjei A. A., Stiles J. K., Driss A. 2020. Hemoglobin genotypes modulate inflammatory response to Plasmodium Infection. Front Immunol 11: 593546.

Harris K. S., Adda C. G., Khore M., Drew D. R., Valentini-Gatt A., Fowkes F. J. I., et al. 2014. Use of immunodampening to overcome diversity in the malarial vaccine candidate apical membrane antigen 1. Infect Immun 82: 4707–4717.

Hassan M. M., Zain H. M., Basheer M. A., Elhaj H.-E. F., El-Sayed B. B. 2014. Swarming and mating behavior of male Anopheles arabiensis Patton (Diptera: Culicidae) in an area of the Sterile Insect Technique Project in Dongola, northern Sudan. Acta Trop 132 Suppl: S64-69.

Hastings A. K., Uraki R., Gaitsch H., Dhaliwal K., Stanley S., Sproch H., et al. 2019. Aedes aegypti NeSt1 protein enhances zika virus pathogenesis by activating neutrophils. J Virol 93: e00395-19.

Hawley W. A., Phillips-Howard P. A., ter Kuile F. O., Terlouw D. J., M. J. M., Ombok M., et al. 2003. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. Am J Trop Med Hyg 121–127.

Healer J., Chiu C. Y., Hansen D. S. 2018. Mechanisms of naturally acquired immunity to P. falciparum and approaches to identify merozoite antigen targets. Parasitology 145: 839–847.

Healer J., Murphy V., Hodder A. N., Masciantonio R., Gemmill A. W., Anders R. F., Cowman A. F., Batchelor A. 2004. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in Plasmodium falciparum. Mol Microbiol 52: 159–168.

Hedrick P. W. 2012. Resistance to malaria in humans: the impact of strong, recent selection. Malar. J. 11: 349.

Helb D. A., Tetteh K. K. A., Felgner P. L., Skinner J., Hubbard A., Arinaitwe E., et al. 2015. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. Proceedings of the National Academy of Sciences 112: E4438–E4447.

Henderson K. A., Streltsov V. A., Coley A. M., Dolezal O., Hudson P. J., Batchelor A. H., et al. 2007. Structure of an IgNAR-AMA1 complex: targeting a conserved hydrophobic cleft broadens malarial strain recognition. Structure 15: 1452–1466.

Henry M.-C., Rogier C., Nzeyimana I., Assi S. B., Dossou-Yovo J., Audibert M., et al. 2003. Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Côte d'Ivoire. Trop Med Int Health 8: 449–458.

Herbert Opi D., Ochola L. B., Tendwa M., Siddondo B. R., Ocholla H., Fanjo H., et al. 2014. Mechanistic studies of the negative epistatic malaria-protective interaction between sickle cell trait and α+thalassemia. EBioMedicine 1: 29–36.

Hermsen C. C., Konijnenberg Y., Mulder L., Loé C., van Deuren M., van der Meer J. W. M., et al. 2003. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. Clin Exp Immunol 132: 467–472.

Hill A. V. S. 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. Nat Rev Immunol 6: 21–32.

Hill D. L., Eriksson E. M., Li Wai Suen C. S. N., Chiu C. Y., Ryg-Cornejo V., Robinson L. J., et al. 2013. Opsonising antibodies to P. falciparum merozoites associated with immunity to clinical malaria. PLoS One 8: e74627.

Hill D. L., Wilson D. W., Sampaio N. G., Eriksson E. M., Ryg-Cornejo V., Harrison G. L. A., et al. 2016. Merozoite antigens of Plasmodium falciparum elicit strain-transcending opsonizing immunity. Infect Immun 84: 2175–2184.

Hill N., Lenglet A., Arnéz A. M., Carneiro I. 2007. Plant based insect repellent and insecticide treated bed nets to protect against malaria in areas of early evening biting vectors: double blind randomised placebo controlled clinical trial in the Bolivian Amazon. BMJ 335: 1023.

Ho M., Sexton M. M., Tongtawe P., Looareesuwan S., Suntharasamai P., Webster H. K. 1995. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis 172: 838–844.

Hodder A. N., Crewther P. E., Matthew M. L., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Anders R. F. 1996. The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. J Biol Chem 271: 29446–29452.

Hoffman S. L., Doolan D. L., Sedegah M., Aguiar J. C., Wang R., Malik A., et al. 1997. Strategy for development of a pre-erythrocytic Plasmodium falciparum DNA vaccine for human use. Vaccine 15: 842–845.

Hoffman S. L., Goh L. M. L., Luke T. C., Schneider I., Le T. P., Doolan D. L., et al. 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. J Infect Dis 185: 1155–1164.

Hofmann N., Mwingira F., Shekalaghe S., Robinson L. J., Mueller I., Felger I. 2015. Ultra-sensitive detection of Plasmodium falciparum by amplification of multi-copy subtelomeric targets. PLoS Med 12: e1001788.

Hovius J. W., de Jong M. A. P., den Dunnen J., Litjens M., Fikrig E., van der Poll T., Gringhuis S. I., Geijtenbeek T. B. 2008a. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. e31.

Hovius J. W., Levi M., Fikrig E. 2008b. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. PLoS Med 5: e43.

Howes R. E., Reiner R. C., Battle K. E., Longbottom J., Mappin B., Ordanovich D., et al. 2015. Plasmodium vivax Transmission in Africa. PLoS Negl Trop Dis 9: e0004222.

Hviid L., Jakobsen P. H., Abu-Zeid Y. A., Theander T. G. 1992. T-cell responses in malaria. APMIS 100: 95–106.

Idris Z. M., Chan C. W., Mohammed M., Kalkoa M., Taleo G., Junker K., Arcà B., Drakeley C., Kaneko A. 2017. Serological measures to assess the efficacy of malaria control programme on Ambae Island, Vanuatu. Parasit Vectors 10: 204.

Ifeorah I. K., Brown B. J., Sodeinde O. O. 2017. A comparison of Rapid Diagnostique Testing (by Plasmodium lactate dehydrogenase), and quantitative buffy coat technique in malaria diagnosis in children. Afr J Infect Dis 11: 31–38.

Imwong M., Hanchana S., Malleret B., Rénia L., Day N. P. J., Dondorp A., Nosten F., Snounou G., White N. J. 2014. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. J Clin Microbiol 52: 3303–3309.

Ing R., Stevenson M. M. 2009. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. Infect Immun 77: 770–782.

Ippolito M. M., Johnson J., Mullin C., Mallow C., Morgan N., Wallender E., Li T., Rosenthal P. J. 2017. The relative effects of artemether-lumefantrine and non-artemisinin antimalarials on gametocyte carriage and transmission of Plasmodium falciparum: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 65: 486–494.

Isawa H., Orito Y., Iwanaga S., Jingushi N., Morita A., Chinzei Y., Yuda M. 2007. Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi. Insect Biochem Mol Biol 37: 466–477.

Issifou S., Mavoungou E., Borrmann S., Bouyou-Akotet M. K., Matsiegui P.-B., Kremsner P. G., Ntoumi F. 2003. Severe malarial anemia associated with increased soluble Fas ligand (sFasL) concentrations in Gabonese children. Eur Cytokine Netw 14: 238–241.

Iwagami M., Hwang S.-Y., Kim S.-H., Park S.-J., Lee G.-Y., Matsumoto-Takahashi E. L. A., Kho W.-G., Kano S. 2013. Microsatellite DNA analysis revealed a drastic genetic change of Plasmodium vivax population in the Republic of Korea during 2002 and 2003. PLoS Negl Trop Dis 7: e2522.

Jafarshad A., Dziegiel M. H., Lundquist R., Nielsen L. K., Singh S., Druilhe P. L. 2007. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcgammaRII and FcgammaRIII. J Immunol 178: 3099–3106.

Jeffery G. M. 1966. Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of Plasmodium. Bull World Health Organ 35: 873–882.

Jeffries C. L., Lawrence G. G., Golovko G., Kristan M., Orsborne J., Spence K., et al. 2018. Novel Wolbachia strains in Anopheles malaria vectors from Sub-Saharan Africa. Wellcome Open Res 3: 113.

Jepsen M. P. G., Jogdand P. S., Singh S. K., Esen M., Christiansen M., Issifou S., et al. 2013. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. The Journal of Infectious Diseases 208: 479–488.

Jones T. R., Obaldia N., Gramzinski R. A., Hoffman S. L. 2000. Repeated infection of Aotus monkeys with Plasmodium falciparum induces protection against subsequent challenge with homologous and heterologous strains of parasite. Am J Trop Med Hyg 62: 675–680.

Kaestli M., Cockburn I. A., Cortés A., Baea K., Rowe J. A., Beck H.-P. 2006. Virulence of malaria is associated with differential expression of Plasmodium falciparum var gene subgroups in a case-control study. J Infect Dis 193: 1567–1574.

Kafai N. M., Odom John A. R. 2018. Malaria in Children. Infect Dis Clin North Am 32: 189–200.

Kaiser M. L., Wood O. R., Damiens D., Brooke B. D., Koekemoer L. L., Munhenga G. 2021. Estimates of the population size and dispersal range of Anopheles arabiensis in Northern KwaZulu-Natal, South Africa: implications for a planned pilot programme to release sterile male mosquitoes. Parasit Vectors 14: 205.

Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D. 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. Science 290: 1351–1354.

Kaneko A., Chaves L. F., Taleo G., Kalkoa M., Isozumi R., Wickremasinghe R., et al. 2014. Characteristic age distribution of Plasmodium vivax infections after malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu. Infect Immun 82: 243–252.

Kangoye D. T., Mensah V. A., Murungi L. M., Nkumama I., Nebie I., Marsh K., et al. 2016. Dynamics and role of antibodies to Plasmodium falciparum merozoite antigens in children living in two settings with differing malaria transmission intensity. Vaccine 34: 160–166.

Kanoi B. N., Nagaoka H., Morita M., White M. T., Palacpac N. M. Q., Ntege E. H., et al. 2018. Comprehensive analysis of antibody responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. Vaccine 36: 6826–6833.

Kariuki S. N., Williams T. N. 2020. Human genetics and malaria resistance. Hum Genet 139: 801–811.

Kassim O. O., Ako-Anai K. A., Torimiro S. E., Hollowell G. P., Okoye V. C., Martin S. K. 2000. Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of Plasmodium falciparum malaria parasite. J Trop Pediatr 46: 92–96.

Kato K., Mayer D. C. G., Singh S., Reid M., Miller L. H. 2005. Domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5552–5557.

Kaur B. P., Secord E. 2019. Innate immunity. Pediatr. Clin. North Am. 66: 905–911.

Kaviratne M., Khan S. M., Jarra W., Preiser P. R. 2002. Small variant STEVOR antigen is uniquely located within maurer's clefts in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. Eukaryot Cell 1: 926–935.

Kebaier C., Voza T., Vanderberg J. 2010. Neither mosquito saliva nor immunity to saliva has a detectable effect on the infectivity of Plasmodium sporozoites injected into mice. Infect Immun 78: 545–551.

Kessler A., Dankwa S., Bernabeu M., Harawa V., Danziger S. A., Duffy F., et al. 2017. Linking EPCR-binding PfEMP1 to brain swelling in pediatric cerebral malaria. Cell Host Microbe 22: 601-614.e5.

Kicska G. A., Ting L.-M., Schramm V. L., Kim K. 2003. Effect of dietary p-aminobenzoic acid on murine Plasmodium yoelii infection. J Infect Dis 188: 1776–1781.

Kimani D., Jagne Y. J., Cox M., Kimani E., Bliss C. M., Gitau E., et al. 2014. Translating the immunogenicity of prime-boost immunization with ChAd63 and MVA ME-TRAP from malaria naive to malaria-endemic populations. Mol Ther 22: 1992–2003.

Kinde-Gazard D., Vignon Makong J., Kossou H. D., Sossa C. J. 2012. Évaluation de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide et du traitement préventif intermittent dans trois zones sanitaires au Bénin. Bull. Soc. Pathol. Exot. 105: 36–39.

King C. L., Davies D. H., Felgner P., Baum E., Jain A., Randall A., Tetteh K., Drakeley C. J., Greenhouse B. 2015. Biosignatures of exposure/transmission and immunity. Am J Trop Med Hyg 93: 16–27.

Kinyanjui S. M., Bull P., Newbold C. I., Marsh K. 2003. Kinetics of antibody responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocyte variant surface antigens. J Infect Dis 187: 667–674.

Kinyanjui S. M., Conway D. J., Lanar D. E., Marsh K. 2007. IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. Malar J 6: 82.

Knols B. G. J., Farenhorst M., Andriessen R., Snetselaar J., Suer R. A., Osinga A. J., et al. 2016. Eave tubes for malaria control in Africa: an introduction. Malar J 15: 404.

Kobayashi T., Jain A., Liang L., Obiero J. M., Hamapumbu H., Stevenson J. C., et al. 2019. Distinct antibody signatures associated with different malaria transmission intensities in zambia and zimbabwe. mSphere 4: e00061-19.

Kochareka M., Sarkar S., Dasgupta D., Aigal U. 2012. A preliminary comparative report of quantitative buffy coat and modified quantitative buffy coat with peripheral blood smear in malaria diagnosis. Pathog Glob Health 106: 335–339.

Kocharekar M. M., Sarkar S. S., Dasgupta D. 2014. Comparative Study of Modified Quantitative Buffy Coat and Two Rapid Tests in Comparison with Peripheral Blood Smear in Malaria Diagnosis in Mumbai, India. J Parasitol Res 2014: 194651.

Koffi A. A., Ahoua Alou L. P., Adja M. A., Chandre F., Pennetier C. 2013. Insecticide resistance status of Anopheles gambiae s.s population from M'Bé: a WHOPES-labelled experimental hut station, 10 years after the political crisis in Côte d'Ivoire. Malar J 12: 151.

Koita O. A., Doumbo O. K., Ouattara A., Tall L. K., Konaré A., Diakité M., et al. 2012. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. Am J Trop Med Hyg 86: 194–198.

Kojima S., Nagamine Y., Hayano M., Looareesuwan S., Nakanishi K. 2004. A potential role of interleukin 18 in severe falciparum malaria. Acta Trop 89: 279–284.

Korbel D. S., Newman K. C., Almeida C. R., Davis D. M., Riley E. M. 2005. Heterogeneous human NK cell responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol 175: 7466–7473.

Korbel D. S., Norman P. J., Newman K. C., Horowitz A., Gendzekhadze K., Parham P., Riley E. M. 2009. KIR genotype predicts the capacity of human KIR+ CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals. J Immunol 182: 6426–6434.

Koudou B. G., Adja A. M., Matthys B., Doumbia M., Cissé G., Koné M., Tanner M., Utzinger J. 2007. [Agricultural activities and malaria transmission in two eco-epidemiological settings in central Côte d'Ivoire]. Bull Soc Pathol Exot 100: 124–126.

Koudou B. G., Tano Y., Doumbia M., Nsanzabana C., Cissé G., Girardin O., et al. 2005. Malaria transmission dynamics in central Côte d'Ivoire: the influence of changing patterns of irrigated rice agriculture. Med Vet Entomol 19: 27–37.

Koudou B. G., Tano Y., Keiser J., Vounatsou P., Girardin O., Klero K., et al. 2009. Effect of agricultural activities on prevalence rates, and clinical and presumptive malaria episodes in central Côte d'Ivoire. Acta Trop 111: 268–274.

Kozycki C. T., Umulisa N., Rulisa S., Mwikarago E. I., Musabyimana J. P., Habimana J. P., Karema C., Krogstad D. J. 2017. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of Plasmodium falciparum isolates lacking hrp2 and declining malaria transmission. Malar J 16: 123.

Kpan M. D. S., Adja A. M., Guindo-Coulibaly N., Assouho K. F., Kouadio A. M. N., Azongnibo K. R. M., et al. 2021. Spatial Heterogeneity and Seasonal Distribution of Aedes (Stegomyia) aegypti (L) in Abidjan, Côte d'Ivoire. Vector Borne Zoonotic Dis.

Krishnamurty A. T., Thouvenel C. D., Portugal S., Keitany G. J., Kim K. S., Holder A., Crompton P. D., Rawlings D. J., Pepper M. 2016. Somatically hypermutated Plasmodium-specific IgM(+) memory B cells are rapid, plastic, early responders upon malaria rechallenge. Immunity 45: 402–414.

Krishnegowda G., Hajjar A. M., Zhu J., Douglass E. J., Uematsu S., Akira S., Woods A. S., Gowda D. C. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. J Biol Chem 280: 8606–8616.

Krzych U., Lyon J. A., Jareed T., Schneider I., Hollingdale M. R., Gordon D. M., Ballou W. R. 1995. T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated Plasmodium falciparum sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. J Immunol 155: 4072–4077.

Kumar R., Farzeen M., Hafeez A., Achakzai B. K., Vankwani M., Lal M., Iqbal R., Somrongthong R. 2020. Effectiveness of a health education intervention on the use of long-lasting insecticidal nets for the prevention of malaria in pregnant women of Pakistan: a quasi-experimental study. Malar J 19: 232.

Kumsiri R., Troye-Blomberg M., Pattanapanyasat K., Krudsood S., Maneerat Y. 2016. IgE low affinity receptor (CD23) expression, Plasmodium falciparum specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe falciparum malaria patients. Acta Trop 154: 25–33.

Kurtis J. D., Lanar D. E., Opollo M., Duffy P. E. 1999. Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to Plasmodium falciparum. Infect Immun 67: 3424–3429.

Kurup S. P., Butler N. S., Harty J. T. 2019. T cell-mediated immunity to malaria. Nat Rev Immunol 19: 457–471.

Kwiatkowski D. P. 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. Am J Hum Genet 77: 171–192.

Kwiatkowski D., Perlmann P. 1999. Inflammatory processes in the pathogenesis of malaria. Malaria: molecular and clinical aspects. Harwood Academic Publishers, pp. 329–362.

Kyes S. A., Rowe J. A., Kriek N., Newbold C. I. 1999. Rifins: A second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9333–9338.

Laurens M. B., Thera M. A., Coulibaly D., Ouattara A., Kone A. K., Guindo A. B., et al. 2013. Extended safety, immunogenicity and efficacy of a blood-stage malaria vaccine in malian children: 24-month follow-up of a randomized, double-blinded phase 2 trial. PLoS One 8: e79323.

Lavoipierre M. M. 1965. Feeding mechanism of blood-sucking arthropods. Nature 208: 302–303.

Lavstsen T., Salanti A., Jensen A. T. R., Arnot D. E., Theander T. G. 2003. Sub-grouping of Plasmodium falciparum 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. Malar J 2: 27.

Lavstsen T., Turner L., Saguti F., Magistrado P., Rask T. S., Jespersen J. S., et al. 2012. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. Proc Natl Acad Sci U S A 109: E1791-1800.

Le Coupanec A., Babin D., Fiette L., Jouvion G., Ave P., Misse D., Bouloy M., Choumet V. 2013. Aedes mosquito saliva modulates Rift Valley fever virus pathogenicity. PLoS Negl Trop Dis 7: e2237.

Leech J. H., Barnwell J. W., Miller L. H., Howard R. J. 1984. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Exp Med 159: 1567–1575.

Leitner W. W., Bergmann-Leitner E. S., Angov E. 2010. Comparison of Plasmodium berghei challenge models for the evaluation of pre-erythrocytic malaria vaccines and their effect on perceived vaccine efficacy. Malar J 9: 145.

Leitner W. W., Wali T., Costero-Saint Denis A. 2013. Is arthropod saliva the achilles' heel of vector-borne diseases? Front Immunol 4: 255.

Lestinova T., Vlkova M., Votypka J., Volf P., Rohousova I. 2015. Phlebotomus papatasi exposure cross-protects mice against Leishmania major co-inoculated with Phlebotomus duboscqi salivary gland homogenate. Acta Trop 144: 9–18.

Liu E. W., Skinner J., Tran T. M., Kumar K., Narum D. L., Jain A., et al. 2018. Protein-specific features associated with variability in human antibody responses to Plasmodium falciparum malaria antigens. Am J Trop Med Hyg 98: 57–66.

Lombardo F., Ronca R., Rizzo C., Mestres-Simòn M., Lanfrancotti A., Currà C., et al. 2009. The Anopheles gambiae salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role. Insect Biochem Mol Biol 39: 457–466.

Londono-Renteria B., Drame P. M., Weitzel T., Rosas R., Gripping C., Cardenas J. C., et al. 2015. An. gambiae gSG6-P1 evaluation as a proxy for human-vector contact in the Americas: a pilot study. Parasit Vectors 8: 533.

López C., Saravia C., Gomez A., Hoebeke J., Patarroyo M. A. 2010. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. Gene 467: 1–12.

Louis V. R., Schoeps A., Tiendrebéogo J., Beiersmann C., Yé M., Damiba M. R., et al. 2015. An insecticide-treated bed-net campaign and childhood malaria in Burkina Faso. Bull World Health Organ 93: 750–758.

Lulli P., Mangano V. D., Onori A., Batini C., Luoni G., Sirima B. S., et al. 2009. HLA-DRB1 and -DQB1 loci in three west African ethnic groups: genetic relationship with sub-Saharan African and European populations. Hum Immunol 70: 903–909.

Luty A. J., Lell B., Schmidt-Ott R., Lehman L. G., Luckner D., Greve B., et al. 1999. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children. J Infect Dis 179: 980–988.

Luzzatto L. 2015. G6PD deficiency: a polymorphism balanced by heterozygote advantage against malaria. Lancet Haematol 2: e400-401.

Lyke K. E., Wang A., Dabo A., Arama C., Daou M., Diarra I., Plowe C. V., Doumbo O. K., Sztein M. B. 2012. Antigen-specific B memory cell responses to Plasmodium falciparum malaria antigens and Schistosoma haematobium antigens in co-infected Malian children. PLoS One 7: e37868.

MacGillivray D. M., Kollmann T. R. 2014. The role of environmental factors in modulating immune responses in early life. Front Immunol 5: 434.

Mahdi Abdel Hamid M., Remarque E. J., van Duivenvoorde L. M., van der Werff N., Walraven V., Faber B. W., Kocken C. H. M., Thomas A. W. 2011. Vaccination with Plasmodium knowlesi AMA1 formulated in the novel adjuvant co-vaccine HT^{TM} protects against blood-stage challenge in rhesus macaques. PLoS One 6: e20547.

Maier A. G., Matuschewski K., Zhang M., Rug M. 2019. Plasmodium falciparum. Trends in Parasitology 35: 481–482.

Maketa V., Mavoko H. M., da Luz R. I., Zanga J., Lubiba J., Kalonji A., Lutumba P., Van Geertruyden J.-P. 2015. The relationship between Plasmodium infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar J 14: 83.

Makobongo M. O., Keegan B., Long C. A., Miller L. H. 2006. Immunization of Aotus monkeys with recombinant cysteine-rich interdomain region 1 alpha protects against severe disease during Plasmodium falciparum reinfection. J Infect Dis 193: 731–740.

Malafronte R. dos S., Calvo E., James A. A., Marinotti O. 2003. The major salivary gland antigens of Culex quinquefasciatus are D7-related proteins. Insect Biochem Mol Biol 33: 63–71.

Mamai W., Bimbile-Somda N. S., Maiga H., Juarez J. G., Muosa Z. A. I., Ali A. B., Lees R. S., Gilles J. R. L. 2017. Optimization of mosquito egg production under mass rearing setting: effects of cage volume, blood meal source and adult population density for the malaria vector, Anopheles arabiensis. Malar J 16: 41.

Mamai W., Lobb L. N., Bimbilé Somda N. S., Maiga H., Yamada H., Lees R. S., Bouyer J., Gilles J. R. L. 2018. Optimization of Mass-Rearing Methods for Anopheles arabiensis Larval Stages: Effects of Rearing Water Temperature and Larval Density on Mosquito Life-History Traits. J Econ Entomol 111: 2383–2390.

Mamo H., Esen M., Ajua A., Theisen M., Mordmüller B., Petros B. 2013. Humoral immune response to Plasmodium falciparum vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. Malar J 12: 51.

Mangano V. D., Kabore Y., Bougouma E. C., Verra F., Sepulveda N., Bisseye C., et al. 2015. Novel Insights Into the Protective Role of Hemoglobin S and C Against Plasmodium falciparum Parasitemia. J Infect Dis 212: 626–634.

Mangold K. A., Manson R. U., Koay E. S. C., Stephens L., Regner M., Thomson R. B., Peterson L. R., Kaul K. L. 2005. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. J Clin Microbiol 43: 2435–2440.

Manning J. E., Morens D. M., Kamhawi S., Valenzuela J. G., Memoli M. 2018. Mosquito saliva: the hope for a universal arbovirus vaccine? J Infect Dis 218: 7–15.

Manning J. E., Oliveira F., Coutinho-Abreu I. V., Herbert S., Meneses C., Kamhawi S., et al. 2020. Safety and immunogenicity of a mosquito saliva peptide-based vaccine: a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1 trial. Lancet 395: 1998–2007.

Marsh K., Kinyanjui S. 2006. Immune effector mechanisms in malaria. Parasite Immunol 28: 51–60.

Martineau A. R., Nhamoyebonde S., Oni T., Rangaka M. X., Marais S., Bangani N., et al. 2011. Reciprocal seasonal variation in vitamin D status and tuberculosis notifications in Cape Town, South Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 19013–19017.

Martin-Martin I., Paige A., Valenzuela Leon P. C., Gittis A. G., Kern O., Bonilla B., et al. 2020. ADP binding by the Culex quinquefasciatus mosquito D7 salivary protein enhances blood feeding on mammals. Nat Commun 11: 2911.

Mbanefo E. C., Ahmed A. M., Titouna A., Elmaraezy A., Trang N. T. H., Phuoc Long N., et al. 2017. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 7: 45963.

Mbow M. L., Bleyenberg J. A., Hall L. R., Titus R. G. 1998. Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major. J Immunol 161: 5571–5577.

McCall M. B. B., Sauerwein R. W. 2010. Interferon-γ--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. J Leukoc Biol 88: 1131–1143.

McCallum F. J., Persson K. E. M., Fowkes F. J. I., Reiling L., Mugyenyi C. K., Richards J. S., et al. 2017. Differing rates of antibody acquisition to merozoite antigens in malaria: implications for immunity and surveillance. J Leukoc Biol 101: 913–925.

McCracken M. K., Christofferson R. C., Chisenhall D. M., Mores C. N. 2014. Analysis of Early Dengue Virus Infection in Mice as Modulated by Aedes aegypti Probing. J Virol 88: 1881–1889.

Mejri N., Rutti B., Brossard M. 2002. Immunosuppressive effects of ixodes ricinus tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. Parasitol. Res. 88: 192–197.

Ménard R., Tavares J., Cockburn I., Markus M., Zavala F., Amino R. 2013. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. Nat Rev Microbiol 11: 701–712.

Menon J. N., Bretscher P. A. 1996. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to Leishmania major following exposure to low doses of L. major and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. Eur J Immunol 26: 243–249.

Mensah V. A., Gueye A., Ndiaye M., Edwards N. J., Wright D., Anagnostou N. A., et al. 2016. Safety, immunogenicity and efficacy of prime-boost vaccination with ChAd63 and MVA encoding ME-TRAP against Plasmodium falciparum infection in adults in Senegal. PLoS One 11: e0167951.

Mensah V. A., Roetynck S., Kanteh E. K., Bowyer G., Ndaw A., Oko F., et al. 2017. Safety and Immunogenicity of Malaria Vectored Vaccines Given with Routine Expanded Program on Immunization Vaccines in Gambian Infants and Neonates: A Randomized Controlled Trial. Front Immunol 8: 1551.

Menten-Dedoyart C., Couvreur B., Thellin O., Drion P. V., Herry M., Jolois O., Heinen E. 2008. Influence of the Ixodes ricinus tick blood-feeding on the antigen-specific antibody response in vivo. Vaccine 26: 6956–6964.

Meremikwu M. M., Donegan S., Sinclair D., Esu E., Oringanje C. 2012. Intermittent preventive treatment for malaria in children living in areas with seasonal transmission. Cochrane Database Syst Rev 2012: CD003756.

Migot F., Chougnet C., Raharimalala L., Astagneau P., Lepers J. P., Deloron P. 1993. Human immune responses to the Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. Am J Trop Med Hyg 48: 432–439.

Miller J. L., Sack B. K., Baldwin M., Vaughan A. M., Kappe S. H. I. 2014. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. Cell Rep 7: 436–447.

Miura K., Herrera R., Diouf A., Zhou H., Mu J., Hu Z., et al. 2013. Overcoming allelic specificity by immunization with five allelic forms of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. Infect Immun 81: 1491–1501.

Mizurini D. M., Francischetti I. M. B., Monteiro R. Q. 2013. Aegyptin inhibits collagen-induced coagulation activation in vitro and thromboembolism in vivo. Biochem Biophys Res Commun 436: 235–239.

Modiano D., Luoni G., Sirima B. S., Lanfrancotti A., Petrarca V., Cruciani F., et al. 2001. The lower susceptibility to Plasmodium falciparum malaria of Fulani of Burkina Faso (west Africa)

is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. Trans R Soc Trop Med Hyg 95: 149–152.

Mohamed T. M. 2006. Adenosine deaminase from camel tick Hyalomma dromedarii: purification and characterization. Experimental & applied acarology 40: 101–111.

Mohan K., Moulin P., Stevenson M. M. 1997. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. J Immunol 159: 4990–4998.

Moore S. E., Collinson A. C., Fulford A. J. C., Jalil F., Siegrist C.-A., Goldblatt D., Hanson L. A., Prentice A. M. 2006a. Effect of month of vaccine administration on antibody responses in The Gambia and Pakistan. Trop. Med. Int. Health 11: 1529–1541.

Moore S. E., Collinson A. C., Fulford A. J. C., Jalil F., Siegrist C.-A., Goldblatt D., Hanson L. A., Prentice A. M. 2006b. Effect of month of vaccine administration on antibody responses in The Gambia and Pakistan. Trop Med Int Health 11: 1529–1541.

Moorthy V. S., Newman R. D., Okwo-Bele J.-M. 2013. Malaria vaccine technology roadmap. The Lancet 382: 1700–1701.

Morassin B., Fabre R., Berry A., Magnaval J. F. 2002. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. Am J Trop Med Hyg 66: 503–508.

Mordmüller B., Surat G., Lagler H., Chakravarty S., Ishizuka A. S., Lalremruata A., et al. 2017. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. Nature 542: 445–449.

Mordmüller B., Szywon K., Greutelaers B., Esen M., Mewono L., Treut C., et al. 2010. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon. Vaccine 28: 6698–6703.

Moreno A., Joyner C. 2015. Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. Curr Opin Immunol 35: 98–106.

Moretto M. M., Weiss L. M., Combe C. L., Khan I. A. 2007. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection. J Immunol 179: 2485–2492.

Morris R. V., Shoemaker C. B., David J. R., Lanzaro G. C., Titus R. G. 2001a. Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against L. major infection. J Immunol 167: 5226–5230.

Morris R. V., Shoemaker C. B., David J. R., Lanzaro G. C., Titus R. G. 2001b. Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against L. major infection. J Immunol 167: 5226–5230.

Mosha J. F., Sturrock H. J. W., Greenhouse B., Greenwood B., Sutherland C. J., Gadalla N., et al. 2013. Epidemiology of subpatent Plasmodium falciparum infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. Malar J 12: 221.

Moss D. K., Remarque E. J., Faber B. W., Cavanagh D. R., Arnot D. E., Thomas A. W., Holder A. A. 2012. Plasmodium falciparum 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. Infect Immun 80: 1280–1287.

Mouchet J., Carnevale P. 1991. Les vecteurs et la transmission. Paludisme. Ellispes, pp. 34–59.

Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*.

de Moura T. R., Oliveira F., Novais F. O., Miranda J. C., Clarêncio J., Follador I., et al. 2007. Enhanced Leishmania braziliensis infection following pre-exposure to sandfly saliva. PLoS Negl Trop Dis 1: e84.

Moyes C. L., Henry A. J., Golding N., Huang Z., Singh B., Baird J. K., et al. 2014. Defining the geographical range of the Plasmodium knowlesi reservoir. PLoS Negl Trop Dis 8: e2780.

Muellenbeck M. F., Ueberheide B., Amulic B., Epp A., Fenyo D., Busse C. E., et al. 2013. Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. J Exp Med 210: 389–399.

Mueller A.-K., Labaied M., Kappe S. H. I., Matuschewski K. 2005. Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. Nature 433: 164–167.

Mueller I., Galinski M. R., Tsuboi T., Arevalo-Herrera M., Collins W. E., King C. L. 2013. Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. Adv Parasitol 81: 77–131.

Müller G. C., Beier J. C., Traore S. F., Toure M. B., Traore M. M., Bah S., Doumbia S., Schlein Y. 2010. Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa. Malar J 9: 210.

Müller O., Traoré C., Kouyaté B., Yé Y., Frey C., Coulibaly B., Becher H. 2006. Effects of insecticide-treated bednets during early infancy in an African area of intense malaria transmission: a randomized controlled trial. Bull World Health Organ 84: 120–126.

Munhenga G., Brooke B. D., Gilles J. R. L., Slabbert K., Kemp A., Dandalo L. C., et al. 2016. Mating competitiveness of sterile genetic sexing strain males (GAMA) under laboratory and semi-field conditions: Steps towards the use of the Sterile Insect Technique to control the major malaria vector Anopheles arabiensis in South Africa. Parasit Vectors 9: 122.

Murungi L. M., Kamuyu G., Lowe B., Bejon P., Theisen M., Kinyanjui S. M., Marsh K., Osier F. H. A. 2013. A threshold concentration of anti-merozoite antibodies is required for protection from clinical episodes of malaria. Vaccine 31: 3936–3942.

Nacher M. 2012. Helminth-infected patients with malaria: a low profile transmission hub? Malar J 11: 376.

Nagamine Y., Hayano M., Kashiwamura S., Okamura H., Nakanishi K., Krudsod S., Wilairatana P., Looareesuwan S., Kojima S. 2003. Involvement of interleukin-18 in severe Plasmodium falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 97: 236–241.

Namusoke F., Rasti N., Kironde F., Wahlgren M., Mirembe F. 2010. Malaria burden in pregnancy at mulago national referral hospital in kampala, Uganda. Malar Res Treat 2010: 913857.

Nazario S., Das S., de Silva A. M., Deponte K., Marcantonio N., Anderson J. F., Fish D., Fikrig E., Kantor F. S. 1998. Prevention of Borrelia burgdorferi transmission in guinea pigs by tick immunity. Am J Trop Med Hyg 58: 780–785.

Ndille E. E., Dubot-Pérès A., Doucoure S., Mouchet F., Cornelie S., Sidavong B., Fournet F., Remoue F. 2014. Human IgG antibody response to Aedes aegypti Nterm-34 kDa salivary peptide as an indicator to identify areas at high risk for dengue transmission: a retrospective study in urban settings of Vientiane city, Lao PDR. Trop Med Int Health 19: 576–580.

Ndo C., Yamada H., Damiens D. D., N'do S., Seballos G., Gilles J. R. L. 2014. X-ray sterilization of the An. arabiensis genetic sexing strain "ANO IPCL1" at pupal and adult stages. Acta Trop 131: 124–128.

Ndungu F. M., Lundblom K., Rono J., Illingworth J., Eriksson S., Färnert A. 2013. Long-lived Plasmodium falciparum specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. Eur J Immunol 43: 2919–2929.

Ndungu F. M., Marsh K., Fegan G., Wambua J., Nyangweso G., Ogada E., et al. 2015. Identifying children with excess malaria episodes after adjusting for variation in exposure: identification from a longitudinal study using statistical count models. BMC Med 13: 183.

Ndungu F. M., Olotu A., Mwacharo J., Nyonda M., Apfeld J., Mramba L. K., Fegan G. W., Bejon P., Marsh K. 2012. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 8247–8252.

Neafsey D. E., Juraska M., Bedford T., Benkeser D., Valim C., Griggs A., et al. 2015. Genetic diversity and protective efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine. N Engl J Med 373: 2025–2037.

Nebie I., Diarra A., Ouedraogo A., Soulama I., Bougouma E. C., Tiono A. B., et al. 2008. Humoral responses to Plasmodium falciparum blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, west Africa. Infect Immun 76: 759–766.

Newbold C. I. 1999. Antigenic variation in Plasmodium falciparum: mechanisms and consequences. Curr Opin Microbiol 2: 420–425.

Niang E. H. A., Bassene H., Fenollar F., Mediannikov O. 2018. Biological control of mosquito-borne diseases: the potential of Wolbachia-based interventions in an IVM framework. J Trop Med 2018: 1470459.

Nikolaeva D., Draper S. J., Biswas S. 2015. Toward the development of effective transmission-blocking vaccines for malaria. Expert Rev Vaccines 14: 653–680.

Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B. L., Socheat D., Fukuda M. M., Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. N Engl J Med 359: 2619–2620.

Nogaro S. I., Hafalla J. C., Walther B., Remarque E. J., Tetteh K. K. A., Conway D. J., Riley E. M., Walther M. 2011. The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to P. falciparum increases with age/exposure in an area of low transmission. PLoS One 6: e25582.

Noland G. S., Jansen P., Vulule J. M., Park G. S., Ondigo B. N., Kazura J. W., Moormann A. M., John C. C. 2015. Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to Plasmodium falciparum pre-erythrocytic and blood-stage antigens. Acta Trop. 142: 47–56.

Norsworthy N. B., Sun J., Elnaiem D., Lanzaro G., Soong L. 2004. Sand fly saliva enhances leishmania amazonensis infection by modulating interleukin-10 production. Infect Immun 72: 1240–1247.

Northrop J. K., Thomas R. M., Wells A. D., Shen H. 2006. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. J. Immunol. 177: 1062–1069.

Noukpo M. H., Damien G. B., Elanga-N'Dille E., Sagna A. B., Drame P. M., Chaffa E., et al. 2016. Operational assessment of long-lasting Insecticidal nets by using an anopheles salivary biomarker of human-vector contact. Am. J. Trop. Med. Hyg. 95: 1376–1382.

Nussler A., Pied S., Goma J., Rénia L., Miltgen F., Grau G. E., Mazier D. 1991. TNF inhibits malaria hepatic stages in vitro via synthesis of IL-6. Int Immunol 3: 317–321.

Nuttall P. A., Labuda M. 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. Parasitology 129 Suppl: S177-189.

Nyarango P. M., Gebremeskel T., Mebrahtu G., Mufunda J., Abdulmumini U., Ogbamariam A., et al. 2006. A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods. Malar J 5: 33.

Nzeyimana I., Henry M. C., Dossou-Yovo J., Doannio J. M. C., Diawara L., Carnevale P. 2002. [The epidemiology of malaria in the southwestern forests of the Ivory Coast (Tai region)]. Bull Soc Pathol Exot 95: 89–94.

Obaid A., Naz A., Ikram A., Awan F. M., Raza A., Ahmad J., Ali A. 2018. Model of the adaptive immune response system against HCV infection reveals potential immunomodulatory agents for combination therapy. Sci Rep 8: 8874.

Obiero J. M., Shekalaghe S., Hermsen C. C., Mpina M., Bijker E. M., Roestenberg M., et al. 2015. Impact of malaria preexposure on antiparasite cellular and humoral immune responses after controlled human malaria infection. Infect Immun 83: 2185–2196.

Ockenfels B., Michael E., McDowell M. A. 2014. Meta-analysis of the effects of insect vector saliva on host immune responses and infection of vector-transmitted pathogens: a focus on leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 8: e3197.

O'Donnell R. A., de Koning-Ward T. F., Burt R. A., Bockarie M., Reeder J. C., Cowman A. F., Crabb B. S. 2001. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. J Exp Med 193: 1403–1412.

Oeuvray C., Theisen M., Rogier C., Trape J. F., Jepsen S., Druilhe P. 2000. Cytophilic immunoglobulin responses to Plasmodium falciparum glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. Infect Immun 68: 2617–2620.

Ogutu B. R., Apollo O. J., McKinney D., Okoth W., Siangla J., Dubovsky F., et al. 2009. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. PLoS One 4: e4708.

Ogwang C., Kimani D., Edwards N. J., Roberts R., Mwacharo J., Bowyer G., et al. 2015. Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against Plasmodium falciparum infection in Kenyan adults. Sci Transl Med 7: 286re5.

Okumu F. 2017. The paradigm of eave tubes: scaling up house improvement and optimizing insecticide delivery against disease-transmitting mosquitoes. Malar J 16: 207.

Oliveira F., Lawyer P. G., Kamhawi S., Valenzuela J. G. 2008a. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. PLoS Negl Trop Dis 2: e226.

Oliveira F., Rowton E., Aslan H., Gomes R., Castrovinci P. A., Alvarenga P. H., et al. 2015. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. Sci Transl Med 7: 290ra90.

Oliveira G. A., Kumar K. A., Calvo-Calle J. M., Othoro C., Altszuler D., Nussenzweig V., Nardin E. H. 2008b. Class II-restricted protective immunity induced by malaria sporozoites. Infect Immun 76: 1200–1206.

Opasawatchai A., Yolwong W., Thuncharoen W., Inrueangsri N., Itsaradisaikul S., Sasisakulporn C., et al. 2020. Novel salivary gland allergens from tropical mosquito species and IgE reactivity in allergic patients. World Allergy Organ J 13: 100099.

Orlandi-Pradines E., Almeras L., Denis de Senneville L., Barbe S., Remoué F., Villard C., et al. 2007. Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa. Microbes Infect 9: 1454–1462.

Osier F. H., Feng G., Boyle M. J., Langer C., Zhou J., Richards J. S., et al. 2014. Opsonic phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. BMC Medicine 12.

Ouattara A., Barry A. E., Dutta S., Remarque E. J., Beeson J. G., Plowe C. V. 2015. Designing malaria vaccines to circumvent antigen variability. Vaccine 33: 7506–7512.

Ouattara A., Mu J., Takala-Harrison S., Saye R., Sagara I., Dicko A., et al. 2010. Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine. Malar J 9: 175.

Oumbouke W. A., Tia I. Z., Barreaux A. M. G., Koffi A. A., Sternberg E. D., Thomas M. B., N'Guessan R. 2018. Screening and field performance of powder-formulated insecticides on eave tube inserts against pyrethroid resistant Anopheles gambiae s.l.: an investigation into "actives" prior to a randomized controlled trial in Côte d'Ivoire. Malar J 17: 374.

Palosuo K., Brummer-Korvenkontio H., Mikkola J., Sahi T., Reunala T. 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to Aedes mosquito bites. Int Arch Allergy Immunol 114: 367–372.

Papathanos P. A., Bourtzis K., Tripet F., Bossin H., Virginio J. F., Capurro M. L., et al. 2018. A perspective on the need and current status of efficient sex separation methods for mosquito genetic control. Parasit Vectors 11: 654.

Peng Z., Estelle F., Simons R. 2007. Mosquito allergy and mosquito salivary allergens. Protein Pept Lett 14: 975–981.

Peng Z., Ho M. K., Li C., Simons F. E. R. 2004b. Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children. Ann Allergy Asthma Immunol 93: 553–556.

Peng Z., Li H., Simons F. E. 1996a. Immunoblot analysis of IgE and IgG binding antigens in extracts of mosquitos Aedes vexans, Culex tarsalis and Culiseta inornata. Int Arch Allergy Immunol 110: 46–51.

Peng Z., Rasic N., Liu Y., Simons F. E. R. 2002. Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. J Allergy Clin Immunol 110: 816–817.

Peng Z., Simons F. E. R. 2004. Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. Int Arch Allergy Immunol 133: 198–209.

Peng Z., Yang M., Simons F. E. 1996b. Immunologic mechanisms in mosquito allergy: correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. Ann Allergy Asthma Immunol 77: 238–244.

Pennetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S., Dabiré R. K., Lapied B., Chandre F., Hougard J.-M. 2008. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. Emerg Infect Dis 14: 1707–1714.

Perkins D. J., Kremsner P. G., Schmid D., Misukonis M. A., Kelly M. A., Weinberg J. B. 1999. Blood mononuclear cell nitric oxide production and plasma cytokine levels in healthy gabonese children with prior mild or severe malaria. Infect Immun 67: 4977–4981.

Perkmann T., Winkler H., Graninger W., Kremsner P. G., Winkler S. 2005. Circulating levels of the interleukin (IL)-4 receptor and of IL-18 in patients with Plasmodium falciparum malaria. Cytokine 29: 153–158.

Perlmann P., Troye-Blomberg M. 2000. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. Folia Biol (Praha) 46: 210–218.

Perraut R., Guillotte M., Drame I., Diouf B., Molez J.-F., Tall A., et al. 2002. Evaluation of anti-Plasmodium falciparum antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. Microbes Infect. 4: 31–35.

Perraut R., Mercereau-Puijalon O., Diouf B., Tall A., Guillotte M., Le Scanf C., Trape J. F., Spiegel A., Garraud O. 2000. Seasonal fluctuation of antibody levels to Plasmodium falciparum parasitized red blood cell-associated antigens in two Senegalese villages with different transmission conditions. Am J Trop Med Hyg 62: 746–751.

Pham N. M., Karlen W., Beck H.-P., Delamarche E. 2018. Malaria and the 'last' parasite: how can technology help? Malar J 17.

Pichyangkul S., Yongvanitchit K., Kum-arb U., Hemmi H., Akira S., Krieg A. M., et al. 2004. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. J Immunol 172: 4926–4933.

Pingen M., Bryden S. R., Pondeville E., Schnettler E., Kohl A., Merits A., Fazakerley J. K., Graham G. J., McKimmie C. S. 2016. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. Immunity 44: 1455–1469.

Pingen M., Schmid M. A., Harris E., McKimmie C. S. 2017. Mosquito biting modulates skin response to virus infection. Trends in Parasitology 33: 645–657.

Pinto M. J., Rodrigues S. R., Desouza R., Verenkar M. P. 2001. Usefulness of quantitative buffy coat blood parasite detection system in diagnosis of malaria. Indian J Med Microbiol 19: 219–221.

PNLP. 2018. Programme National de Lutte contre le Paludisme. Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2012-2015 révisé. 84p.

Poinsignon A., Cornelie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., et al. 2008a. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. PLoS One 3: e2472.

Poinsignon A., Remoue F., Rossignol M., Cornelie S., Courtin D., Grébaut P., Garcia A., Simondon F. 2008b. Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78: 750–753.

Polley S. D., Mwangi T., Kocken C. H. M., Thomas A. W., Dutta S., Lanar D. E., et al. 2004. Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. Vaccine 23: 718–728.

Pollock T., Leitao R., Galan-Rodriguez C., Wong K. A., Rodriguez A. 2011. Daily Plasmodium yoelii infective mosquito bites do not generate protection or suppress previous immunity against the liver stage. Malar J 10: 97.

Porcherie A., Mathieu C., Peronet R., Schneider E., Claver J., Commere P.-H., et al. 2011. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. J Exp Med 208: 2225–2236.

Prinz H., Sattler J. M., Roth A., Ripp J., Adams J. H., Frischknecht F. 2018. Immunization efficacy of cryopreserved genetically attenuated Plasmodium berghei sporozoites. Parasitol Res 117: 2487–2497.

Proietti C., Verra F., Bretscher M. T., Stone W., Kanoi B. N., Balikagala B., et al. 2013. Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda. Parasite Immunol. 35: 164–173.

Protopopoff N., Van Bortel W., Marcotty T., Van Herp M., Maes P., Baza D., D'Alessandro U., Coosemans M. 2007. Spatial targeted vector control in the highlands of Burundi and its impact on malaria transmission. Malar J 6: 158.

Reagan K. L., Machain-Williams C., Wang T., Blair C. D. 2012. Immunization of mice with recombinant mosquito salivary protein D7 enhances mortality from subsequent West Nile virus infection via mosquito bite. PLoS Negl Trop Dis 6: e1935.

Remoue F., Alix E., Cornelie S., Sokhna C., Cisse B., Doucoure S., Mouchet F., Boulanger D., Simondon F. 2007. IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. Acta Trop. 104: 108–115.

Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J.-P., Boulanger D., Simondon F. 2006. Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100: 363–370.

Remoue Franck., Cornelie S., Ngom A., Boulanger D., Simondon F. 2005. *Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases*. Transworld research Network.

Reunala T., Brummer-Korvenkontio H., Palosuo K., Miyanij M., Ruiz-Maldonado R., Löve A., François G., Palosuo T. 1994. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of Aedes communis and Aedes aegypti mosquitoes in children. Int Arch Allergy Immunol 104: 366–371.

Ribeiro J. M. 1995. *Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis 4*.

Ribeiro J. M. C., Arcà B., Lombardo F., Calvo E., Phan V. M., Chandra P. K., Wikel S. K. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti. BMC Genomics 8: 6.

Ribeiro J. M. C., Charlab R., Pham V. M., Garfield M., Valenzuela J. G. 2004. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito Culex pipiens quinquefasciatus. Insect Biochem Mol Biol. 34: 543–563.

Ribeiro J. M. C., Francischetti I. M. B. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu Rev Entomol 48: 73–88.

Ribeiro J. M. C., Martin-Martin I., Arcà B., Calvo E. 2016. A Deep Insight into the Sialome of Male and Female Aedes aegypti Mosquitoes. PLoS One 11: e0151400.

Ribeiro J. M. C., Martin-Martin I., Moreira F. R., Bernard K. A., Calvo E. 2018. A deep insight into the male and female sialotranscriptome of adult Culex tarsalis mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 95: 1–9.

Ribeiro J. M., Nussenzveig R. H. 1993. The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito Anopheles albimanus. J Exp Biol 179: 273–287.

Ribeiro J. M., Vachereau A., Modi G. B., Tesh R. B. 1989. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. Science 243: 212–214.

Richard D., MacRaild C. A., Riglar D. T., Chan J.-A., Foley M., Baum J., Ralph S. A., Norton R. S., Cowman A. F. 2010. Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. J Biol Chem 285: 14815–14822.

Richards J. S., Beeson J. G. 2009. The future for blood-stage vaccines against malaria. Immunol Cell Biol 87: 377–390.

Rizzo C., Lombardo F., Ronca R., Mangano V., Sirima S. B., Nèbiè I., Fiorentino G., Modiano D., Arcà B. 2014a. Differential antibody response to the Anopheles gambiae gSG6 and cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors. Parasit Vectors 7: 549.

Rizzo C., Ronca R., Fiorentino G., Mangano V. D., Sirima S. B., Nèbiè I., Petrarca V., Modiano D., Arcà B. 2011a. Wide cross-reactivity between Anopheles gambiae and Anopheles funestus SG6 salivary proteins supports exploitation of gSG6 as a marker of human exposure to major malaria vectors in tropical Africa. Malar J 10: 206.

Rizzo C., Ronca R., Fiorentino G., Verra F., Mangano V., Poinsignon A., et al. 2011b. Humoral response to the Anopheles gambiae salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors. PLoS One 6: e17980.

Rizzo C., Ronca R., Lombardo F., Mangano V., Sirima S. B., Nèbiè I., et al. 2014b. IgG1 and IgG4 antibody responses to the Anopheles gambiae salivary protein gSG6 in the sympatric ethnic groups Mossi and Fulani in a malaria hyperhendemic area of Burkina Faso. PLoS One 9.

Roberts D. J., Craig A. G., Berendt A. R., Pinches R., Nash G., Marsh K., Newbold C. I. 1992. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. Nature 357: 689–692.

Rocha A. C. V. M. da, Braga E. M., Araújo M. S. S., Franklin B. S., Pimenta P. F. P. 2004. Effect of the Aedes fluviatilis saliva on the development of Plasmodium gallinaceum infection in Gallus (gallus) domesticus. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 709–715.

Roestenberg M., McCall M., Hopman J., Wiersma J., Luty A. J. F., van Gemert G. J., et al. 2009. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. N Engl J Med 361: 468–477.

Roestenberg M., Teirlinck A. C., McCall M. B. B., Teelen K., Makamdop K. N., Wiersma J., et al. 2011. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. Lancet 377: 1770–1776.

Roestenberg M., Walk J., van der Boor S. C., Langenberg M. C. C., Hoogerwerf M.-A., Janse J. J., et al. 2020. A double-blind, placebo-controlled phase 1/2a trial of the genetically attenuated malaria vaccine PfSPZ-GA1. Sci Transl Med 12: eaaz5629.

Rogers M. E., Chance M. L., Bates P. A. 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. Parasitology 124: 495–507.

Rohoušová I., Hostomská J., Vlková M., Kobets T., Lipoldová M., Volf P. 2011. The protective effect against Leishmania infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. Int J Parasitol 41: 481–485.

Roland J., Soulard V., Sellier C., Drapier A.-M., Di Santo J. P., Cazenave P.-A., Pied S. 2006. NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. J Immunol 177: 1229–1239.

Rono J., Osier F. H. A., Olsson D., Montgomery S., Mhoja L., Rooth I., Marsh K., Färnert A. 2013. Breadth of anti-merozoite antibody responses is associated with the genetic diversity of asymptomatic Plasmodium falciparum infections and protection against clinical malaria. Clin Infect Dis 57: 1409–1416.

Rossati A., Bargiacchi O., Kroumova V., Zaramella M., Caputo A., Garavelli P. L. 2016. Climate, environment and transmission of malaria. Infez Med 24: 93–104.

Rottmann M., Lavstsen T., Mugasa J. P., Kaestli M., Jensen A. T. R., Müller D., Theander T., Beck H.-P. 2006. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by Plasmodium falciparum infection in Tanzanian children. Infect Immun 74: 3904–3911.

Rougemont M., Van Saanen M., Sahli R., Hinrikson H. P., Bille J., Jaton K. 2004. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol 42: 5636–5643.

Roussilhon C., Oeuvray C., Müller-Graf C., Tall A., Rogier C., Trape J.-F., et al. 2007. Long-Term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. PLoS Med 4: e320.

RTS,S Clinical Trials Partnership. 2015. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. Lancet 386: 31–45.

Rutledge G. G., Böhme U., Sanders M., Reid A. J., Cotton J. A., Maiga-Ascofare O., et al. 2017. Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution. Nature 542: 101–104.

Ryg-Cornejo V., Nie C. Q., Bernard N. J., Lundie R. J., Evans K. J., Crabb B. S., Schofield L., Hansen D. S. 2013. NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation

for the induction of inflammatory responses during Plasmodium berghei ANKA infection. Immunobiology 218: 263–271.

Sabchareon A., Burnouf T., Ouattara D., Attanath P., Bouharoun-Tayoun H., Chantavanich P., Foucault C., Chongsuphajaisiddhi T., Druilhe P. 1991. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 45: 297–308.

Sagara I., Healy S. A., Assadou M. H., Gabriel E. E., Kone M., Sissoko K., et al. 2018. Safety and immunogenicity of Pfs25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against Plasmodium falciparum: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults. Lancet Infect Dis 18: 969–982.

Sagna A. B., Gaayeb L., Sarr J. B., Senghor S., Poinsignon A., Boutouaba-Combe S., et al. 2013a. Plasmodium falciparum infection during dry season: IgG responses to Anopheles gambiae salivary gSG6-P1 peptide as sensitive biomarker for malaria risk in Northern Senegal. Malar. J. 12: 301.

Sagna A. B., Kassié D., Couvray A., Adja A. M., Hermann E., Riveau G., Salem G., Fournet F., Remoue F. 2019. Spatial Assessment of Contact Between Humans and Anopheles and Aedes Mosquitoes in a Medium-Sized African Urban Setting, Using Salivary Antibody–Based Biomarkers. The Journal of Infectious Diseases 220: 1199–1208.

Sagna A. B., Sarr J. B., Gaayeb L., Drame P. M., Ndiath M. O., Senghor S., et al. 2013b. gSG6-P1 salivary biomarker discriminates micro-geographical heterogeneity of human exposure to Anopheles bites in low and seasonal malaria areas. Parasit Vectors 6: 68.

Sagna A. B., Yobo M. C., Elanga Ndille E., Remoue F. 2018. New immuno-epidemiological biomarker of human exposure to Aedes vector Bites: from concept to applications. Trop Med Infect Dis 3.

Salmani M. P., Preeti B. M., Peerapur B. V. 2011. Comparative study of peripheral blood smear and quantitative buffy coat in malaria diagnosis. J Commun Dis 43: 57–59.

Sá-Nunes A., Bafica A., Lucas D. A., Conrads T. P., T.D. T. D., Andersen J. F., Mather T. N., Ribeiro J. M., Francischetti I. M. 2007. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in Ixodes scapularis saliva. J Immunol 179: 1497–1505.

Sarr J. B., Remoue F., Samb B., Dia I., Guindo S., Sow C., et al. 2007. Evaluation of antibody response to Plasmodium falciparum in children according to exposure of Anopheles gambiae s.l or Anopheles funestus vectors. Malar J 6: 117.

Sarr J. B., Samb B., Sagna A. B., Fortin S., Doucoure S., Sow C., et al. 2012. Differential acquisition of human antibody responses to Plasmodium falciparum according to intensity of exposure to Anopheles bites. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106: 460–467.

Schmid M. A., Glasner D. R., Shah S., Michlmayr D., Kramer L. D., Harris E. 2016. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. PLoS Pathog 12: e1005676.

Schneider B. S., Higgs S. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102: 400–408.

Schneider B. S., Mathieu C., Peronet R., Mécheri S. 2011. Anopheles stephensi saliva enhances progression of cerebral malaria in a murine model. Vector Borne Zoonotic Dis. 11: 423–432.

Schneider B. S., McGee C. E., Jordan J. M., Stevenson H. L., Soong L., Higgs S. 2007. Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection. PLoS One 2: e1171.

Schneider B. S., Soong L., Zeidner N. S., Higgs S. 2004. Aedes aegypti salivary gland extract modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. Viral Immunol 17. pp. 565–573.

Schwarz A., Juarez J. A., Richards J., Rath B., Machaca V. Q., Castro Y. E., et al. 2011. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. Int J Parasitol 41: 591–594.

Schwarz A., Sternberg J. M., Johnston V., Medrano-Mercado N., Anderson J. M., Hume J. C. C., Valenzuela J. G., Schaub G. A., Billingsley P. F. 2009. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of Triatomainfestans as biomarkers for low-level infestation of triatomines. Int J Parasitol 39: 1021–1029.

Scorza T., Magez S., Brys L., De Baetselier P. 1999. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. Parasite Immunol 21: 545–554.

Scragg I. G., Hensmann M., Bate C. A., Kwiatkowski D. 1999. Early cytokine induction by Plasmodium falciparum is not a classical endotoxin-like process. Eur J Immunol 29: 2636–2644.

Sebastian S., Gilbert S. C. 2016. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based malaria vaccines. Expert Rev Vaccines 15: 91–103.

Seder R. A., Chang L.-J., Enama M. E., Zephir K. L., Sarwar U. N., Gordon I. J., et al. 2013. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. Science 341: 1359–1365.

von Seidlein L., Olaosebikan R., Hendriksen I. C. E., Lee S. J., Adedoyin O. T., Agbenyega T., et al. 2012. Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in african children: findings from a large randomized trial. Clin Infect Dis 54: 1080–1090.

Shaw W. R., Marcenac P., Childs L. M., Buckee C. O., Baldini F., Sawadogo S. P., Dabiré R. K., Diabaté A., Catteruccia F. 2016. Wolbachia infections in natural Anopheles populations affect egg laying and negatively correlate with Plasmodium development. Nat Commun 7: 11772.

Shimp R. L., Rowe C., Reiter K., Chen B., Nguyen V., Aebig J., et al. 2013. Development of a Pfs25-EPA malaria transmission blocking vaccine as a chemically conjugated nanoparticle. Vaccine 31: 2954–2962.

Singh B., Daneshvar C. 2013. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. Clin Microbiol Rev 26: 165–184.

Singh K., Mehta S. 2016. The clinical development process for a novel preventive vaccine: An overview. J Postgrad Med 62: 4–11.

Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., et al. 2012. A global map of dominant malaria vectors. Parasit Vectors 5: 69.

Sirima S. B., Cousens S., Druilhe P. 2011. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. N Engl J Med 365: 1062–1064.

Sirima S. B., Durier C., Kara L., Houard S., Gansane A., Loulergue P., et al. 2017. Safety and immunogenicity of a recombinant Plasmodium falciparum AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. Vaccine 35: 6218–6227.

Sirima S. B., Mordmüller B., Milligan P., Ngoa U. A., Kironde F., Atuguba F., et al. 2016. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. Vaccine 34: 4536–4542.

Sirima S. B., Tiono A. B., Ouédraogo A., Diarra A., Ouédraogo A. L., Yaro J. B., et al. 2009. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. PLoS One 4: e7549.

Sissoko M. S., Healy S. A., Katile A., Omaswa F., Zaidi I., Gabriel E. E., et al. 2017. Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against Plasmodium falciparum via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. The Lancet Infectious Diseases 17: 498–509.

Skallova A., Iezzi G., Ampenberger F., Kopf M., Kopecky J. 2008. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. J Immunol 180: 6186–6192.

Sleijffers A., Garssen J., de Gruijl F. R., Boland G. J., van Hattum J., van Vloten W. A., van Loveren H. 2001. Influence of ultraviolet B exposure on immune responses following hepatitis B vaccination in human volunteers. J Invest Dermatol 117: 1144–1150.

Smith D. L., Dushoff j., McKenzie F. L. 2004. *The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment. PLoS Biol 2*.

Smith J. D., Chitnis C. E., Craig A. G., Roberts D. J., Hudson-Taylor D. E., Peterson D. S., Pinches R., Newbold C. I., Miller L. H. 1995. Switches in Expression of Plasmodium falciparum var Genes Correlate with Changes in Antigenic and Cytoadherent Phenotypes of Infected Erythrocytes. Cell 82: 101–110.

Snetselaar J., Njiru B. N., Gachie B., Owigo P., Andriessen R., Glunt K., et al. 2017. Eave tubes for malaria control in Africa: prototyping and evaluation against Anopheles gambiae s.s. and Anopheles arabiensis under semi-field conditions in western Kenya. Malar J 16: 276.

Soe S., Theisen M., Roussilhon C., Aye K.-S., Druilhe P. 2004. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. Infect Immun 72: 247–252.

Speers D. J., Ryan S., Harnett G., Chidlow G. 2003. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. Intern Med J 33: 613–615.

Spitzen J., Koelewijn T., Mukabana W. R., Takken W. 2016. Visualization of house-entry behaviour of malaria mosquitoes. Malar J 15: 233.

Sponaas A.-M., Cadman E. T., Voisine C., Harrison V., Boonstra A., O'Garra A., Langhorne J. 2006. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. J Exp Med 203: 1427–1433.

Spring M., Murphy J., Nielsen R., Dowler M., Bennett J. W., Zarling S., et al. 2013. First-in-human evaluation of genetically attenuated Plasmodium falciparum sporozoites administered by bite of Anopheles mosquitoes to adult volunteers. Vaccine 31: 4975–4983.

Stanisic D. I., Fowkes F. J. I., Koinari M., Javati S., Lin E., Kiniboro B., et al. 2015. Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. Infect. Immun. 83: 646–660.

Stanisic D. I., Richards J. S., McCallum F. J., Michon P., King C. L., Schoepflin S., et al. 2009. Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. Infect. Immun. 77: 1165–1174.

Steere A. C., Sikand V. K., Meurice F., Parenti D. L., Fikrig E., Schoen R. T., et al. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant Borrelia burgdorferi outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med 339: 209–215.

Stephens R., Culleton R. L., Lamb T. J. 2012. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. Trends Parasitol 28: 73–82.

Stephens R., Langhorne J. 2006. Priming of CD4+ T cells and development of CD4+ T cell memory; lessons for malaria. Parasite Immunol 28.

Stephens R., Langhorne J. 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. PLoS Pathog 6: e1001208.

Sternberg E. D., Ng'habi K. R., Lyimo I. N., Kessy S. T., Farenhorst M., Thomas M. B., Knols B. G. J., Mnyone L. L. 2016. Eave tubes for malaria control in Africa: initial development and semi-field evaluations in Tanzania. Malar J 15: 447.

Stevenson M. M., Riley E. M. 2004. Innate immunity to malaria. Nature Reviews Immunology 4: 169–180.

Stowers A. W., Kennedy M. C., Keegan B. P., Saul A., Long C. A., Miller L. H. 2002. Vaccination of monkeys with recombinant Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. Infect Immun 70: 6961–6967.

Styer L. M., Lim P.-Y., Louie K. L., Albright R. G., Kramer L. D., Bernard K. A. 2011. Mosquito saliva causes enhancement of west nile virus infection in mice. J Virol 85: 1517–1527.

Su X. Z., Heatwole V. M., Wertheimer S. P., Guinet F., Herrfeldt J. A., Peterson D. S., Ravetch J. A., Wellems T. E. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Cell 82: 89–100.

Surasombatpattana P., Ekchariyawat P., Hamel R., Patramool S., Thongrungkiat S., Denizot M., et al. 2014. Aedes aegypti saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. J Invest Dermatol 134: 281–284.

Surasombatpattana P., Patramool S., Luplertlop N., Yssel H., Missé D. 2012. Aedes aegypti saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses. J Invest Dermatol 132: 2103–2105.

Sutherland C. J. 2016. Persistent parasitism: the adaptive biology of malariae and ovale Malaria. Trends Parasitol 32: 808–819.

Sutherland C. J., Drakeley C. J., Schellenberg D. 2007. How is childhood development of immunity to Plasmodium falciparum enhanced by certain antimalarial interventions? Malar J 6: 161.

Sutton P. L., Luo Z., Divis P. C. S., Friedrich V. K., Conway D. J., Singh B., Barnwell J. W., Carlton J. M., Sullivan S. A. 2016. Characterizing the genetic diversity of the monkey malaria parasite Plasmodium cynomolgi. Infect Genet Evol 40: 243–252.

Sypniewska P., Duda J. F., Locatelli I., Althaus C. R., Althaus F., Genton B. 2017. Clinical and laboratory predictors of death in African children with features of severe malaria: a systematic review and meta-analysis. BMC Med 15: 147.

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.

Takken W., Knols B. G. J. 2009. Malaria vector control: current and future strategies. Trends Parasitol 25: 101–104.

Talman A. M., Clain J., Duval R., Ménard R., Ariey F. 2019. Artemisinin bioactivity and resistance in malaria parasites. Trends Parasitol 35: 953–963.

Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S. 2009. Malaria diagnosis: a brief review. Korean J Parasitol 47: 93–102.

Taylor-Robinson A. W., Smith E. C. 1999. A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. Immunol Rev 171: 105–123.

Teirlinck A. C., McCall M. B. B., Roestenberg M., Scholzen A., Woestenenk R., de Mast Q., et al. 2011. Longevity and composition of cellular immune responses following experimental Plasmodium falciparum malaria infection in humans. PLoS Pathog 7: e1002389.

Teo A., Feng G., Brown G. V., Beeson J. G., Rogerson S. J. 2016. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. Trends Parasitol 32: 887–898.

Terheggen U., Drew D. R., Hodder A. N., Cross N. J., Mugyenyi C. K., Barry A. E., et al. 2014. Limited antigenic diversity of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 supports the development of effective multi-allele vaccines. BMC Med 12: 183.

Termorshuizen F., Garssen J., Norval M., Koulu L., Laihia J., Leino L., et al. 2002. A review of studies on the effects of ultraviolet irradiation on the resistance to infections: evidence from rodent infection models and verification by experimental and observational human studies. Int Immunopharmacol 2: 263–275.

Thangamani S., Higgs S., Ziegler S., Vanlandingham D., Tesh R., Wikel S. 2010. Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. PLoS One 5: e12137.

Theisen M., Soe S., Brunstedt K., Follmann F., Bredmose L., Israelsen H., Madsen S. M., Druilhe P. 2004. A Plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in Lactococcus lactis, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. Vaccine 22: 1188–1198.

Theisen M., Soe S., Jessing S. G., Okkels L. M., Danielsen S., Oeuvray C., Druilhe P., Jepsen S. 2000. Identification of a major B-cell epitope of the Plasmodium falciparum glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. Vaccine 19: 204–212.

Theisen M., Soe S., Oeuvray C., Thomas A. W., Vuust J., Danielsen S., Jepsen S., Druilhe P. 1998. The glutamate-rich protein (GLURP) of Plasmodium falciparum is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. Infect Immun 66: 11–17.

Theodos M. C., Titus R. G. 1993. Salivary gland material from the sand fly Lutzomyia longipalpis has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. Parasite Immunol 15: 481–487.

Thera M. A., Doumbo O. K., Coulibaly D., Laurens M. B., Ouattara A., Kone A. K., et al. 2011. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. N Engl J Med 365: 1004–1013.

Thiakaki M., Rohousova I., Volfova V., Volf P., Chang K.-P., Soteriadou K. 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in Leishmania amazonensis-BALB/c mouse model. Microbes Infect 7: 760–766.

Tiendrebeogo R. W., Adu B., Singh S. K., Dziegiel M. H., Nébié I., Sirima S. B., Christiansen M., Dodoo D., Theisen M. 2015. Antibody-dependent cellular inhibition is associated with reduced risk against febrile malaria in a longitudinal cohort study involving ghanaian children. Open Forum Infect Dis 2.

Titus R. G., Bishop J. V., Mejia J. S. 2006a. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol. 28: 131–141.

Titus R. G., Bishop J. V., Mejia J. S. 2006b. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol 0: 060222011842002.

Titus R. G., Ribeiro J. M. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. Science 239: 1306–1308.

Tizifa T. A., Kabaghe A. N., McCann R. S., van den Berg H., Van Vugt M., Phiri K. S. 2018. Prevention efforts for malaria. Curr Trop Med Rep 5: 41–50.

Tonkin M. L., Roques M., Lamarque M. H., Pugnière M., Douguet D., Crawford J., Lebrun M., Boulanger M. J. 2011. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. Science 333: 463–467.

della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V., Coluzzi M. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within Anopheles gambiae s.s. in West Africa. Insect Mol Biol 10: 9–18.

Toure O. A., Landry T. N., Assi S. B., Kone A. A., Gbessi E. A., Ako B. A., et al. 2018. Malaria parasite clearance from patients following artemisinin-based combination therapy in Côte d'Ivoire. Infect Drug Resist 11: 2031–2038.

Traoré D. F., Sagna A. B., Adja A. M., Zoh D. D., Adou K. A., Lingué K. N., et al. 2019. Exploring the heterogeneity of human exposure to malaria vectors in an urban setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, using an immuno-epidemiological biomarker. Malar J 18: 68.

Traoré D. F., Sagna A. B., Adja A. M., Zoh D. D., Lingué K. N., Coulibaly I., et al. 2018. Evaluation of malaria urban risk using an immuno-epidemiological biomarker of human exposure to Anopheles bites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 98: 1353–1359.

Troye-Blomberg M., Arama C., Quin J., Bujila I., Östlund Farrants A. 2020. What will studies of Fulani individuals naturally exposed to malaria teach us about protective immunity to malaria? Scand J Immunol 92: e12932.

Troye-Blomberg M., Worku S., Tangteerawatana P., Jamshaid R., Söderström K., Elghazali G., Moretta L., Hammarström M., Mincheva-Nilsson L. 1999. Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the Plasmodium falciparum parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. Scand J Immunol 50: 642–650.

Turner L., Lavstsen T., Mmbando B. P., Wang C. W., Magistrado P. A., Vestergaard L. S., et al. 2015. IgG antibodies to endothelial protein C receptor-binding cysteine-rich interdomain region domains of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 are acquired early in life in individuals exposed to malaria. Infect Immun 83: 3096–3103.

Turvey S. E., Broide D. H. 2010. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology 125: S24–S32.

UMVF. 2016. Available at: http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/1.html.

Uraki R., Hastings A. K., Brackney D. E., Armstrong P. M., Fikrig E. 2019. AgBR1 antibodies delay lethal Aedes aegypti-borne West Nile virus infection in mice. NPJ Vaccines 4: 23.

Urban B. C., Ing R., Stevenson M. M. 2005. Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. Curr Top Microbiol Immunol 297: 25–70.

Uyoga S., Ndila C. M., Macharia A. W., Nyutu G., Shah S., Peshu N., et al. 2015. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the risk of malaria and other diseases in children in Kenya: a case-control and a cohort study. Lancet Haematol 2: e437–e444.

Vafa M., Israelsson E., Maiga B., Dolo A., Doumbo O. K., Troye-Blomberg M. 2009. Relationship between immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood stage antigens and parasitological indexes as well as splenomegaly in sympatric ethnic groups living in Mali. Acta Trop 109: 12–16.

Vafa M., Maiga B., Berzins K., Hayano M., Bereczky S., Dolo A., et al. 2007. Associations between the IL-4 -590 T allele and Plasmodium falciparum infection prevalence in asymptomatic Fulani of Mali. Microbes Infect 9: 1043–1048.

Vaidya K., Sukesh K. 2012. Quantitative buffy coat (QBC) test and other diagnostic techniques for diagnosing malaria : Review of literature. Natl J Med Res 2: 386–8.

Valenzuela J. G., Belkaid Y., Rowton E., Ribeiro J. M. 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly Phlebotomus papatasi belongs to the novel Cimex family of apyrases. J Exp Biol 204: 229–237.

Valenzuela J. G., Francischetti I. M. B., Pham V. M., Garfield M. K., Ribeiro J. M. C. 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the Anopheles stephensi mosquito. Insect Biochem Mol Biol 33: 717–732.

Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett 15: 232–236.

Vande Waa J. A., Jensen J. B., Akood M. A., Bayoumi R. 1984. Longitudinal study on the in vitro immune response to Plasmodium falciparum in Sudan. Infect Immun 45: 505–510.

Vaughan J. A., Scheller L. F., Wirtz R. A., Azad A. F. 1999. Infectivity of Plasmodium berghei sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials. Infect. Immun. 67: 4285–4289.

Verra F., Bancone G., Avellino P., Blot I., Simporé J., Modiano D. 2007. Haemoglobin C and S in natural selection against Plasmodium falciparum malaria: a plethora or a single shared adaptive mechanism? Parassitologia 49: 209–213.

Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol 5: 520.

Vinetz J. M., Li J., McCutchan T. F., Kaslow D. C. 1998. Plasmodium malariae infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. N Engl J Med 338: 367–371.

Vogt M. B., Lahon A., Arya R. P., Kneubehl A. R., Spencer Clinton J. L., Paust S., Rico-Hesse R. 2018. Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system. PLoS Negl Trop Dis 12: e0006439.

Voisine C., Mastelic B., Sponaas A.-M., Langhorne J. 2010. Classical CD11c+ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to Plasmodium chabaudi malaria. Int J Parasitol 40: 711–719.

Volf P., Tesarová P., Nohýnkova E. N. 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. Med Vet Entomol 14: 251–256.

Vulliez-Le Normand B., Tonkin M. L., Lamarque M. H., Langer S., Hoos S., Roques M., et al. 2012. Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex. PLoS Pathog 8: e1002755.

Waitayakul A., Somsri S., Sattabongkot J., Looareesuwan S., Cui L., Udomsangpetch R. 2006. Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand. Acta Trop 98: 66–73.

Walker T., Moreira L. A. 2011. Can Wolbachia be used to control malaria? Mem Inst Oswaldo Cruz 106 Suppl 1: 212–217.

Wanasen N., Nussenzveig R. H., Champagne D. E., Soong L., Higgs S. 2004. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. Med Vet Entomol 18: 191–199.

Wang Q., Zhao Z., Zhang X., Li X., Zhu M., Li P., et al. 2016. Naturally acquired antibody responses to Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1) C-terminal 19 kDa domains in an area of unstable malaria transmission in southeast Asia. PloS One 11: e0151900.

Watson S. P., Auger J. M., McCarty O. J. T., Pearce A. C. 2005. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. J Thromb Haemost 3: 1752–1762.

Weiss G. E., Clark E. H., Li S., Traore B., Kayentao K., Ongoiba A., et al. 2011. A positive correlation between atypical memory B cells and Plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. PLoS One 6: e15983.

Weiss G. E., Ndungu F. M., McKittrick N., Li S., Kimani D., Crompton P. D., Marsh K., Pierce S. K. 2012. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying Plasmodium falciparum-specific memory B cells in natural infections. J Immunol Methods 375: 68–74.

Weiss W. R., Jiang C. G. 2012. Protective CD8+ T lymphocytes in primates immunized with malaria sporozoites. PLoS One 7: e31247.

White M. T., Griffin J. T., Akpogheneta O., Conway D. J., Koram K. A., Riley E. M., Ghani A. C. 2014. Dynamics of the Antibody Response to Plasmodium falciparum Infection in African Children. The Journal of Infectious Diseases 210: 1115–1122.

White N. J., Imwong M. 2012. Relapse. Adv Parasitol 80: 113–150.

WHO. 2012. Policy recommendation: seasonal malaria chemoprevention for Plasmodium falciparum control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa.

WHO. 2019. Available at: https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565721.

WHO. 2020. *World Malaria Report*. World Health Organization.

WHO. 2021. *Global technical strategy for malaria 2016–2030*. World Health Organization.

Wikel S. K. 2017. *Arthropod vector controller of disease transmission - vol 2*. Elsevier.

Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R., Piesman J. 1997. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick Ixodes scapularis induces host resistance to transmission of Borrelia burgdorferi by ticks. Infect Immun 65: 335–338.

Wilke A. B. B., Marrelli M. T. 2015. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. Parasit Vectors 8: 342.

Wilkes T. J., Matola Y. G., Charlwood J. D. 1996. Anopheles rivulorum, a vector of human malaria in Africa. Medical and Veterinary Entomology 10: 108–110.

Williams T. N., Mwangi T. W., Roberts D. J., Alexander N. D., Weatherall D. J., Wambua S., Kortok M., Snow R. W., Marsh K. 2005. An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. PLoS Med 2: e128.

Wilson K. L., Flanagan K. L., Prakash M. D., Plebanski M. 2019. Malaria vaccines in the eradication era: current status and future perspectives. Expert Review of Vaccines 18: 133–151.

Wilson N. O., Ceesay F. K., Obed S. A., Adjei A. A., Gyasi R. K., Rodney P., et al. 2011. Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine against malaria and anemia in pregnant women. Am J Trop Med Hyg 85: 12–21.

Winter G., Kawai S., Haeggström M., Kaneko O., von Euler A., Kawazu S., Palm D., Fernandez V., Wahlgren M. 2005. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. J Exp Med 201: 1853–1863.

Wipasa J., Suphavilai C., Okell L. C., Cook J., Corran P. H., Thaikla K., Liewsaree W., Riley E. M., Hafalla J. C. R. 2010. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. PLoS Pathog 6: e1000770.

Woehlbier U., Epp C., Hackett F., Blackman M. J., Bujard H. 2010. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite Plasmodium falciparum inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. Malar J 9: 77.

Wolf A.-S., Sherratt S., Riley E. M. 2017. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. Front Immunol 8: 212.

Wongkamchai S., Khongtak P., Leemingsawat S., Komalamisra N., Junsong N., Kulthanan K., Wisuthsarewong W., Boitano J. J. 2010. Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand. Asian Pac J Allergy Immunol 28: 162–169.

Wu Y., Ellis R. D., Shaffer D., Fontes E., Malkin E. M., Mahanty S., et al. 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. PLoS One 3: e2636.

WWARN Gametocyte Study Group. 2016. Gametocyte carriage in uncomplicated Plasmodium falciparum malaria following treatment with artemisinin combination therapy: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. BMC Med 14: 79.

Wykes M. N., Good M. F. 2008. What really happens to dendritic cells during malaria? Nat Rev Microbiol 6: 864–870.

Yamada H., Maiga H., Juarez J., De Oliveira Carvalho D., Mamai W., Ali A., et al. 2019. Identification of critical factors that significantly affect the dose-response in mosquitoes irradiated as pupae. Parasites & Vectors 12: 435.

Yan K.-X., Huang Q., Fang X., Zhang Z.-H., Han L., Gadaldi K., et al. 2016. IgE and FcεRI are highly expressed on innate cells in psoriasis. Br J Dermatol 175: 122–133.

Ya-Umphan P., Cerqueira D., Cottrell G., Parker D. M., Fowkes F. J. I., Nosten F., Corbel V. 2018. Anopheles salivary biomarker as a proxy for estimating Plasmodium falciparum malaria exposure on the thailand-myanmar border. Am. J. Trop. Med. Hyg. 99: 350–356.

Ya-Umphan P., Cerqueira D., Parker D. M., Cottrell G., Poinsignon A., Remoue F., et al. 2017. Use of an Anopheles salivary biomarker to assess malaria transmission risk along the Thailand-Myanmar border. J. Infect. Dis. 215: 396–404.

Yman V., White M. T., Asghar M., Sundling C., Sondén K., Draper S. J., Osier F. H. A., Färnert A. 2019. Antibody responses to merozoite antigens after natural Plasmodium falciparum infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure. BMC Med 17: 22.

Yobo C. M., Sadia-Kacou C. A. M., Adja M. A., Elanga-Ndille E., Sagna A. B., Guindo-Coulibaly N., Poinsignon A., Remoue F., Koudou B. G. 2018. Evaluation of human exposure to edes bites in rubber and palm cultivations using an immunoepidemiological biomarker. Biomed Res Int 2018: 3572696.

Yoshida S., Sudo T., Niimi M., Tao L., Sun B., Kambayashi J., Watanabe H., Luo E., Matsuoka H. 2008. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood 111.

Zacarés M., Salvador-Herranz G., Almenar D., Tur C., Argilés R., Bourtzis K., Bossin H., Pla I. 2018. Exploring the potential of computer vision analysis of pupae size dimorphism for adaptive sex sorting systems of various vector mosquito species. Parasit Vectors 11: 656.

Zahedifard F., Gholami E., Taheri T., Taslimi Y., Doustdari F., Seyed N., et al. 2014. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant leishmania tarentolae expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. PLoS Negl Trop Dis 8: e2751.

Zeidner N. S., Higgs S., Happ C. M., Beaty B. J., Miller B. R. 1999. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. Parasite Immunol. 21: 35–44.

Zhu J., Krishnegowda G., Gowda D. C. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. J Biol Chem 280: 8617–8627.

Zimmermann P., Curtis N. 2019. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. Clin Microbiol Rev 32: e00084-18.

Zoh D. D., Ahoua Alou L. P., Toure M., Pennetier C., Camara S., Traore D. F., et al. 2018. The current insecticide resistance status of Anopheles gambiae (s.l.) (Culicidae) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d'Ivoire. Parasites & Vectors 11.

Influence of mosquito bites on specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens

Human populations living in areas endemic for malaria develop protective immunity which is predominantly mediated by antibodies against *Plasmodium falciparum*. This immunity can be modulated by various factors relating to the host, the parasite and the environment. The human populations are frequently exposed to bites from blood-feeding insects, in particular to the different species of Anopheles, Culex and Aedes mosquitoes. Certain salivary components, contained in the saliva injected into the host at each blood meal, have immunomodulatory properties, and are therefore able to modulate the host's immune system. This work is interested in host-vector-pathogen immunological relationships and our objective was to assess the influence of exposure to mosquito bites on antibody responses specific to *Plasmodium falciparum* in human populations residing in endemic areas for malaria.

Blood samples taken during two multidisciplinary studies carried out in Bouaké (Côte d'Ivoire) were used to assess the IgG and isotypic responses (IgG1 and IgG3) to certain candidate vaccine antigens (PfAMA1, PfMSP1, PfMSP3 and PfGLURP-R0) and extracts of schizonts (Pfshz) of *Plasmodium falciparum*. Exposure to mosquito bites was defined at the individual level by a serological approach based on the quantification of the IgG response to certain salivary antigens specific to each mosquito genus and which represent a proxy for the level of exposure to these mosquitoes. The relationship between antibody responses to *P. falciparum* antigens and demographic, parasitic, and environmental factors has been determined through the use of univariate and multivariate analyzes.

In the first cross-sectional study, the anti-Plasmodium falciparum antibody responses were different depending on the level of exposure of the children, those highly exposed to Anopheles had significantly lower IgG and IgG3 responses to PfMSP1. We did not find an association between antibody responses to PfAMA1 and the level of exposure to Anopheles. In the second study, we followed the evolution of the anti-*P. falciparum* IgG response up to 42 days after infection. People who were more exposed to Anopheles or Aedes bites (considering exposure at single genus exposure) had a greater increase in the anti-PfShz IgG response compared to less exposed people. A positive association between the IgG response to PfShz and the individual level of exposure to the two genera of mosquitoes combined was also observed during follow-up. The evolution of the immune response was also associated with age, parasite density and pre-existing anti-Plasmodium immune response at inclusion. Mosquito exposure (single or combined) did not appear to influence the dynamics of evolution of specific responses to merozoite Ags.

Taken together, these results suggest that exposure to mosquito bites, and their immunomodulatory components are associated to the acquisition and dynamic of antibody responses directed against certain Plasmodium falciparum antigens. These “field” observations can be the starting point for further work to further explore the role of mosquito saliva on malaria transmission by combining field and ex-vivo immunological studies.

Keywords: Malaria; *Plasmodium falciparum*, *Anopheles*, Immunomodulation, Exposure, Anti-*Plasmodium* immunity, Salivary proteins

Influence des piqûres de moustiques sur les réponses anticorps spécifiques aux antigènes de *Plasmodium falciparum*

Les populations humaines vivant dans les zones endémiques pour le paludisme développent une immunité protectrice qui est majoritairement médiée par les anticorps contre *Plasmodium falciparum*. Cette immunité peut être modulée par différents facteurs relatifs à l'hôte, au parasite et à l'environnement. Ces populations humaines sont fréquemment exposées aux piqûres des insectes hématophages, notamment aux différentes espèces de moustiques Anopheles, Culex et Aedes. Certains composants salivaires de ces moustiques, contenus dans la salive injectée à l'hôte à chaque repas sanguin, ont des propriétés immunomodulatrices, et sont donc capables de moduler le système immunitaire de l'hôte. Cette thèse s'intéresse aux relations immunologiques hôte-vecteur-pathogène et notre objectif était d'évaluer l'influence de l'exposition aux piqûres de moustiques sur les réponses anticorps spécifiques à Plasmodium falciparum chez des populations humaines qui résident en zone d'endémie pour le paludisme.

Pour ce faire, des échantillons sanguins prélevés au cours de deux études multidisciplinaires réalisées à Bouaké (Côte d'Ivoire) nous ont servi pour évaluer les réponses IgG et isotypiques (IgG1 et IgG3) à certains antigènes candidats vaccins (PfAMA1, PfMSP1, PfMSP3 et PfGLURP-R0) et aux extraits de schizontes (Pfshz) de *Plasmodium falciparum*. L'exposition aux piqûres de moustique a été définie au niveau individuel par une approche sérologique basée sur la quantification de la réponse IgG à certains antigènes salivaires spécifiques de chaque genre de moustique et qui représentent un proxy du niveau d'exposition à ces moustiques. La relation entre les réponses anticorps aux antigènes de P. falciparum et les facteurs démographiques, parasitaires, et les facteurs environnementaux a été réalisée par l'utilisation d'analyses univariées et multivariées.

Lors de la première étude transversale, les réponses anticorps anti-Plasmodium falciparum étaient différentes selon le niveau d'exposition des enfants, ceux fortement exposés à Anopheles présentaient des réponses IgG et IgG3 significativement plus faibles à PfMSP1. Nous n'avons pas trouvé d'association entre les réponses anticorps à PfAMA1 et le niveau d'exposition aux Anopheles. La deuxième étude nous a permis de suivre l'évolution de la réponse IgG anti-P. falciparum 42 jours après une infection. Les personnes qui étaient plus exposées aux piqûres d'*Anopheles* ou d'*Aedes* (exposition considérée à un genre unique) présentaient une plus forte augmentation de la réponse IgG anti-*Pf*Shz en comparaison aux personnes moins exposées. Une association positive entre la réponse IgG à *Pf*Shz et le niveau individuel d'exposition aux deux genres de moustiques combinée a également été observé au cours du suivi. L'évolution de cette réponse immune était également associée à l'âge, à la densité parasitaire et à la réponse immunitaire préexistante anti-Plasmodium à l'inclusion de l'étude longitudinale. L'exposition aux moustiques (unique ou combinée) n'était pas associée aux dynamiques d'évolution des réponses spécifiques aux antigènes de mérozoites.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'exposition aux piqûres de moustiques est associée à l'acquisition et à la dynamique des réponses anticorps dirigées contre certains antigènes de *Plasmodium falciparum*. Ces observations « de terrain » peuvent constituer le point de départ de travaux complémentaires pour appréhender le rôle de la salive de moustique sur la transmission du paludisme en combinant des études immunologiques sur le terrain et ex-vivo.

Mots clés : Paludisme; *Plasmodium falciparum*, *Anopheles*, Immunomodulation, Immunité anti-*Plasmodium*, Protéine salivaire