

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Laboratoire Biogéosciences, UMR CNRS 5561

THÈSE

**Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Écologie évolutive**

Présentée par

Elise CELLIER-HOLZEM

Soutenance le 16 décembre 2010

Écologie évolutive de la malaria aviaire
Approches expérimentales des relations entre *Plasmodium*
***relictum* et le canari domestique**

Directeur de thèse

Gabriele SORCI

Co-encadrant de thèse

Stéphane GARNIER

Jury

Gabriele Sorci	CNRS-Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Ana Rivero	CNRS-IRD Montpellier	Rapporteur
Philippe Christe	MER-Université de Lausanne	Rapporteur
Thierry Rigaud	CNRS-Université de Bourgogne	Examineur
Nathalie Charbonnel	CBGP Montpellier	Examineur
Loïc Bollache	Professeur-Université de Bourgogne	Examineur

À ma tribu

Remerciements

Voici maintenant l'exercice difficile des remerciements, partie qui sera certainement plus lue que la thèse en tant que telle. Il y a beaucoup de personnes que je souhaiterais remercier pour leur aide, leur soutien, leurs idées (farfelues ou non), leur présence à mes côtés durant ces trois années...aussi je tiens par avance à m'excuser vis-à-vis de ceux que j'oublierais (ils se reconnaîtront !).

Tout d'abord je tiens à remercier très sincèrement Gabriele et Stéphane pour m'avoir choisie sur ce sujet qui m'a passionnée pendant trois ans. Merci de m'avoir fait découvrir ces petites bestioles qui ont tenu une place si grande dans ma vie dijonnaise.

Je voudrais te remercier très chaleureusement Gabriele pour ton apprentissage, pour ton soutien, pour m'avoir poussée chaque jour un peu plus loin, pour tous ces bons moments passés à Bretenières (même dans le froid, la tempête, au cœur des week-ends, au milieu des vacances...) et à Hoëdic (c'est le cœur gros que je mis fin à ce terrain breton). Merci pour ton implication dans ce sujet, pour la pertinence de tes idées...je ne serais jamais allée si loin sans ton aide.

Merci également à Stéphane pour son aide et implication à différentes étapes des expériences menées, ainsi que pour l'insertion et l'encadrement des étudiants qui ont pu participer aux travaux de recherche présentée ici.

Je tiens tout particulièrement à remercier Rodrigo Esparza-Salas pour son aide dans les premiers mois de cette thèse, pour toutes les techniques de terrain et de labo qu'il a pu m'enseigner, pour son amitié et sa joie de vivre. Rodrigo, je ne te remercierai jamais assez d'avoir été présent à mes côtés dans mes débuts, et pour m'avoir suivie et soutenue tout au long de ces trois ans ; Muchas gracias por tu amistad compañero ! À ce sujet merci beaucoup à Bernhard pour m'avoir envoyée des articles introuvables !

Merci à Stephen Larcombes pour son aide et pour la mise en place (scientifique et technique) d'une des expériences présentée dans cette thèse. Merci Steve pour ta bonne humeur et bon ton aide et pour ta compagnie lors d'une des sessions de terrain en Bretagne.

Merci à tous les membres de l'équipe « oiseau » avec qui j'ai pu interagir (Gabriele, Bruno, Emilie, Stéph, Romain, Coraline...) ainsi qu'à tous les membres du laboratoire Biogéosciences (sans exception) pour leur accueil.

Je voudrais remercier très sincèrement Karen McCoy et Nathalie Charbonnel pour leurs conseils et leurs encouragements à l'issue de la deuxième année de thèse (moment où le doute et la panique peuvent surgir à tout instant). Merci également à Ana Rivero, Philippe Christe, Loïc Bollache et Thierry Rigaud d'avoir accepté si spontanément et si chaleureusement de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Emilie et Coraline pour leur aide au labo (tant pour les dosages que pour la PCR quanti). Merci à Coraline et Aude pour leur aide dans les dernières manips de ma thèse. Un grand merci à David Bru pour son accueil dans les laboratoires de l'INRA et pour son aide. Merci à tous les étudiants qui ont participé à ce travail en particulier les deux Maries B. et Sandrine. Merci Sandrine pour ces deux semaines de terrain à Hoëdic, merci de ton enthousiasme à monter les filets à 5h du matin et à observer durant des heures nos charmants amis à plumes. Merci Marie pour ton aide dans la dernière ligne droite (dernière manip, dernières extractions, dernières qPCR), merci pour ta spontanéité et désolée pour les longues heures « phénol/Chlo » que tu as du vivre.

Je tiens à remercier l'ensemble des habitants de cette merveilleuse petite île qu'est Hoëdic. Merci à eux pour leur accueil, pour leur grand cœur, pour leur curiosité lorsqu'ils me voyaient passer avec mon échelle, pour leur bonne humeur, pour leur enthousiasme et leur aide. Un grand merci à Emilie pour le matériel de terrain, pour son aide et sa gentillesse. C'est un peu de moi que j'ai laissé dans ces petits nichoirs qui ornent à présent les toits hoëdicaïs.

Je voudrais lancer un grand merci à tous les non-titulaires du laboratoire (forces vives qui accumulent les données, les papiers et les cafés). Je vais certainement en oublier mais merci à Cyril (en 1^{er} bien sûr), Christine, Caroline, Clotilde (merci pour les corrections), Adriana (et Cezar), Steve, Paula, Virginia, Karolina, Nathalie, Romain, David, Julia, Aurélie, Mathieu, Christophe, Benjamin, Sylvain, Raph...et tous les autres bien entendu...ainsi qu'au seul titulaire de cette liste, Rémi ! Merci aussi à Evelyne pour sa bonne humeur dans les couloirs...encore désolée de l'état souvent lamentable de mon bureau.

Je voudrais remercier très (très) chaleureusement l'ensemble des membres du groupe TTATT, et surtout son président co-fondateur (tout ce que j'ai à dire de gentil sur lui...je lui dirai en face).

Si je suis arrivée jusqu'ici, je le dois aussi aux personnes qui m'ont transmis leur enthousiasme et leur passion, qui m'ont soutenue et guidée : merci donc aux membres de l'équipe écologie spatiale des populations du CEFÉ, plus particulièrement merci beaucoup à Thierry Boulinier, Arnaud Grégoire et Jacques Blondel. Merci à Thierry pour m'avoir donnée la chance de partir dans l'Arctique norvégien, merci à Vincent pour son enseignement sur le terrain...cette expérience restera gravée en moi. Merci aussi à Fred Veyrunes pour mon initiation à la recherche...finalement Fred je ne suis pas retournée vers les chromosomes mais j'en garde un très bon souvenir...merci pour tout !

Un énorme, magique, subtil et malicieux MERCI à Marion et Ronan. Nous nous sommes rencontrés sous les pancartes (1^{ère} et 2^{ème} génération) au moment où on voulait être considérés « en tant que tels ». Depuis vous êtes devenus des amis très sincères, ma petite famille dijonnaise. Merci pour tout, pour votre soutien, votre amitié, votre sauvetage. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble (et c'est pas fini) et merci pour vos encouragements dans ces derniers mois assez difficiles. Un merci tout spécial à Marion pour ses relectures et corrections plus que pertinentes. Je tiens aussi à saluer Alessia, Caroline, Charlotte et Cécile.

Merci à Marion (Dédé !) pour cette première moitié de thèse passée ensemble, pour les coups de Bluz (ah ah jeux de mots !), de joie, de gueule, de larmes...tu m'as manqué au labo mais j'ai la chance d'être devenue ton amie (et ça vaut tous les papiers du monde !). Je ne peux remercier Marion, sans l'accompagner de toute sa bande Kirienne : merci à tous pour votre amitié (et aussi pour la vaisselle (Mél et Clém), l'hébergement (Aline) et les invit' à bouffer (Fred) après le sinistre).

Je voudrais remercier mes amis de longues dates : Nicolas, Brahim et Caroline pour ... bah pour TOUT en fait. Merci d'avoir été présents. J'ai plein de jolies choses à vous dire, mais je le ferai de vive voix.

Merci à Julie pour les longues heures défouloirs au téléphone (maintenant c'est à ton tour de souffrir !!)...je m'avance un peu mais d'avance merci pour La Réunion !!!! Merci aussi à Elsa, Julia et Violeta pour leur amitié. J'espère vous revoir vite (dans un endroit du monde qu'on ne connaît pas encore)

Enfin c'est avec beaucoup d'émotions que je voudrais remercier mes parents, Dominique et Mary, ma sœur Flora (et demi !) et mes grands-parents, Roger et Jane. Merci à vous tous pour votre amour, votre soutien (sans faille) et vos encouragements. Merci les parents pour vos relectures et vos conseils, mais surtout merci de m'avoir montrée ce que passion veut dire. Merci Flora pour avoir toujours été là...je te passe le flambeau, à ton tour maintenant. Merci Papé et Mounie pour votre tendresse et votre intérêt dans tout ce que j'entreprends. Merci à la tribu pour résister et croire qu'un autre monde est possible.

Enfin merci à toi !

Résumé

L'étude des interactions hôtes/parasites est actuellement un thème de recherche incontournable des sciences de l'évolution. Une des questions majeures soulevée par ces études est de comprendre pourquoi certains parasites provoquent des maladies mortelles, alors que d'autres restent relativement bénins pour leurs hôtes. Dans ce défi que tentent de relever les biologistes de l'évolution mais également les sciences médicales, nous avons choisi de nous intéresser à la malaria aviaire, et plus précisément à son représentant le plus commun dans les populations naturelles d'oiseaux : *Plasmodium relictum*. En procédant à des infections expérimentales de canaris domestiques (*Serinus canaria*), nous avons voulu comprendre quels facteurs liés aux caractéristiques du parasite et de l'oiseau (au niveau de l'individu ou de la population) pouvaient influencer la virulence de *Plasmodium relictum*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que des facteurs, tels que le passé infectieux de l'hôte, la dose de parasites reçue, la prévalence de ces derniers dans la population d'oiseaux ou bien encore les interactions sociales entre individus, pouvaient moduler les coûts d'une telle infection. La virulence est un trait composite qui dépend, certes, de l'exploitation de l'hôte par les parasites mais également de la réponse immunitaire de ce dernier contre l'infection. Nous avons pu le vérifier dans notre système expérimental en utilisant une approche immuno-écologique. Nous nous sommes enfin intéressée aux conditions favorisant l'évolution de la virulence : ce qui est essentiel pour comprendre l'émergence ou la ré-émergence de maladies infectieuses et pour développer des stratégies de contrôle de ces maladies.

Mots clefs : Canaris domestiques, Ecologie évolutive, Infections expérimentales, Immuno-écologie, Interaction hôte-parasite, Malaria aviaire, *Plasmodium relictum*, Virulence.

Abstract

Host-parasite interaction became one of the main topics of evolutionary sciences researches. One of the major issues raised by these studies is to understand why some parasites cause fatal diseases while others remain relatively mild to their hosts. In this challenge attempting to take up the evolutionary biologist and the medical sciences, we focused on avian malaria, and more specifically on its most common parasite: *Plasmodium relictum*. In performing experimental infections in domestic canaries (*Serinus canaria*), we wanted to understand what factors related to parasite and birds characteristics, could influence *Plasmodium relictum* virulence. We highlighted that factors such as infectious past, parasites dose, prevalence in bird's population and social interactions between individuals could modulate costs of such infection. Virulence is a composite trait that depends on the host's exploitation by parasites but also the host's immune response against the infection. We were able to show that in our experimental system using an approach of immunological ecology. Finally we focused on the conditions favouring the virulence evolution: an essential point to understand emergence or re-emergence of infectious diseases and to develop strategies to control these diseases.

Keywords: Avian malaria, Domestic canaries, Evolutionary ecology, Experimental infections, Host-parasite interactions, Immunological ecology, *Plasmodium relictum*, Virulence.

Table des matières

Introduction	1
1. Contexte de l'étude	1
2. Questions abordées	4
Chapitre 1 : Modèles et méthodologies	7
1. Hôtes et parasites considérés	7
2. Collecte et identification de <i>Plasmodium relictum</i>	10
3. Congélation de sang parasité	11
4. Infections expérimentales	11
5. Suivi des dynamiques de multiplication parasitaire.....	12
6. Mesure de la virulence	16
7. Méthodes statistiques : les modèles à effet mixtes	18
Chapitre 2 : Première infection par le parasite	21
1. Dynamique de multiplication de <i>Plasmodium relictum</i> et virulence.....	21
2. Impacts de la dose infectieuse.....	24
3. Comment les interactions sociales entre oiseaux peuvent moduler les coûts de la malaria aviaire ?	29
4. Comparaison de deux lignées génétiquement proches : SGS1 et GRW11.....	34
Chapitre 3 : Expositions répétées à la malaria aviaire	41
Chapitre 4 : Exploitation de l'hôte vs. Immunopathologie	47
1. Les coûts de l'immunité.....	47
2. Inhibition de la réponse immunitaire	49
3. Mise en évidence des coûts immunopathologiques	52
4. Conséquences de l'immunopathologie	54
Chapitre 5 : Évolution de la virulence	57
1. Contexte théorique et méthodes expérimentales.....	57
2. Effet de la dose infectieuse sur l'évolution de <i>Plasmodium relictum</i>	60
3. Effet de l'immunité de l'hôte	64
Conclusion et perspectives	71
Bibliographie	77
Annexes	95

Liste des annexes

Annexe 1 : Esparza-Salas, R., Cellier-Holzem, E., Bru, D., Garnier, S. and Sorci, G. A quantitative PCR assay for the detection of avian malaria (*Plasmodium spp.*) in all bird species. *Submitted to Molecular Ecology Resources*.

Annexe 2 : Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. (2010). Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage *SGS1*) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology* **40**, 1447-1453.

Annexe 3 : Cellier-Holzem, E., Belvalette, M., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. For a few parasites more: contrasted effects of *Plasmodium relictum* infective dose. *In preparation*.

Annexe 4 : Larcombe, S., Cellier-Holzem, E., Bedhomme, S., Garnier, S., Faivre, B. and Sorci, G. Social interactions modulate the cost of avian malaria infection. *Submitted to International Journal for Parasitology*.

Annexe 5 : Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Le Hô, M., Brenier, M., Garnier, S. and Sorci, G. Immunopathology and the virulence of avian malaria. *Submitted to Proceeding of the Royal Society of London-B*.

Annexe 6 : Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. Experimental evolution of avian malaria parasites. *In preparation*.

Introduction

1. Contexte de l'étude

a. Études des interactions hôtes-parasites

Évocat de maladies pour l'Homme, pour ses cultures et ses animaux domestiques, le parasitisme n'a longtemps été perçu que comme quelque chose de néfaste, et son étude cantonnée principalement aux sciences médicales. Aujourd'hui, loin de n'intéresser que les parasitologues, le parasitisme est devenu un thème de recherche incontournable des sciences de l'évolution (Anderson et May 1982 ; Grenfell et Dobson 1995 ; Poulin *et al.* 2000 ; Combes 2001 ; Frank 2002 ; Harvell 2004 ; Thomas *et al.* 2009).

On estime à plus de 50% la proportion d'espèces parasites au sein du monde vivant (de Meeûs et Renaud, 2002). En plus de l'extraordinaire diversité de formes, de cycles, de modes et de milieux de vie qu'ils représentent, les scientifiques accumulent les preuves de leur rôle fondamental dans la diversité et le fonctionnement des écosystèmes (Poulin *et al.* 2000 ; Hudson *et al.* 2006), ou bien encore dans certaines hypothèses évolutives comme la sélection sexuelle et le maintien de la reproduction sexuée (Hamilton 1980 ; Hamilton et Zuk, 1982). Ainsi, l'étude du parasitisme apparaît dorénavant dans des domaines de recherche aussi divers que l'écologie comportementale, l'épidémiologie évolutive, l'immuno-écologie ou encore la biologie de la conservation.

Les parasites sont susceptibles d'agir sur différents aspects de la biologie de leurs hôtes, comme par exemple leurs physiologies, morphologies ou comportements (Poulin et Thomas 1999 ; Thomas *et al.* 2002 ; Brodeur et Boivin 2004 ; Franceschi *et al.* 2007 ; Poulin 2007 ; Yanoviak *et al.* 2008 ; Lefèvre *et al.* 2009 ; Thomas *et al.* 2010). Même si l'impact d'une infection parasitaire peut être important et sa compréhension essentielle, estimer les coûts du parasitisme est un exercice difficile étant donné la complexité des relations existantes avec l'hôte. En effet la virulence d'un parasite, que l'on peut définir comme l'ensemble des dommages que ce dernier va provoquer (directement ou indirectement) chez son hôte (Frank 1996, Levin 1996, Poulin et Combes 1999), peut être fonction de plusieurs facteurs liés :

(1) aux caractéristiques propres du parasite comme son taux de multiplication et son temps de génération.

(2) aux attributs de l'hôte, sa capacité à se défendre face à l'infection.

(3) au contexte environnemental modifiant par exemple les probabilités de transmission du parasite ou bien l'état de santé de l'hôte.

Une des questions majeures, soulevée par l'étude des interactions hôte-parasite, est de comprendre pourquoi certains parasites provoquent des maladies mortelles, alors que d'autres restent relativement bénins pour leurs hôtes. En appliquant les principes de la biologie évolutive à l'étude du parasitisme, les scientifiques tentent d'expliquer de telles variations de virulence, de comprendre et de prédire l'émergence ou la ré-émergence de maladies infectieuses, ou encore de développer des stratégies de contrôle de telles infections (Anderson et May 1978 ; Dronamraju 2004 ; Harvell 2004 ; Lebarbenchon *et al.* 2008). Ainsi l'étude et la lutte contre des maladies telles que la grippe H5N1, le sida ou le paludisme, pour ne citer que les plus célèbres, ne relèvent plus que de la médecine mais peuvent être abordées d'un point de vue évolutif.

C'est donc par une approche évolutive que nous proposons, dans le travail présenté ici, de comprendre et d'expliquer la virulence de parasites infectant des populations d'oiseaux, leur provoquant une maladie appelée la malaria aviaire.

b. Pourquoi étudier la malaria aviaire ?

La malaria, ou paludisme, est une maladie infectieuse causée par des parasites protozoaires de l'ordre des haemosporidiens, transmis à des hôtes vertébrés par l'intermédiaire d'insectes piqueurs. Son impact en santé humaine est impressionnant puisque chaque année elle tue entre un et trois millions de personnes (World Health Organisation 2008), principalement en Afrique sub-saharienne. Pour étudier cette maladie (en laboratoire ou en conditions naturelles) et mettre en place des stratégies de contrôle, les chercheurs ont, depuis plus d'une centaine d'années, développé des modèles animaux leur permettant d'accroître leur connaissance d'un tel parasitisme, et les oiseaux ont été les premiers à attirer leur attention. À peine six ans après l'identification du premier genre d'haemosporidien responsable de la malaria humaine (*Plasmodium* en 1885), des chercheurs italiens ont réussi pour la première fois à infecter expérimentalement des oiseaux (Celli et Sanfelice 1891). Ceci marqua le début de l'expérimentation sur la malaria aviaire, socle sur lequel s'appuieront les études à venir. Entre la fin du 19^{ème} et le début du 20^{ème} siècle, les études s'enchaînent et les

chercheurs accumulent des informations sur les cycles de vie de ces parasites aviaires, leur taxonomie, leur développement et leur impact (Grassi et Feletti 1891 ; Ross 1899 ; Koch 1899 ; Sergent et Sergent 1921 et 1952 ; Corradetti *et al.* 1970 ; Garnham 1966). Ainsi les haemosporidiens d'oiseaux ont permis la découverte de médicaments anti-paludéens, les premières cultures *in vitro* de parasites de la malaria et ont contribué aux premières étapes de développement de vaccins (Davey 1951 ; Coatney *et al.* 1953 ; Ball et Chao 1961 ; McGhee *et al.* 1977 ; Slater 2005). Après la découverte des parasites de la malaria chez les rongeurs en 1948 (Killick-Kendrick 1974), et l'infection réussie de singes par la malaria humaine en 1966 (Young *et al.* 1966), le nombre des études sur les oiseaux a considérablement chuté.

Cependant depuis ces deux dernières décennies, les études sur la malaria aviaire réapparaissent dans le champ des publications scientifiques. L'ensemble des connaissances accumulées sur ces parasites, ainsi que sur leurs hôtes et vecteurs potentiels, et le fait qu'ils soient ubiquistes dans les populations naturelles d'oiseaux (Fallon *et al.* 2005) font d'eux d'excellents candidats pour l'étude de l'évolution des interactions hôtes-parasites.

L'impact de la malaria aviaire peut être important pour certaines populations d'oiseaux (naturelles ou en captivité), et son étude présente des applications pratiques en biologie de la conservation, ainsi que pour les sciences vétérinaires. L'exemple de l'introduction par l'homme de *Plasmodium relictum* et de son vecteur *Culex quinquefasciatus* dans les îles hawaïennes est un exemple des effets dramatiques que la malaria peut avoir. Il a causé dans ce cas l'extinction locale (ou la réduction importante) de certaines populations endémiques qui entrèrent en contact pour la première fois avec de tels parasites (Warner 1968 ; Van Riper *et al.* 1986 ; Atkinson *et al.* 1995 ; Atkinson *et al.* 2000). Il en va de même pour des oiseaux exotiques, sans passé évolutif commun avec des haemosporidiens, importés dans des zoos où les concentrations d'animaux, de vecteurs et de donneurs paludéens, comme le sont de nombreuses espèces de passereaux, rendent les infections plus que probables (Griner 1974 ; Fix *et al.* 1988 ; Bennett *et al.* 1993 ; Cranfield *et al.* 1994). Malgré cela, le rôle des haemosporidiens dans les pathologies aviaires est encore mal connu, et leur impact sous-estimé.

À l'heure actuelle, beaucoup d'études sur la malaria aviaire se déroulent en milieux naturels, et estiment les prévalences et les coûts d'un tel parasitisme en se basant sur un suivi épidémiologique d'oiseaux (Wiehn *et al.* 1999 ; Bensch *et al.* 2000 ; Valkiūnas 2005 ; Kilpatrick *et al.* 2006 ; Beadell *et al.* 2006 ; Hellgren *et al.* 2007). De nombreux facteurs confondants, comme le passé infectieux des individus, leur âge et les caractéristiques environnementales, rendent difficile la réelle estimation des coûts suite à une telle infection.

De plus ces études ne peuvent estimer la fréquence des expositions aux parasites, ni les doses infectieuses transmises par les vecteurs. Enfin il peut exister un biais dans l'échantillonnage des oiseaux capturés, puisque certaines études semblent indiquer que les oiseaux les plus infectés présentent une mobilité réduite et sont donc moins susceptibles d'être pris dans les pièges (Valkiūnas 2001). L'approche expérimentale, en conditions contrôlées, semble donc nécessaire mais reste à l'heure actuelle assez peu commune.

2. Questions abordées

Dans le travail de thèse, présenté ici, nous aborderons donc, par des approches évolutives, les relations entre oiseaux et parasites de la malaria aviaire. Les différentes expériences que nous avons menées à ce sujet ont fait l'objet de publications scientifiques présentées en annexe. Pour chacune des thématiques abordées, nous résumerons et lierons les principaux résultats obtenus, en les replaçant dans leur contexte scientifique. Nous invitons néanmoins le lecteur à consulter les annexes pour avoir une vision plus précise de l'ensemble des expériences menées et résultats acquis au cours de cette thèse.

Après avoir détaillé les modèles biologiques et les méthodologies utilisées (chapitre 1, annexe 1), nous aborderons quatre volets de questions autour de l'écologie évolutive de la malaria aviaire.

(1) Première infection par le parasite (chapitre 2)

Dans cette partie, nous expliquerons comment se déroulent les différentes étapes d'une infection par la malaria aviaire en nous focalisant sur la dynamique de multiplication des parasites au sein des hôtes, et sur les signes de virulence que cette infection va provoquer chez les oiseaux (annexe 2). Par la suite, nous testerons l'impact de deux facteurs susceptibles de moduler les coûts d'une telle infection : la dose de parasite que les oiseaux vont recevoir (annexe 3) ainsi que les interactions sociales entre individus (annexe 4). Enfin nous comparerons la virulence de deux lignées de parasites (*Plasmodium relictum* - lignées SGS1 et GRW11), génétiquement proches, co-existantes dans certaines populations d'oiseaux. Les résultats de cette dernière expérience ne seront pas présentés en annexe mais uniquement dans le corps de la thèse.

(2) Expositions répétées à la malaria aviaire (chapitre 3)

Ici, nous présenterons les résultats de nos expériences de réinfection par la malaria (annexe 2). Nous étudierons ainsi la façon dont le passé infectieux de l'hôte peut influencer sur la virulence du parasite, ainsi que plus généralement sur l'épidémiologie de la maladie et l'évolution des stratégies parasitaires en découlant. Nous nous interrogerons, enfin, sur la durée de la protection mise en place par les oiseaux suite à une primo-infection, ainsi que sa spécificité.

(3) Exploitation de l'hôte vs. Immunopathologie (chapitre 4)

Dans ce troisième volet, nous étudierons les causes de la virulence des parasites de la malaria aviaire ; plus précisément nous testerons si les symptômes de la maladie sont seulement dus à l'exploitation par le parasite ou bien si la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection pourrait en expliquer une partie. Après avoir replacé dans un cadre théorique les coûts et bénéfices de l'immunité, nous introduirons la notion d'immunopathologie. Nous expliquerons par la suite comment nous avons testé l'existence de coûts immunopathologiques lors d'une infection par la malaria aviaire, et les résultats obtenus (annexe 5). Ceci nous amènera à redéfinir la notion de virulence et réfléchir sur les conséquences évolutives de l'immunopathologie.

(4) Évolution de la virulence (chapitre 5)

Nous avons mené deux études ayant pour objectif l'évolution expérimentale des parasites de la malaria aviaire. Nous testerons, dans un premier temps, l'influence de la dose infectieuse sur l'évolution de la virulence des parasites, ainsi que sur leur potentiel de transmission aux vecteurs (annexe 6). Puis, dans un deuxième temps, nous étudierons la façon dont l'immunité développée par l'oiseau influence l'évolution des parasites.

Enfin nous apporterons une conclusion sur l'ensemble des résultats obtenus, et nous terminerons sur les perspectives que ce travail laisse entrevoir.

Chapitre 1 : Modèles et méthodologies

1. Hôtes et parasites considérés

a. *Plasmodium relictum*

Les parasites de la malaria aviaire se divisent en trois genres : *Plasmodium*, *Haemoproteus* et *Leucocytozons*. Parmi ces derniers nous avons choisi d'étudier *Plasmodium relictum*, l'un des parasites les plus courants dans les populations d'oiseaux et présentant une des distributions les plus larges. Il a, en effet, été observé dans toutes les régions zoogéographiques, excepté en Antarctique (Valkiūnas 2005). *Plasmodium relictum* peut être transmis aux oiseaux par l'intermédiaire de nombreuses espèces de moustiques (genres *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*). La figure 1.1 illustre, de façon très simplifiée, le cycle de ce parasite en se focalisant surtout sur les formes présentes dans le sang des oiseaux qui constituent l'objet de la présente étude. Il faut néanmoins garder à l'esprit que les parasites peuvent être présents et se développer dans certains organes de l'hôte tels que le foie, la rate ou le cerveau.

Comme tous les autres parasites responsables de la malaria, *Plasmodium relictum* présente deux voies de développement au sein de l'hôte vertébré :

(1) une multiplication asexuée se traduisant par la production de nombreux clones, responsables de symptômes de la maladie observés chez l'hôte, notamment la destruction des érythrocytes et l'anémie en découlant.

(2) la production de formes sexuées (gamétocytes), seuls stades parasitaires à survivre au passage au vecteur où se déroulera la reproduction sexuée. Ainsi la production de gamétocytes est directement associée au potentiel de transmission du parasite.

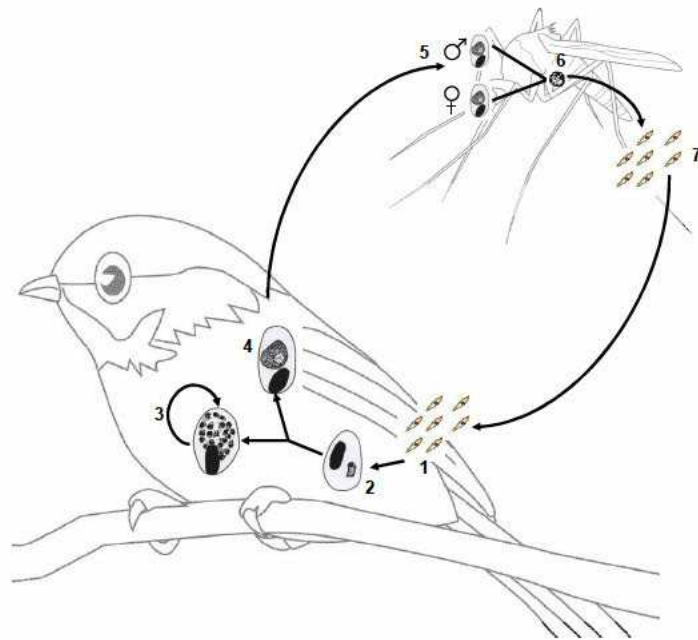


Figure 1.1 : Représentation simplifiée du cycle de *Plasmodium relictum*.

- Peau :** 1. Sporozoïtes injectés à l'oiseau suite à la piqûre d'un moustique infecté
- Sang :** 2. Mérozoïte se développant au sein d'un érythrocyte
3. Division clonale de nombreux mérontes (multiplication asexuée)
4. Gamétocyte
- Vecteur :** 5. Gamétocytes mâle et femelle
6. Oocyste (produit de la reproduction sexuée)
7. Sporozoïtes dans les glandes salivaires du vecteur

Plasmodium relictum a fait l'objet de nombreuses études auparavant, en populations naturelles (Beadell *et al.* 2006 ; Cosgrove *et al.* 2008 ; Levin *et al.* 2009 ; Atkinson et Samuel 2010 ; Quillfeldt *et al.* 2010) ou en laboratoire (Corradetti *et al.* 1970 ; Hayworth *et al.* 1987 ; Atkinson *et al.* 2000 ; Spencer *et al.* 2005 ; Palinauskas *et al.* 2008 et 2009 ; Cellier-Holzem *et al.* 2010). La virulence de ce parasite est susceptible d'être importante, puisqu'il est l'agent responsable de la disparition d'espèces endémiques dans les îles hawaïennes.

La figure 1.2 montre une observation microscopique de *Plasmodium relictum* dans le sang d'un canari domestique.

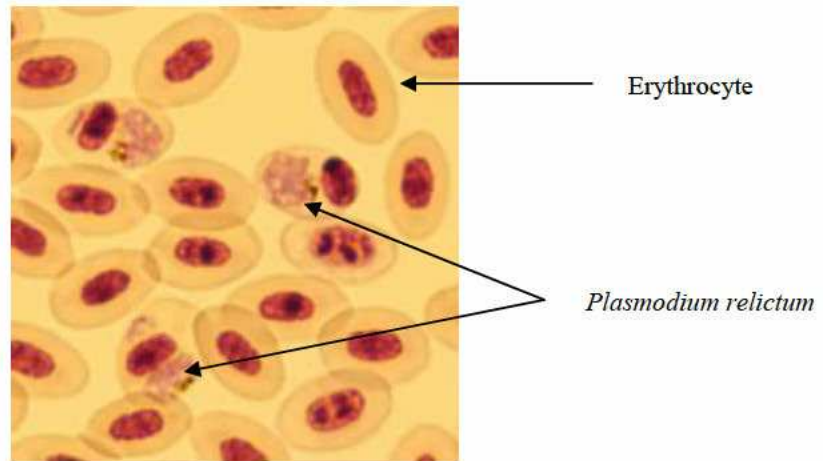


Figure 1.2 : Observation microscopique de *Plasmodium relictum* à partir d'un frottis sanguin de canari domestique (agrandissement x1000)

Nous nous sommes surtout intéressée à la lignée SGS1 (gène mitochondrial du cytochrome b), associée à l'espèce *Plasmodium relictum* par Palinauskas *et al.* en 2007. Cette lignée a été décrite chez 29 espèces d'oiseaux en Eurasie et en Afrique (Waldenström *et al.* 2002 ; Hellgren *et al.* 2007 ; Beadell *et al.* 2006 ; Palinauskas *et al.* 2007), et présente une prévalence plutôt élevée dans les populations de moineaux domestiques que nous avons échantillonnées.

b. Canaris domestiques (*Serinus canaria*)

Pour mener nos expériences sur la malaria aviaire, nous avons choisi comme hôtes vertébrés des canaris domestiques issus d'élevage. En dehors du fait que ces oiseaux sont aisément accessibles et maintenables en volières, nous savions de plus qu'ils pouvaient être infectés par des parasites de la malaria, en particulier par *Plasmodium relictum* (Sergent et Sergent 1952 ; Corradetti *et al.* 1970 ; Spencer *et al.* 2005). En effet l'utilisation de canaris pour les recherches expérimentales sur la malaria aviaire n'est pas récente. En 1899, des chercheurs allemands ont été les premiers à infecter expérimentalement des canaris par l'intermédiaire de piqûres de moustiques (Koch, 1899). Suite à cela, le canari domestique est devenu l'hôte expérimental le plus utilisé pour les recherches en laboratoire sur la malaria, et ce jusqu'à la découverte dans les années 30 de *Plasmodium gallinaceum*, haemosporidien infectant les poulets.

Nous avons maintenu nos canaris dans des volières, extérieures ou intérieures, nous les avons nourris *ad libitum* et infectés expérimentalement avec *Plasmodium relictum* (sous différentes conditions en fonction des expériences que nous avons menées).

2. Collecte et identification de *Plasmodium relictum*

Si nos expériences ont impliqué des oiseaux d'élevage, les parasites ont, quant à eux, été collectés dans des populations naturelles de moineaux domestiques (*Passer domesticus*) aux alentours de Dijon, plus précisément dans deux centres équestres : l'Etrier de Bourgogne et le Cercle Hippique Dijonnais. Les moineaux ont été capturés à l'aide de filets, bagués et maintenus en volière pendant 3 à 4 jours, soit le temps de déterminer leur statut infectieux. Pour cela nous avons, à chaque fois, procédé comme suit :

(1) Prise de sang : entre 20 et 40 µl au niveau de la veine brachiale, stocké par la suite dans un tampon (Queen's Lysis Buffer).

(2) Extraction des ADN de l'oiseau et du parasite au Phénol/Chloroforme (protocole modifié à partir de Hillis et al. 1996).

(3) Amplification de l'ADN des parasites des genres *Plasmodium* et *Haemoproteus* par PCR (Polymerase Chain Reaction, Waldenström et al. 2004).

(4) Séquençage des ADN amplifiés (opération effectuée par l'entreprise MacroGen).

Une fois les séquences parasitaires obtenues, nous les avons comparées à celles présentes dans la base de données de séquences génomiques GenBank du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Environ 200 µl de sang ont été prélevés chez les moineaux infectés par *Plasmodium relictum* et transférés par injections intrapéritonéales à des canaris afin de provoquer la multiplication des parasites et ainsi augmenter les intensités de ces derniers dans le sang des oiseaux. Les parasitémies sont, en effet, souvent trop faibles dans le sang des moineaux pour obtenir les doses nécessaires à nos expériences.

Les moineaux ont ensuite été relâchés dans leur population d'origine.

3. Congélation de sang parasité

Nous avons récupéré des parasites dans les populations naturelles de moineaux domestiques avec deux finalités : soit pour infecter directement des canaris, soit pour constituer des stocks de parasites, maintenus à l'état congelé en laboratoire. Ceci nous a permis d'avoir en permanence des parasites à notre disposition.

Pour cette opération, au sang infecté des donneurs nous avons ajouté une solution de cryo-préservation (Diggs *et al.* 1975) à base de glycérol (6,2 M), sodium lactate (0,14 M), chlorure de potassium (0,0005 M) et de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Les échantillons de sang parasité ont ensuite été maintenus à -80°C jusqu'à utilisation. À ce moment nous avons appliqué un protocole de décongélation, constituant en un lavage avec des solutions de chlorure de sodium (à 0,2% et 1,6%). Enfin les parasites ont été re-suspendus dans une solution de PBS avant injection aux canaris receveurs.

Lors de nos expériences, nous avons parfois utilisé des parasites provenant de stocks congelés.

4. Infections expérimentales

Toutes nos expériences ont en commun l'infection expérimentale de canaris par *Plasmodium relictum*. Afin de comparer les dynamiques de multiplication des parasites, et les signes de virulence provoquée, nous avons besoin de pouvoir contrôler les doses infectieuses que les canaries recevaient. Nous avons pour cela effectué des frottis sanguins des individus « donneurs », fixés par du méthanol pur et colorés par une solution de Giemsa concentrée à 10%. Les frottis ont ensuite été observés au microscope à immersion (objectif x 100). Nous avons compté le nombre de parasites présents pour un total d'environ 10000 érythrocytes, ce qui nous permettait d'obtenir les intensités parasitaires de chaque donneur. L'hématocrite de chacun des oiseaux a été mesuré (voir la section 6 de ce chapitre pour le détail), sachant qu'un hématocrite de 50% correspond approximativement à 5 millions d'érythrocytes par microlitres.

Les intensités parasitaires et les hématocrites nous ont donc permis de déterminer le nombre de parasites présents dans chaque microlitre de sang de chacun des donneurs. Nous pouvions ainsi contrôler les doses infectieuses pour initier nos différentes expériences.

Toutes les infections ont été faites par voie intrapéritonéale. Dans chaque expérience nous avons standardisé le volume des *inocula* en ajoutant du sérum physiologique au sang infecté (quand cela était nécessaire). Afin d'éviter que les canaris soient naturellement infectés par des moustiques, toutes nos expériences ont été menées en automne et en hiver.

5. Suivi des dynamiques de multiplication parasitaire

Suite aux infections expérimentales, nous avons procédé à un suivi des variations d'intensités parasitaires dans le sang des oiseaux. Pour cela deux méthodes étaient à notre disposition : l'observation microscopique de frottis sanguins et la quantification des parasites sanguins par des outils moléculaires (PCR quantitative).

a. Observations microscopiques

L'observation au microscope nous a permis d'estimer le nombre de parasites présents dans les érythrocytes des oiseaux. Par la suite, cette étape quelque peu fastidieuse, a été remplacée par des méthodes de quantification moléculaire. Cependant, en certaines occasions, l'observation des frottis sanguins s'est révélée nécessaire. Pour certaines expériences nous avons voulu déterminer, non seulement les intensités parasitaires au fil des jours suivant l'infection, mais également la proportion des différents stades parasitaires. La discrimination de ces deux catégories de stades parasitaires s'est faite sur des critères morphologiques (décrit par Valkiūnas (2005), figure 1.3).

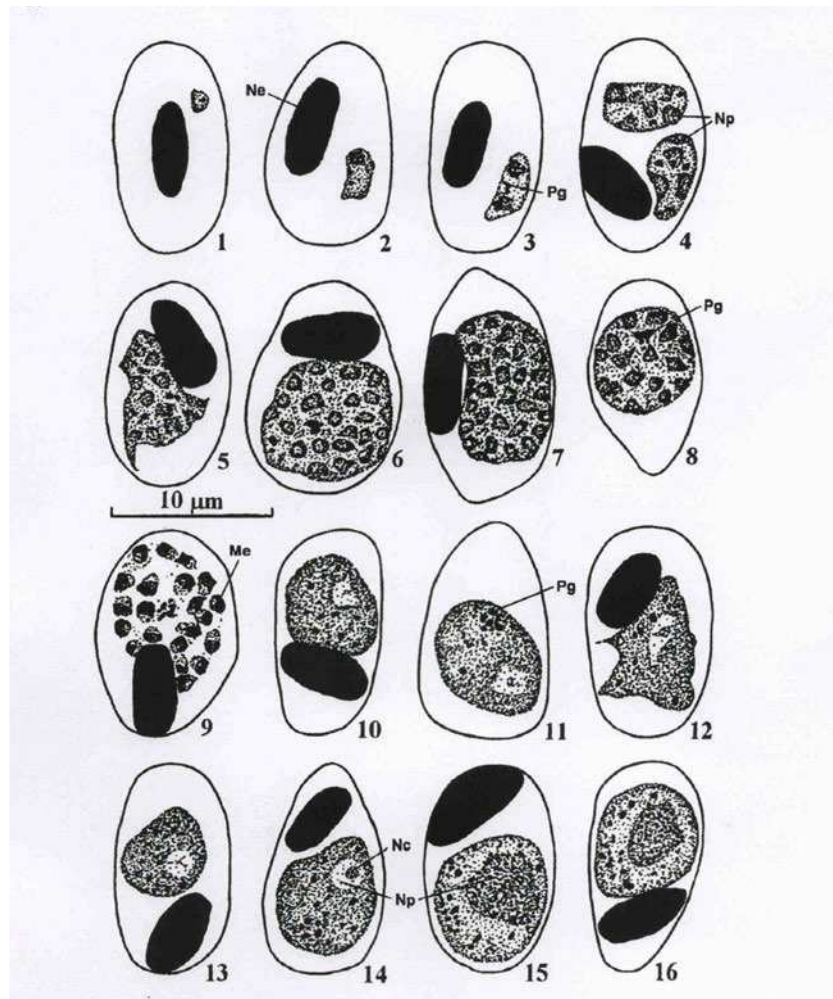


Figure 1.3 : Représentation des différents stades parasites de *Plasmodium relictum* dans le sang du moineau espagnol (*Passer hispaniolensis*). Figure extraite de Valkiūnas (2005).

1-2 : Trophozoïtes, 3-9 : Mérontes érythrocytaire, 10-14 : Macrogamétocytes, 15-16 : microgamétocytes.
Me = Mérozoïte, Ne = Nucleus de l'érythrocyte, Np = Nucleus du parasite, Pg = Granule pigmentée.

b. PCR quantitative

Nous avons mis au point un protocole de PCR quantitative afin d'estimer les intensités de *Plasmodium relictum* dans le sang des canaris. Ce protocole est présenté en détail dans l'annexe 1. Cette méthode est applicable plus largement à l'ensemble des associations *Plasmodium*-oiseaux.

La technique de PCR quantitative est basée sur la détection en temps réel d'une fluorescence émise au fur et à mesure de l'amplification de l'ADN cible. Pour cela nous utilisons une sonde marquée par deux fluorophores : en 5' un « Reporter » et en 3' un « Quencher ». L'émission de fluorescence du Reporter est absorbée par la proximité du

Quencher. La sonde est spécifique d'une partie de la séquence de l'ADN cible (de l'oiseau ou du parasite), et se fixe donc à cette dernière. Lors de l'amplification de l'ADN, la Taq polymérase, par son passage, dégrade la sonde et les deux fluorophores se trouvent séparés l'un de l'autre, se traduisant par une augmentation de la fluorescence du Reporter (figure 1.4). Ainsi cette augmentation du signal du Reporter est proportionnelle au nombre de copies d'ADN produit à chaque cycle de la PCR.

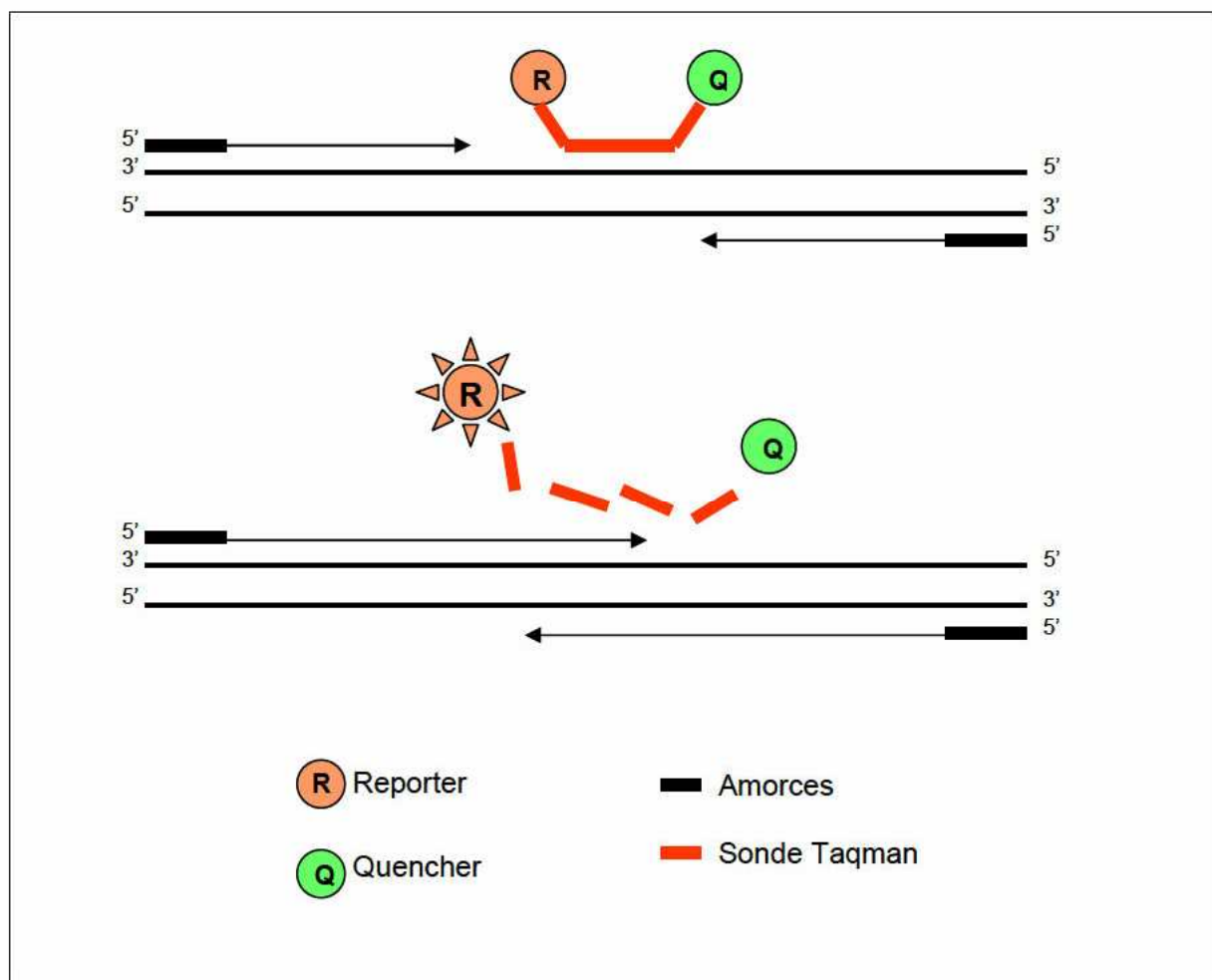


Figure 1.4 : Principe de la PCR quantitative

La sonde marquée de deux fluorophores (Reporter et Quencher) se fixe sur l'ADN cible. Lors de chacun des cycles de la PCR, la sonde est dégradée par le passage de la Taq polymérase. Lorsque le Reporter est séparé du Quencher, il émet une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle au nombre de copie d'ADN synthétisées.

Nous avons procédé à une quantification relative de l'ADN des parasites par rapport à celui de l'oiseau. Ainsi pour chaque échantillon (dont l'ADN a été extrait au phénol/Chloroforme) nous avons fait deux réactions de PCR différentes :

- une pour amplifier un fragment de 90 paires de bases d'ADN ribosomal 18s de *Plasmodium*.
- une prenant pour cible un fragment d'ADN ribosomal 18s de l'oiseau de 91 paires de bases.

Ces deux réactions ont été faites en même temps, dans deux puits différents de la même plaque PCR. La figure 1.5 représente les courbes d'émission de fluorescence de 44 échantillons correspondant à l'amplification de l'ADN des parasites (courbes supérieures) et des oiseaux (courbes inférieures).

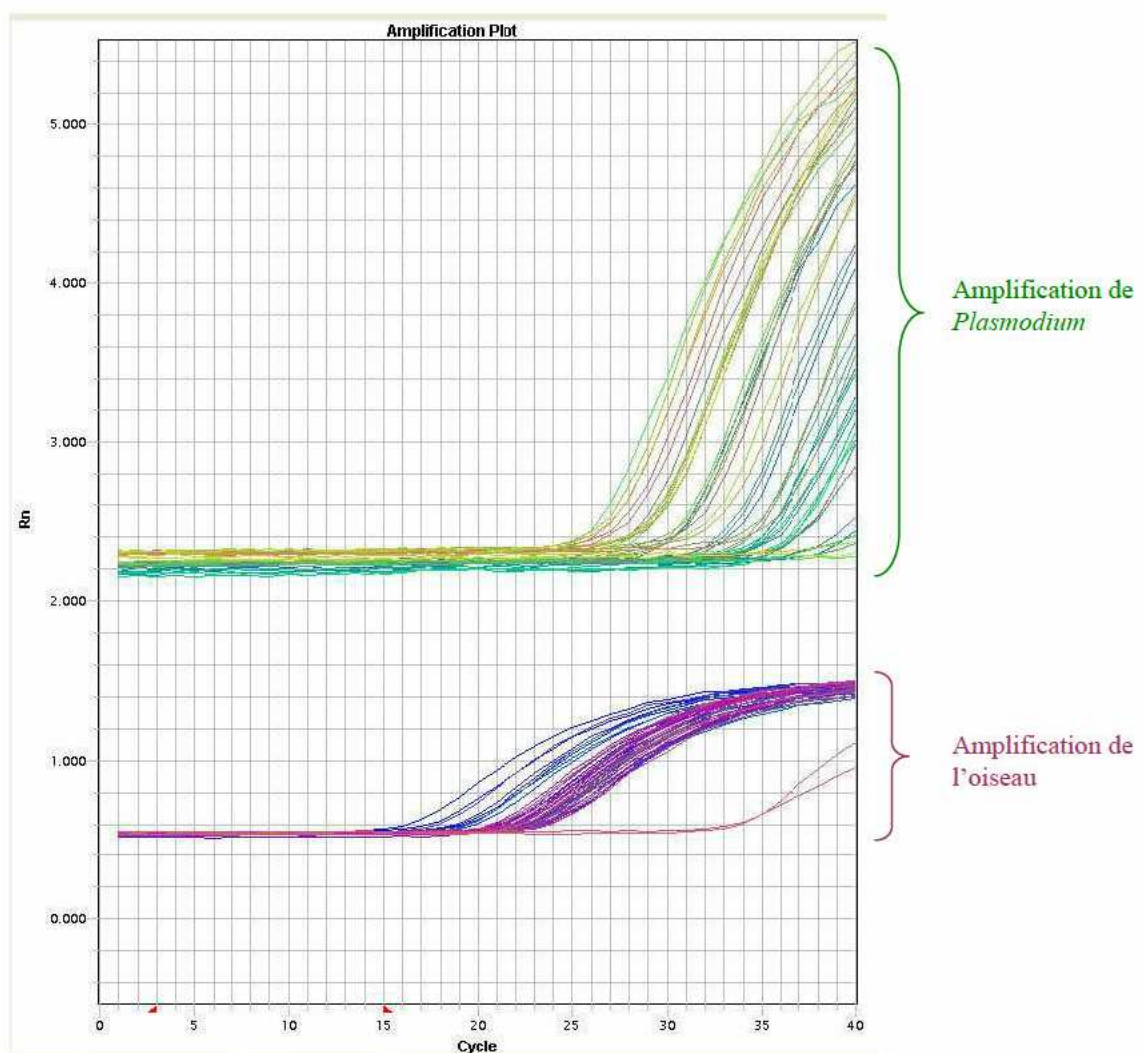


Figure 1.5 : Courbes d'émission de fluorescence au cours des cycles de la PCR quantitative

En abscisse est représenté le nombre de cycles de la PCR, en ordonnée l'intensité de la fluorescence émise. Les courbes supérieures correspondent à l'amplification de l'ADN de *Plasmodium*, les inférieures à l'amplification de l'ADN de l'oiseau pour les mêmes individus.

La valeur importante à extraire de la PCR quantitative est le moment où la fluorescence d'un échantillon sort du bruit de fond et devient significative. Ce moment correspond à un nombre de cycles et est appelé Ct (Threshold Cycle). Plus la valeur de Ct est faible, plus cela signifie que la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est importante puisque la fluorescence émise sort plus rapidement du bruit de fond.

Ainsi pour chaque échantillon nous disposons d'un Ct pour le parasite et d'un Ct pour l'oiseau. De ces deux valeurs nous calculons une valeur relative d'intensité parasitaire :

$$RQ = 2^{-(Ct \text{ Plasmodium} - Ct \text{ oiseau})}$$

La valeur de RQ oscille ainsi entre 0 et 1 (sauf pour de très fortes parasitémies où nous détectons le Ct du parasite avant celui de l'oiseau, ce qui est assez rare). Plus RQ est élevée, plus la quantité de parasite dans l'échantillon est forte. Les graphiques, présentés dans cette thèse, montrant les dynamiques de parasitémie au cours du temps suivant l'infection représentent majoritairement cette valeur de RQ (cela sera précisé dans la légende des dits graphiques).

6. Mesure de la virulence

Il n'est pas aisé de trouver une définition de la virulence qui satisfasse l'ensemble de la communauté scientifique (Bull 1994 ; Poulin et Combes 1999 ; Atkinson *et al.* 2009). Traditionnellement la notion de virulence était interprétée comme une augmentation des risques de mortalité de l'hôte suite à une infection parasitaire (Anderson et May 1983). Par la suite et en fonction des études, la virulence a été plus largement définie par rapport à la diminution de la fitness de l'hôte, à la transmissibilité du parasite ou bien à la capacité de ce dernier à se multiplier et à exploiter l'organisme hôte (Bull 1994 ; Poulin et Combes 1999 ; Sacristián et García-Arenal 2008 ; Atkinson *et al.* 2009). Nous avons choisi de considérer la virulence de nos parasites comme l'ensemble des dommages que ces derniers, par leur multiplication et leur développement, vont provoquer, directement ou indirectement, chez l'hôte. En plus d'un suivi des taux de mortalité des oiseaux, nous nous sommes concentrée sur deux autres aspects de leur condition physique : les variations de poids et d'hématocrite occasionnées par l'infection.

a. Variation de poids

Dans le cas d'infections par la malaria aviaire, de précédentes études ont pu nous montrer que les variations de poids des oiseaux pouvaient prendre différentes allures. Si Atkinson *et al.* (2001) ont mis en évidence que des oiseaux hawaïens (Solitaires d'Hawai : *Myadestes obscurus*) infectés expérimentalement par *Plasmodium relictum* perdaient du poids, d'autres études ont, au contraire, observé une augmentation de la masse consécutive à l'injection de parasites (exemples chez les poulets : Permin et Juhl 2002 avec *Plasmodium gallinaceum* ; Silveira *et al.* 2009 avec *Plasmodium juxtanucleare*). La variation de poids peut être fonction des espèces hôtes et parasites considérées, des conditions expérimentales, du comportement alimentaire des oiseaux ou encore de leur investissement énergétique dans la lutte contre l'infection.

b. Variation d'hématocrite

Le taux d'hématocrite d'un individu correspond au pourcentage d'éléments figurés dans le sang. Ce taux est obtenu par centrifugation d'un capillaire hépariné contenant du sang, puis par mesure du volume des cellules sanguines (très majoritairement des érythrocytes) par rapport au volume total (Figure 1.6).

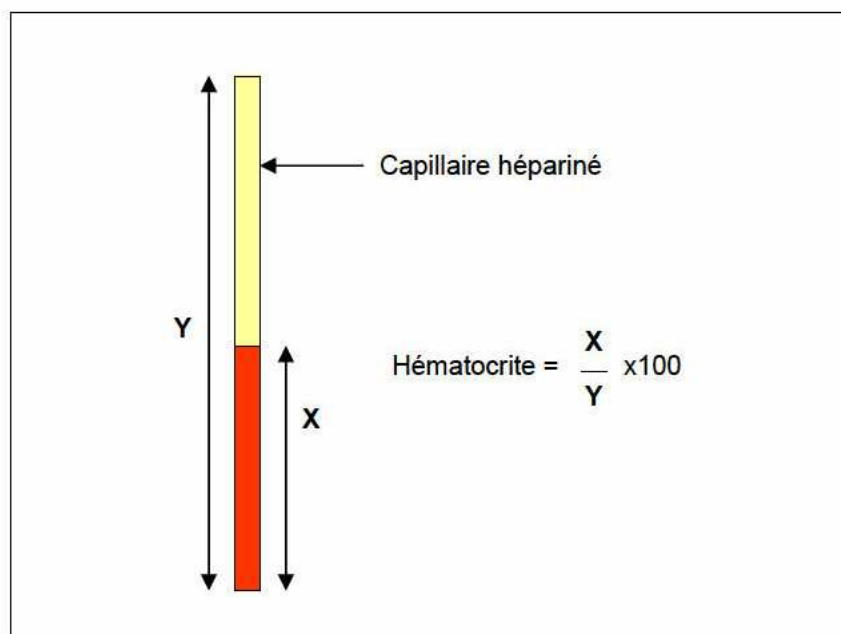


Figure 1.6 : Calcul du taux d'hématocrite des oiseaux.

X = Volume occupé par les cellules sanguines

Y = Volume total de sang dans le capillaire

L'hématocrite a été considéré, dans plusieurs études, comme un bon indice de l'état de santé de l'oiseau (Brown 1996, Potti *et al.* 1999, Jenni *et al.* 2006). En effet un faible taux d'hématocrite (c.à.d. une plus faible proportion d'érythrocytes) peut être le reflet d'une anémie chez l'oiseau, indiquer également une plus faible capacité à transporter l'oxygène dans les différents tissus de l'organisme, ceci pouvant impacter sur les performances de vol voire la survie de l'individu. Sachant que les parasites de la malaria se multiplient activement dans le sang des hôtes vertébrés, nous nous attendons à ce que pareille infection se traduise par une diminution importante des taux d'hématocrite des oiseaux. Mais en plus de la destruction mécanique des érythrocytes suite à la multiplication parasitaire, il est envisageable que l'infection, directement ou indirectement, crée des troubles au niveau de l'érythropoïèse (Timm *et al.* 2001).

7. Méthodes statistiques : les modèles à effet mixtes

L'ensemble et le détail des analyses statistiques sont exposés dans les différents manuscrits présents dans les annexes de cette thèse. Nous allons, dans cette partie, uniquement justifier le recours à certains modèles et statistiques majoritairement utilisés pour analyser les résultats des différentes expériences menées.

Comme nous l'avons exposé précédemment, le principe de nos expériences a été d'infecter des canaris domestiques, sous différents protocoles et conditions de laboratoire, puis de suivre au fil des jours post-infection la dynamique de multiplication des parasites ainsi que les changements de condition physique des oiseaux. Ainsi les mêmes individus ont été suivis à différents pas de temps après l'infection ; nous nous trouvons donc dans un cas de pseudoréplication temporelle puisque nos données ne sont pas indépendantes les unes des autres. En effet l'observation d'un individu à l'instant $t + 1$ devrait dans ce cas être fortement corrélée à l'observation faite du même individu à l'instant t . Les conditions classiques d'application des modèles à effets fixes ne sont plus alors respectées. Pour remédier à cela, et analyser nos données le plus justement possible, nous avons décidé d'avoir recours à des modèles à effets mixtes qui permettent de prendre en compte le fait que les variables ont été mesurées (comme les variations de poids et d'hématocrite) sur les mêmes individus, et ce, de façon répétée.

Les modèles à effets mixtes sont ainsi nommés car les variables explicatives se trouvent être un mélange d'effets fixes et d'effets aléatoires. Les effets fixes influencent la

moyenne de la variable réponse (ex : la variation d'hématocrite), alors que les effets aléatoires en influencent uniquement la variance. Ainsi pour analyser les variations d'hématocrite, de poids ou d'intensités parasitaires consécutives à nos infections expérimentales, nous avons considéré les variables explicatives (effets fixes) suivantes : le traitement appliqué à l'oiseau (ex : la dose de parasite, le traitement immuno-suppressif) ainsi que le temps post-infection afin de déterminer si les variables à expliquer présentent des changements temporels. Puis nous avons considéré, comme effet aléatoire, l'identité des individus.

L'analyse statistique et l'implémentation de ces modèles s'est majoritairement faite en utilisant le logiciel statistique R (version 2.10.0) (Ihaka et Gentleman 1996), ainsi que les packages suivants : nlme (*Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*, Pinheiro *et al.* 2010) et lme4 (*Linear mixed-effects models using Eigen and syntax*, Douglas et Maechler 2010). Ces packages sont disponibles à l'adresse suivante : <http://cran.r-project.org>). Pour vérifier les conditions d'applications de tels modèles, nous avons appliqué la méthode présentée par Pinheiro et Bates (2000) permettant de respecter les deux conditions suivantes :

- (1) les erreurs intra-groupes sont indépendantes et normalement distribuées, et indépendantes des effets aléatoires
- (2) les effets aléatoires sont normalement distribués et indépendants des différents groupes expérimentaux.

Pour les variations de poids et d'hématocrite, les conditions de normalité étaient respectées. En revanche pour les intensités de parasites, nous avons privilégié des distributions de type Poisson ou Gamma. Lorsque cela était nécessaire, nous avons privilégié des modèles hétéroscédastiques.

Enfin nous avons sélectionné les modèles les plus pertinents (avec ou sans interaction des effets fixes par exemple, homo- ou hétéroscédastiques) en utilisant comme méthode de choix de modèle le critère d'information d'Akaike (AIC).

Chapitre 2 : Première infection par le parasite

1. Dynamique de multiplication de *Plasmodium relictum* et virulence

Il existe assez peu d'informations sur la biologie et l'écologie de la plupart des parasites de la malaria aviaire, en particulier leur dynamique de développement pendant les toutes premières phases d'une infection, et leur impact sur la condition des hôtes. Même si la prévalence de la maladie peut être élevée dans certaines populations d'oiseaux, ce sont surtout par de faibles infections chroniques que les parasites se propagent (Valkiūnas 2005). Ainsi le taux de parasites que l'on peut trouver dans le sang des oiseaux reste souvent relativement faible, avec des phases de rechute se traduisant par une multiplication plus active des parasites, et une aggravation des symptômes de la maladie. Les coûts d'un tel parasitisme, où de faibles infections chroniques dominent, ne sont donc pas faciles à détecter, et nombreuses sont les études qui n'ont pu associer de telles infections à des coûts pour la fitness des hôtes (Weatherhead 1990 ; Woodworth *et al.* 2005 ; Valkiūnas 2006 ; Bensch *et al.* 2007).

Cependant il existe des preuves empiriques des effets négatifs que la malaria peut entraîner dans certaines populations d'oiseaux (Garnham *et al.* 1954 ; Hayworth *et al.* 1987 ; Atkinson *et al.* 2000 ; Spencer *et al.* 2005 ; Palinauskas *et al.* 2008 ; Zehtindjiev *et al.* 2008 ; Palinauskas *et al.* 2009). Par des expériences de médication (injection de produits anti-paludéens), des chercheurs ont souligné l'impact que des parasites des genres *Haemoproteus*, *Leucocytozons* et *Plasmodium* pouvaient avoir sur le succès de reproduction des mésanges bleues (*Parus caeruleus*, Merino *et al.* 2000), le chant des bruants à couronne blanche (*Zonotrichia leucophrys oriantha*, Gilman *et al.* 2007) ou encore la démographie des hirondelles de fenêtres (*Delichon urbica*, Marzal *et al.* 2005). De plus l'étude des effets dramatiques de la malaria sur des populations d'oiseaux endémiques des îles hawaïennes est devenu un cas d'école en malariologie (Van Riper *et al.* 1986 ; Atkinson *et al.* 2000 ; Yorinks et Atkinson 2000 ; Atkinson *et al.* 2001). Ainsi les coûts d'une infection par la malaria aviaire sont susceptibles d'être plus importants que ce qui est communément pensé.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons voulu caractériser la dynamique de multiplication de *Plasmodium relictum* (lignée SGS1) dans le sang de canaris domestiques et décrire l'impact de cette infection sur la condition des oiseaux. Récemment, Palinauskas *et al.* (2008 et 2009) ont expérimentalement infectés six espèces de passereaux (le pinson des

arbres : *Fringilla coelebs*, le bec croisé des sapins : *Loxia curvirostra*, le moineau domestique : *Passer domesticus*, le tarin des aulnes : *Spinus spinus*, l'étourneau sansonnet : *Sturnus vulgaris* et le verdier d'Europe : *Carduelis chloris*) avec cette même lignée de parasites aviaires. La conclusion de leurs travaux est que la multiplication parasitaire et son impact sur l'hôte vont dépendre du système *Plasmodium relictum*-oiseaux considéré. La figure 2.1, extraite de Palinauskas *et al.* (2008), montre, à ce sujet, les dynamiques de parasitémie de *Plasmodium relictum* (SGS1) dans quatre espèces d'hôtes.

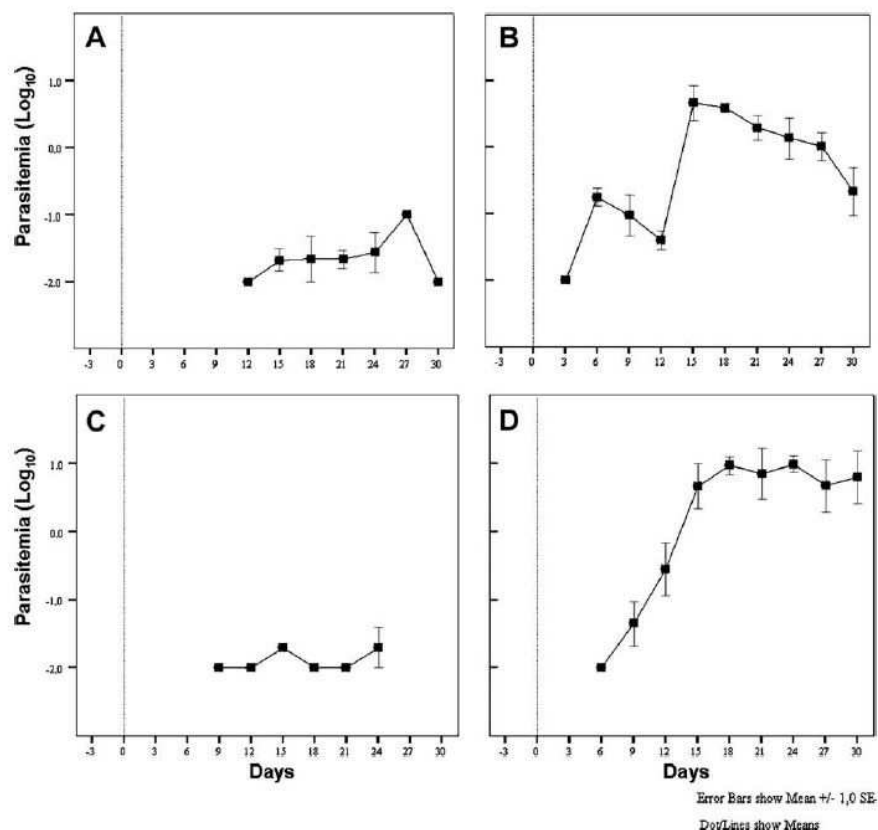


Figure 2.1 : Dynamiques de multiplication de *Plasmodium relictum* (souche SGS1) dans le sang de 4 espèces d'oiseaux expérimentalement infectés
 (A) *Fringilla coelebs* (B) *Loxia curvirostra* (C) *Passer domesticus* (D) *Spinus spinus*.
 Figure extraite de Palinauskas *et al.* (2008)

Nous avons donc conduit la même expérience chez les oiseaux d'élevage que nous avons pris comme modèle tout au long de nos travaux. Caractériser la dynamique parasitaire et les signes de virulence dans notre système *Plasmodium relictum*-canaris, nous a permis de construire le socle sur lequel ce sont basées toutes les expériences qui ont suivi.

Après avoir infecté 18 canaris avec une dose d'un million de parasites, nous avons suivi la multiplication de ces derniers et leurs impacts pendant une vingtaine de jours

(Annexe 2). Une fois entrés en contact avec l'hôte, les parasites se multiplient dans le sang jusqu'à atteindre un pic de parasitémie aux alentours de 14 jours après l'infection (Figure 2.2). Nous nous sommes rendue compte au fil de nos expériences que le moment du pic de parasitémie pouvait varier entre 8 et 14 jours, ce qui laisse supposer une certaine variabilité en fonction des conditions expérimentales (moment de l'expérience, caractéristiques des clones de parasites récupérés en population naturelle, origine des canaris). Après le pic, le nombre de parasites diminue jusqu'à atteindre de très faibles parasitémies, voir même ne plus être détectable dans le sang des oiseaux. Trois mécanismes peuvent être à l'origine d'un tel déclin (Gupta *et al.* 1994 ; McQueen et McKenzie 2008 ; Kochin *et al.* 2010) : (1) une réponse immunitaire spécifique de l'hôte contre l'infection (2) la réponse immunitaire innée de l'hôte (3) une diminution des ressources nécessaires pour la réplication des parasites (ex : une diminution du nombre de globules rouges susceptibles d'être infectés).

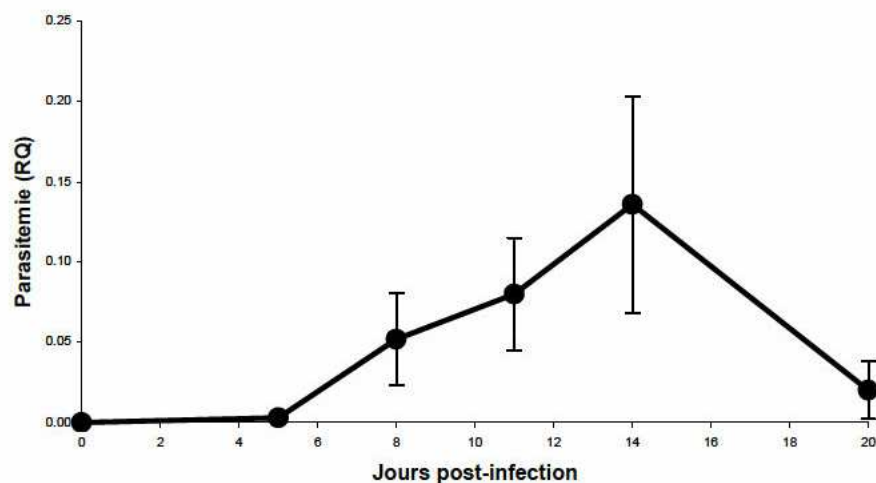


Figure 2.2 : Dynamique de multiplication de *Plasmodium relictum* (SGS1) dans le sang de canaris domestiques expérimentalement infectés.
Figure extraite de l'annexe 2

À cette multiplication parasitaire ont été associés des coûts pour les oiseaux, notamment une mortalité de 33% des individus expérimentalement infectés et une anémie visible par une diminution significative du taux d'hématocrite des oiseaux (Figure 2.3). En effet une des conséquences du développement des parasites dans le sang est la destruction des globules rouges de l'oiseau. Cette perte d'hématocrite peut également venir d'une dysérythropoïèse (anomalie dans la production même des globules rouges), ce qui pourrait

être vu comme une stratégie de la part de l'hôte pour diminuer le nombre de parasites en limitant les ressources nécessaires à leurs répliquations.

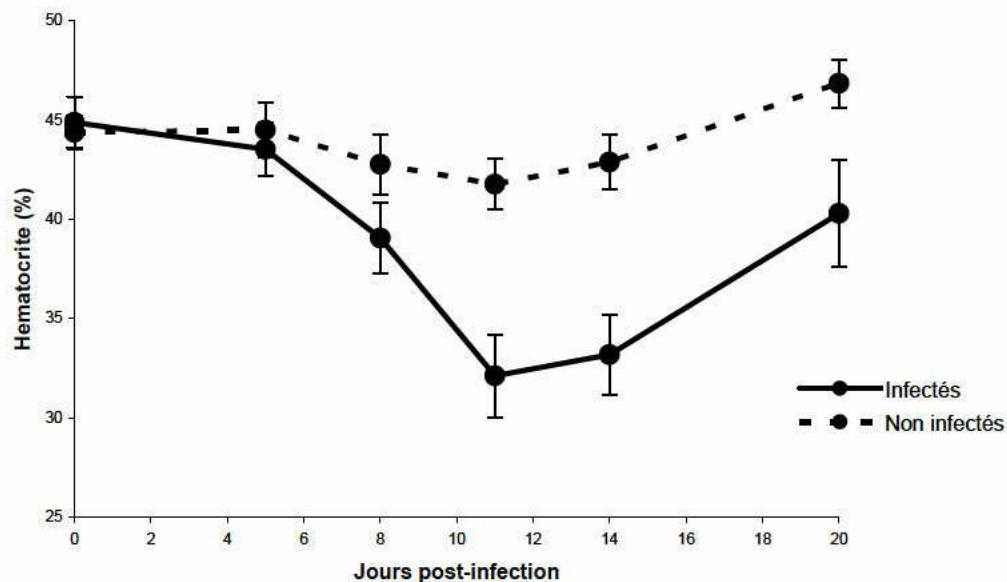


Figure 2.3 : Comparaison des dynamiques des taux d'hématocrite entre des canaris expérimentalement infectés par *Plasmodium relictum* (SGS1) et des canaris contrôles ayant juste reçu du sang non contaminé. Figure extraite de l'annexe 2.

Nos résultats de multiplication et de virulence des parasites sont globalement en accord avec ceux trouvés par d'autres études basées, elles aussi, sur l'infection expérimentale d'oiseaux sauvages ou domestiques par la malaria aviaire (Permin et Juhl 2002 ; Palinauskas *et al.* 2008 ; Zehtindjiev *et al.* 2008 ; Silveira *et al.* 2009). Nous notons cependant des différences quant au moment du pic de l'infection, à la rapidité d'élimination des parasites sanguins ou encore aux taux de mortalités obtenus. Le fait que, entre ces différentes études, les espèces hôtes divergent et que les parasites proviennent de populations naturelles d'oiseaux différentes (ce qui peut entraîner des différences de virulence) peut expliquer la dissemblance des résultats.

2. Impacts de la dose infectieuse

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction de cette thèse, de nombreux facteurs sont susceptibles d'agir sur l'issue de l'interaction entre un parasite et son hôte. Dans l'objectif de comprendre et d'expliquer les hétérogénéités de virulence des parasites de la malaria aviaire, nous avons voulu tester l'impact de la dose infectieuse qu'un oiseau va

recevoir. Il serait aisé de penser que plus un individu reçoit de parasites, plus cela va impacter négativement sur sa condition. Si des raisons théoriques et expérimentales nous permettent d'arriver à cette conclusion, un certain nombre d'arguments peut nous laisser penser le contraire.

Pourquoi la dose de parasites agirait sur la virulence ?

Plus un individu reçoit de parasites, moins il dispose de temps pour monter une réponse immunitaire contre l'infection avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie (Marsh 1992). Des études expérimentales apportent quelques crédits à cette hypothèse, montrant notamment qu'après l'injection d'une faible dose de parasites, la période prépatente est plus longue et le pic de parasitémie plus tardif (Boyd 1925 ; Hewitt 1942 ; Jones *et al.* 1993 ; Timms *et al.* 2001 ; Permin et Juhl 2002). De plus, plus la dose est faible, plus l'hôte dispose de temps pour anticiper les coûts de l'infection et s'y préparer. Dans le cas de la malaria, si l'érythropoïèse est stimulée avant que trop de globules rouges ne soient détruits par les parasites, l'hôte pourrait de cette façon mieux supporter l'infection par une anémie moins importante (idée développée par Timms *et al.* 2001). Enfin augmenter la dose de parasites revient également à augmenter la compétition entre ces derniers au sein de l'hôte, ce qui pourrait conduire à la sélection des souches les plus virulentes.

Pourquoi la dose de parasites n'agirait pas sur la virulence ?

Nous pourrions également envisager que la dose détermine uniquement la capacité des parasites à infecter avec succès un hôte, mais qu'au-delà de ce seuil le nombre de parasites n'impacte pas sur l'issue de la maladie. Une telle dissociation entre le nombre de parasites et son effet sur l'hôte pourrait être concevable dans un système où les symptômes de la maladie ne sont pas uniquement dus à la densité de parasites mais également à d'autres facteurs tels que la production de toxines par les agents infectieux (McKerrow *et al.* 1993 ; Salcedo et Holden 2005 ; Belyi *et al.* 2006), ou encore la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection (Graham *et al.* 2005a ; Sorci et Faivre 2009). Ce dernier point sera détaillé dans la cinquième partie de cette thèse. Enfin une forte dose infectieuse pourrait ne pas représenter des coûts que pour l'hôte mais également pour les parasites eux-mêmes. En effet les parasites se développant dans les hôtes les plus infectés pourraient payer un coût important par la mortalité de l'hôte (empêchant ainsi la transmission à de nouveaux individus), mais aussi par une réduction de leur fitness à cause de la compétition pour les ressources de l'hôte. Tout ceci

pourrait résulter en une relation non-linéaire entre le nombre de parasites infectant un hôte et la gravité des symptômes observés (régulation de la virulence des parasites)

D'autres études ont auparavant testé l'impact de la dose de parasites dans le cas de la malaria aviaire. Permin et Juhl (2002) ont, par exemple, infecté des poulets avec trois doses de *Plasmodium gallinaceum* mais n'ont pu mettre en évidence de réelles relations entre la dose infectieuse et la gravité de la maladie. Dans la première moitié du 20^{ème} siècle, des études ont par contre pu montrer qu'une dose élevée de *Plasmodium relictum* diminuait la durée de la période prépatente (Boyd 1925 ; Wolfson 1945) mais aucune relation avec la condition des hôtes n'a été recherchée.

Dans le travail de thèse, présenté ici, nous avons testé l'impact de quatre doses de *Plasmodium relictum* (lignée SGS1) sur des canaris domestiques (annexe 3). Les doses utilisées étaient les suivantes : 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 parasites. Toutes ces doses ont pu initier des infections chez les oiseaux. Pour certains systèmes hôtes-parasites un nombre minimal de parasites est nécessaire pour permettre le succès d'une infection (Boyd 1925 ; Chu et Volety 1997 ; De Roode *et al.* 2009). Il semblerait ici que 1000 parasites soient suffisants pour permettre l'établissement de *Plasmodium relictum* au sein des canaris.

En ce qui concerne les dynamiques de multiplications parasitaires et leurs impacts sur les hôtes nous avons obtenu des résultats assez contrastés. Comme représenté sur la figure 2.4, une injection croissante de parasites n'a pas entraîné une parasitémie croissante dans le sang des canaris. En effet un contraste important est visible entre la plus forte dose (un million de parasites) et les autres. Ce résultat s'ajoute à ceux d'autres études qui n'ont pu relier la dose infectieuse au pic de parasitémie en résultant (Boyd 1925 ; Hewitt 1942 ; Glynn et Bradley 1995 ; Glynn *et al.* 1995 ; Permin et Juhl 2002).

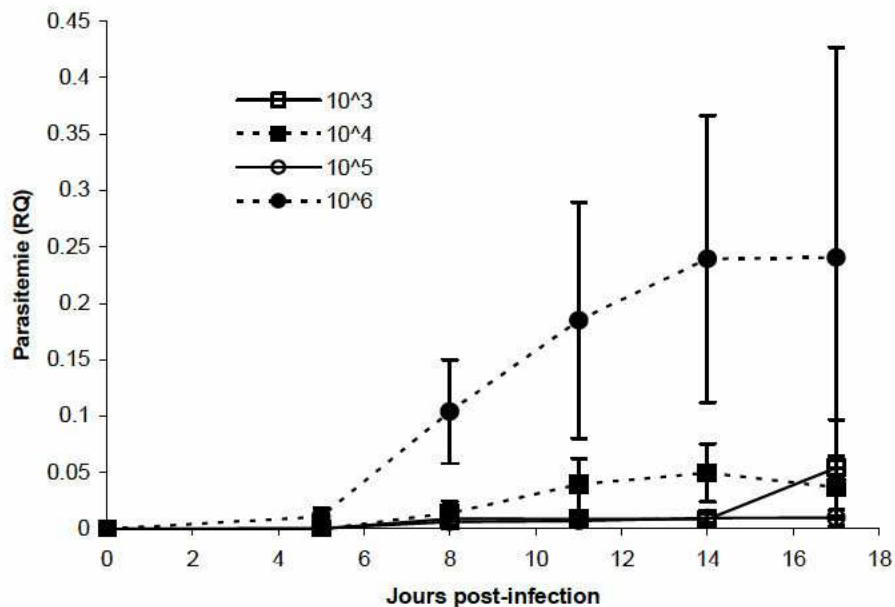


Figure 2.4 : Dynamique des parasitemies de *Plasmodium relictum* injecté à différentes doses à des canaris domestiques.

Figure extraite de l'annexe 3

Est-ce que l'injection d'un nombre croissant de parasites provoque des symptômes de plus en plus graves ? Une fois encore, nous obtenons des résultats contrastés sur la relation entre dose infectieuse et virulence. Ce qui ressort néanmoins assez clairement de notre étude est que la plus forte dose (un million) provoque la plus forte perte d'hématocrite, et surtout se distingue des autres par la perte de poids qu'elle impose à l'oiseau (figure 2.5). Si les autres doses n'entraînent pas de perte de poids, elle provoquent néanmoins une diminution des taux d'hématocrite chez les oiseaux (figure 2.6).

La compétition entre parasites au sein d'un hôte a été suggérée être un facteur important dans l'évolution de la virulence de ces derniers (De Roode *et al.* 2005), et ceci pourrait expliquer les résultats que nous obtenons après l'injection d'un million de parasites. Pour une telle dose les parasites présentant les taux de multiplication les plus élevés et/ou les meilleures stratégies d'exploitation de l'hôte pourraient être avantagés.

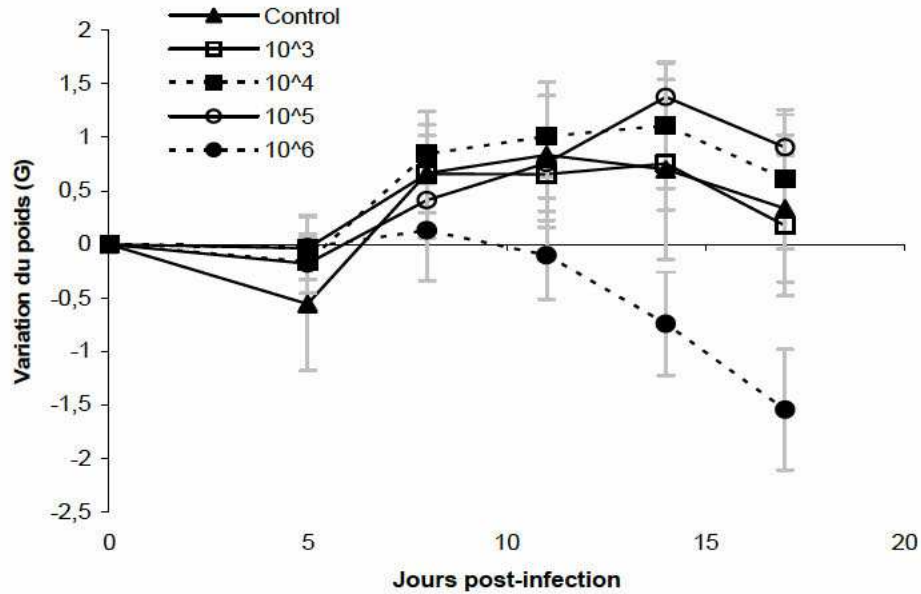


Figure 2.5 : Dynamique des variations de poids de canaris domestiques expérimentalement infectés avec différentes doses de *Plasmodium relictum* (SGS1).
Figure extraite de l'annexe 3

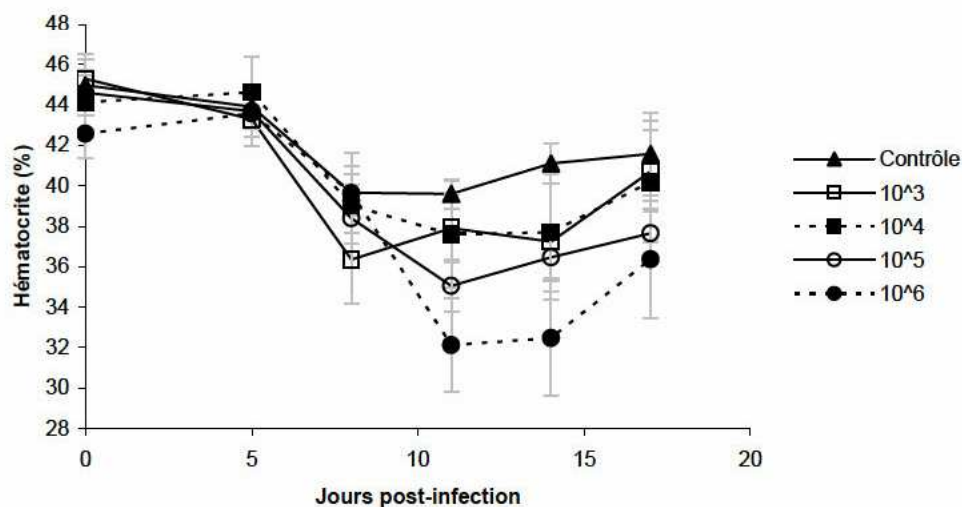


Figure 2.6 : Dynamique des taux d'hématocrite de canaris domestiques expérimentalement infectés avec différentes doses de *Plasmodium relictum* (SGS1).
Figure extraite de l'annexe 3

Quel pourrait être le lien entre la dose infectieuse et la probabilité de transmission au vecteur ? Il a été montré que la mortalité du vecteur pouvait être *Plasmodium*-densité dépendante (Dawes *et al.* 2009). Une diminution, même faible, de la durée de vie du vecteur pourrait provoquer des changements importants des taux de transmission des parasites. Ainsi

les parasites présentant de forts taux de multiplication pourraient avoir un avantage en terme d'exploitation de l'hôte, mais ceci pourrait être balancé par les coûts de la mortalité de l'hôte d'une part, et du vecteur d'autre part. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet que la dose infectieuse pourrait avoir sur l'évolution des interactions hôtes-parasites, en particulier sur l'évolution de la virulence. C'est ce que nous exposerons dans la partie 6 de cette thèse.

3. Comment les interactions sociales entre oiseaux peuvent moduler les coûts de la malaria aviaire ?

Le plus souvent lorsque l'on désire estimer les coûts d'une infection parasitaire, on compare une population saine avec son équivalent infecté. On mesure ainsi les effets directs du parasite pour son hôte. Cependant une telle méthodologie ne permet pas de prendre en compte les relations entre individus, et en particulier la façon dont les interactions sociales vont moduler le coût du parasitisme. Nous savons que le parasitisme peut modifier le comportement des hôtes, leur physiologie, leur prise alimentaire, leur sensibilité au stress, créant ainsi de l'hétérogénéité dans la population hôte (Brown et Pascoe 1989 ; Thomas *et al.* 1998 ; Thompson *et al.* 2001 ; Rivero et Ferguson 2003) et modifiant potentiellement les relations de compétition entre individus. On peut ainsi se demander comment le parasitisme va agir sur le statut social de l'hôte et modifier son rapport aux autres. Les conséquences évolutives de la modification des relations de compétition entre hôtes par le parasitisme n'ont que peu été considérées, et encore moins incluses dans les modèles d'évolution de la virulence (Frank 1996 ; Van Baalen 1998 ; Gandon *et al.* 2001 ; Day et Burns 2003).

L'impact d'une infection parasitaire pourrait ne pas dépendre uniquement des effets du parasite pour l'hôte, mais également du statut infectieux des autres individus de la population considérée. Imaginons par exemple une population avec une faible prévalence de parasites, les individus infectés interagissent donc plus souvent avec des congénères sains que porteur de l'agent pathogène. Les individus infectés pourraient ainsi payer un coût supplémentaire. Si c'est le cas, la virulence serait dépendante de la prévalence du parasite dans la population.

Dans la littérature, on ne trouve que peu d'informations sur l'influence des haemosporidiens sur le comportement des oiseaux, en particulier sur leurs interactions sociales au sein de la population (Valkiūnas 2005). Il a été montré chez le lézard *Sceloporus occidentalis* que les individus infectés par *Plasmodium mexicanum* se comportaient plus

souvent comme des subordonnés que les individus sains (Schall 1983 ; Schall et Dearing 1987). Chez les oiseaux, de telles études manquent encore. Nous savons que des hiérarchies sociales peuvent s'établir dans de nombreuses populations d'oiseaux, avec présence d'individus dominants et subordonnés. Les dominants ont généralement un meilleur accès à la nourriture et se trouvent moins exposés à la prédation. De telles relations de dominance ont été montrées existantes chez les canaris domestiques, en particulier dans des conditions de restrictions alimentaires (Parisot *et al.* 2004)

En prenant pour modèle la malaria aviaire, nous avons testé les effets d'une interaction triple entre la prévalence des parasites, le statut infectieux de l'hôte et le statut social sur les coûts payés par l'oiseau (annexe 4), ceci dans un contexte où la nourriture est limitée (laissant le champ libre aux relations de compétition entre individus). Une telle étude n'a, à notre connaissance, jamais été menée chez des vertébrés. Bedhomme *et al.* (2005) ont montré chez les moustiques de la fièvre jaune (*Aedes aegypti*) que le coût d'une infection par *Vavraia culitis* était dépendant du statut infectieux des congénères, et qu'un tel parasitisme modifiait l'intensité de la compétition entre individus.

Nous avons donc mis en contact des canaris dominants et subordonnés (protocole de détermination du statut social détaillé dans l'annexe 4), appliquant différentes combinaisons de statut infectieux (figure 2.7) et mettant les oiseaux dans des conditions de restrictions alimentaires.

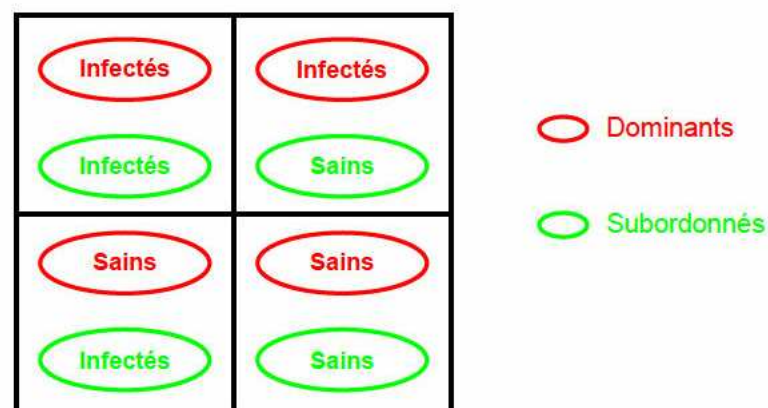


Figure 2.7 : Plan de l'expérience que nous avons menée.
 Dans chaque cage, 3 dominants (infectés ou non) et 3 subordonnés (infectés ou non) ont été mis en contact.
 Chacune des combinaisons a fait l'objet de quatre replicats.

Nous avons pu montrer que les coûts d'une infection par la malaria aviaire dépendaient du statut social de l'hôte et du statut infectieux des congénères de la population

(annexe 4). Avant de commencer cette expérience nous avons avancé certaines prédictions quant aux résultats supposés. L'ensemble de ces prédictions est représenté schématiquement sur la figure 2.8, et est à comparer avec les résultats obtenus pour les taux de mortalité et d'hématocrite présentés dans les figures 2.9 et 2.10 :

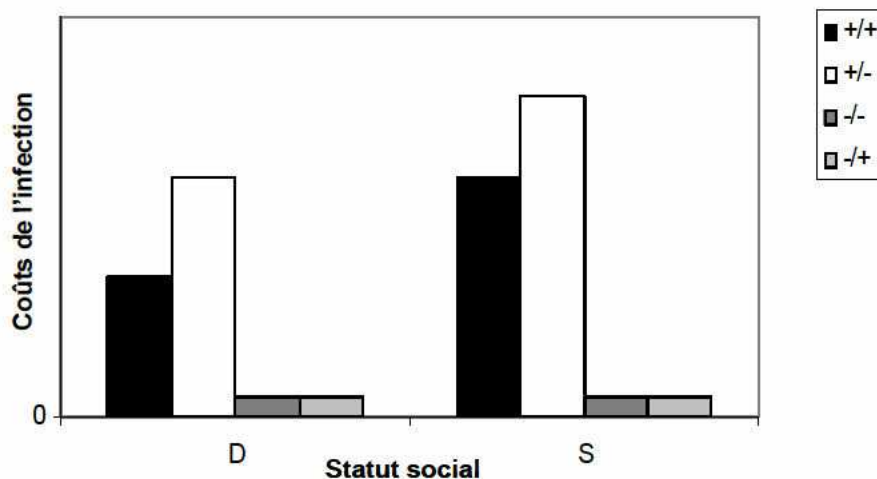


Figure 2.8 : Prédictions avancées avant la mise en place de l'expérience

D = Dominant, S = Subordonné, + = Infecté, - = Non-infecté

X/Y : X = statut infectieux des oiseaux dont on a mesuré les coûts

Y = statut infectieux des autres oiseaux de la cage

Figure extraite de l'annexe 4

(1) *Les coûts d'une infection par la malaria aviaire dépendent du statut social de l'individu et de la prévalence du parasite dans la population*

Il semblerait que cela soit le cas. En effet nous avons pu mettre en évidence que les coûts payés par les canaris (notamment la mortalité et la perte d'hématocrite) étaient dépendants d'une interaction triple entre, bien sûr, le statut infection mais aussi avec le statut social et le statut infectieux des individus avec lesquels ils sont en compétition pour les ressources alimentaires.

(2) *L'infection parasitaire ajoute un coût supplémentaire à la compétition entre individus*

Nous avons, en effet, pu observer que les individus infectés payaient plus de coûts que ceux qui ne l'étaient pas, tant en terme de mortalité que de perte d'hématocrite. Une seule exception est à noter : les dominants non infectés présentent des taux de mortalité élevé quand ils sont au contact de subordonnés, eux aussi, non infectés. Nous expliciterons ce résultat par la suite.

(3) Les individus infectés paieront un coût supplémentaire s'ils sont au contact d'individus sains

Il semblerait que cela soit le cas pour les individus dominants, mais pas pour les subordonnés. En effet les subordonnés infectés présentent des pertes d'hématocrite plus importantes quand ils sont au contact de dominants infectés que non infectés. Ceci pourrait s'expliquer par un comportement plus agressif des dominants suite à l'infection.

(4) Les subordonnés devraient payer un coût plus important que les dominants

Puisque les dominants ont un meilleur accès aux ressources, sont plus compétiteurs, nous supposons qu'ils pourraient du fait mieux gérer l'infection. Nos résultats indiquent le contraire. En effet les dominants présentent des taux de mortalité plus élevés en général, même dans le cas où, dans une même cage, tous les individus sont non-infectés. Les dominants prennent l'avantage uniquement lorsqu'ils sont sains et que les subordonnés sont, eux, infectés. Les oiseaux semblent donc payer un coût à leur statut de dominance. Nous ne disposons pas de données endocrinologiques ou immunologiques qui pourraient être associées à un tel résultat. Cependant nous pouvons faire l'hypothèse que le statut de dominance soit lié à des différences de taux d'hormones (en particulier des hormones de stress) (Goymann et al. 2004 ; Goymann et Wingfield 2004). Les individus pourraient gérer ces différences lorsque les conditions sont favorables vu qu'ils ont un accès privilégié à la nourriture et une meilleure protection face à la prédation. Cependant dans le contexte de restriction alimentaire que nous avons créé, les coûts liés la dominance pourraient s'exprimer de façon plus intense. Cette hypothèse reste néanmoins à tester.

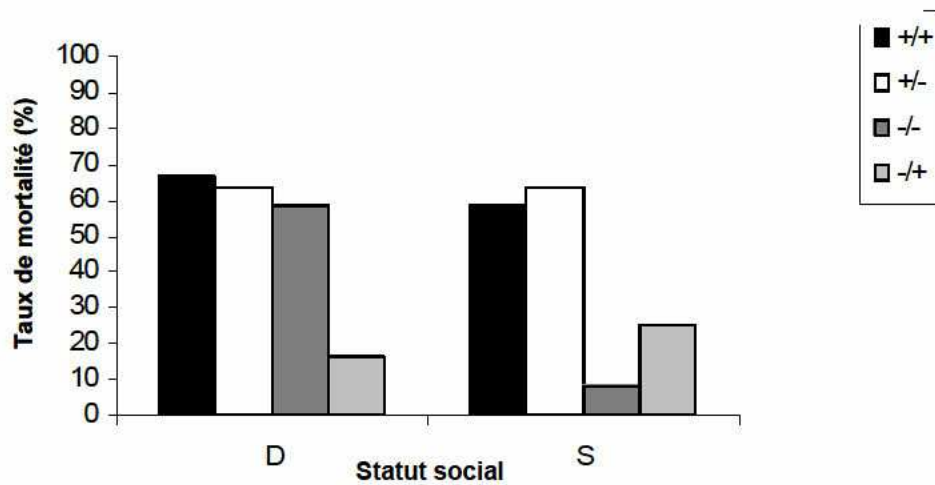


Figure 2.9 : Taux de mortalité des canaris en fonction de leur statut social, parasitaire et du statut infectieux des congénères présents dans la même cage.

D = Dominant, S = Subordonné, + = Infecté, - = Non-infecté
 X/Y : X = statut infectieux des oiseaux dont on a mesuré les coûts
 Y = statut infectieux des autres oiseaux de la cage
 Figure extraite de l'annexe 4

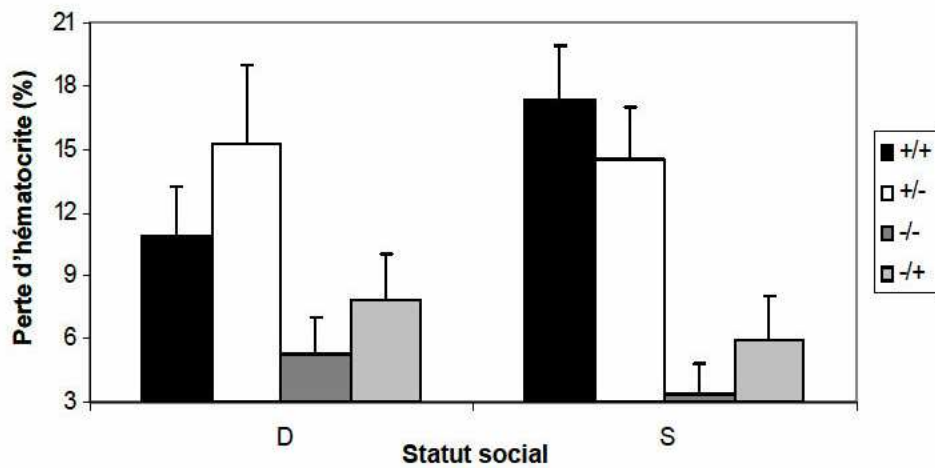


Figure 2.10 : Perte d'hématocrite des canaris en fonction de leur statut social, parasitaire et du statut infectieux des congénères présents dans la même cage.

D = Dominant, S = Subordonné, + = Infecté, - = Non-infecté
 X/Y : X = statut infectieux des oiseaux dont on a mesuré les coûts
 Y = statut infectieux des autres oiseaux de la cage
 Figure extraite de l'annexe 4

4. Comparaison de deux lignées génétiquement proches : SGS1 et GRW11

Dans le cadre d'une maladie infectieuse, il est fréquent que l'hôte soit infecté par plusieurs lignées de parasites, génétiquement distinctes (Read et Taylor 2001). Ces lignées peuvent différer dans leurs prévalences, leurs distributions géographiques (Wood *et al.* 2007 ; Ishtiaq *et al.* 2010), et potentiellement dans leurs virulences (Read et Taylor 2001). Les interactions intra-hôte entre ces lignées peuvent influencer la gravité des symptômes de la maladie infectieuse considérée mais également son épidémiologie et son évolution (Read et Taylor 2001 ; Bell *et al.* 2006). Des modèles théoriques ont en effet démontré que la compétition s'exerçant entre lignées de parasites génétiquement distinctes pouvait être considérée comme un facteur important dans l'évolution de la virulence des parasites (Frank 1996). Dans le cadre de la malaria, il existe un grand nombre de lignées parasitaires, estimé par certains auteurs à environ 10.000 (Bensch *et al.* 2004), et plusieurs d'entre elles peuvent coexister au sein des mêmes espèces hôtes. Cependant cette diversité n'est que peu considérée par les études portant sur l'écologie et l'évolution de la malaria.

Nous avons choisi d'aborder cette diversité génétique, et ses conséquences en terme de virulence, en procédant à la comparaison de deux lignées de *Plasmodium relictum* génétiquement distinctes. Nous nous sommes focalisée, dans le cadre de cette thèse, sur la lignée SGS1 de ce parasite pour des raisons d'ordre pratique, puisque cette dernière est majoritaire dans les populations de moineaux domestiques que nous échantillonnons. Cependant, d'autres lignées coexistent avec elle, en particulier la lignée GRW11, associée à l'espèce *Plasmodium relictum* par Perez-Tris et Bensch en 2005. Est-ce que ces deux lignées diffèrent dans leurs stratégies d'exploitation de l'hôte et dans leur virulence ? Nous proposons de répondre à cette question en procédant à l'infection expérimentale de canaris avec les lignées SGS1 et GRW11, puis de comparer leurs dynamiques de multiplication ainsi que leurs impacts pour les hôtes. Le tableau 2.1 présente les séquences cibles dont nous nous sommes servi pour discriminer les deux lignées (séquences génomiques du cytochrome b, disponible dans la base de données GenBank)

***Plasmodium relictum* SGS1**

```
caactggtgc ttcatttgta tttattttaa cttattttaca tatttttaaga ggattaaatt
attcatattc atattttacct ttatcatgga tatctggatt aataatattt ttaatatcta
tagtaacagc ttttatgggt tacgtattac cttgggggtca aatgagtttc tgggggtgcta
ccgtaataac taattttatta tatttttatac ctggactagt ttcattggata tgtgggtggat
atcttgtaag tgacccaacc ttaaaaagat tctttgtact acattttaca tttcctttta
tagctttatg tattgtattt atacatatac tctttctaca tttacaaggc agcacaaatc
cttttagggtg tgatacagct ttaaaaatac ccttctatcc aaatctttta agtcttgata
ttaaaggatt taataatgta ttagtactat ttttagcaca aagtttattt ggaatact
```

478 pdb

GenBank : AF495571.1 (Waldenström et al. 2002)

***Plasmodium relictum* GRW11**

```
gcaactggtg cttcatttggt atttatttta acttattttac atatttttaag aggattaaat
tattcatatt catattttacc tttatcatgg atatctggat taataatatt tttaatatct
atagtaacag cttttatggg ttacgtatta ccttgggggtc aaatgagttt ctgggggtgct
accgtaataa ctaattttatt atattttata cctggactag tttcatggat atgtgggtgga
tatcttgtaa gtgacccaac cttaaaaaga ttctttgtac tacattttac atttcctttt
atagctttat gtattgtatt tatacatata ttctttctac atttacaagg tagcacaaat
ccttttagggt atgatacagc tttaaaaata ccttctatc caaatctttt aagtcttgat
attaaaggat ttaataatgt attagtacta tttttagcac aaagtttatt tgggaatact
```

479 pdb

GenBank : AY831748.1 (Perez-Tris et Bensch 2005)

Tableau 2.1 : Séquences génomiques du cytochrome B des lignées SGS1 et GRW11 de *Plasmodium relictum*.
Le surlignage jaune indique les différences de paires de bases (pdb) entre les deux séquences.

Nos observations nous permettent d'avancer l'idée que SGS1 présente une prévalence plus élevée dans la population de moineaux domestiques visée par la présente étude (Centre hippique : Etrier de Bourgogne à Dijon). Nous ne disposons malheureusement pas d'un suivi épidémiologique suffisamment poussé pour le vérifier.

Ainsi 30 canaris ont reçu une injection de 500.000 parasites de type *Plasmodium relictum*-lignée SGS1, 30 une dose équivalente de *Plasmodium relictum*-lignée GRW11 et enfin 30 individus contrôles n'ont reçu que du sang non parasité. Après l'infection, nous avons suivi les dynamiques de multiplication des parasites, les variations de poids et d'hématocrite des oiseaux ainsi que les taux de mortalité au fil des jours. Les résultats statistiques de cette expérience, ne faisant pas encore l'objet d'un article scientifique, seront présentés sous forme de tableaux ou insérés directement dans le corps du texte.

Les mêmes individus ont été suivis pendant plusieurs jours, nous avons considéré et construit des modèles à effets mixtes afin d'expliquer les variations de parasitémie et de condition des oiseaux en considérant la variable « individu » comme effet aléatoire (le détail des méthodes statistiques utilisées est donné dans le chapitre 1 de cette thèse)

a. Comparaison des virulences de SGS1 et GRW11

Les oiseaux présentent une perte de poids significative, consécutive à l'injection de parasites, mais ce résultat est similaire pour les deux lignées de *Plasmodium relictum* considérée (figure 2.11, tableau 2.2). En revanche l'impact de SGS1 et GRW11 diffèrent quelque peu quant à la perte d'hématocrite que l'infection provoque (figure 2.12, tableau 2.3). En effet, même si les deux types d'infection entraînent une diminution du taux de globules rouges pour les oiseaux, cette perte est significativement plus importante pour les individus ayant reçu *Plasmodium relictum*-GRW11. Le minimum d'hématocrite est atteint dans les deux cas aux alentours de 11 jours après l'infection, puis les taux d'hématocrite augmentent pour se rejoindre à la fin de l'expérience. Si GRW11 provoque une anémie plus forte, cette dernière ne dure pas plus longtemps que dans le cas d'une infection par SGS1. Enfin nous n'obtenons pas de différence des taux de mortalité entre les oiseaux ayant été infectés par l'une ou l'autre des lignées.

Résultat des variations de poids

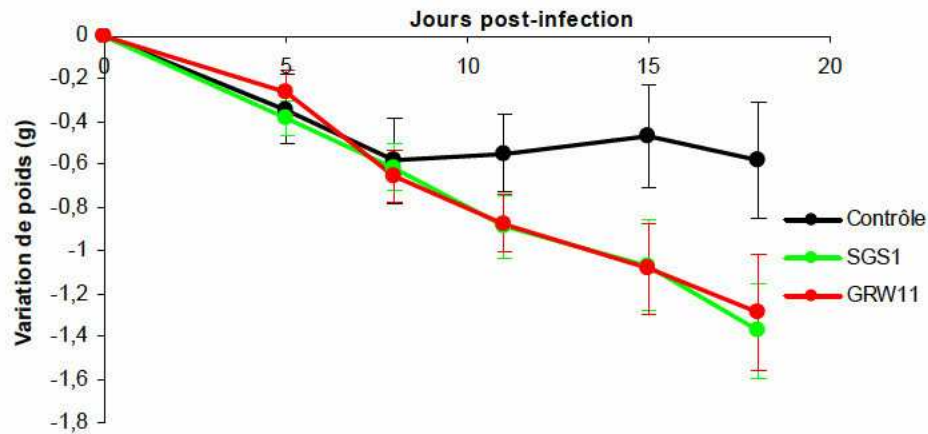


Figure 2.11 : Perte de poids des canaris consécutive à l'injection de *Plasmodium relictum*-lignées SGS1 et GRW11, ou de sang non-parasité (contrôle).

<i>Variables explicatives</i>	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Traitement	2,27	0,45	0,637
Temps	1,498	17,96	< 0,0001
(Temps) ²	1,498	20,17	< 0,0001
Temps x Traitement	2,498	5,18	0,0060
(Temps) ² x Traitement	2,498	3,19	0.0421

Tableau 2.2 : Résultats statistiques d'un modèle à effets mixtes visant à expliquer la variation de poids des canaris au cours du temps et en fonction du traitement reçu (SGS1, GRW11 ou contrôle).

Nous obtenons un effet du temps et de l'interaction temps-traitement sur la perte de poids des oiseaux. Les résultats sont également significatifs lorsque l'on considère l'effet quadratique du temps, désigné par (Temps)²

Résultat des variations d'hématocrite

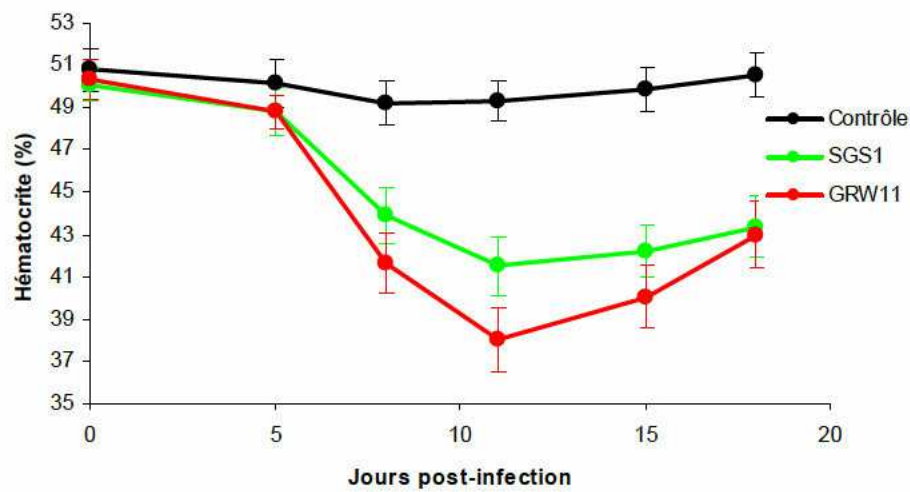


Figure 2.12 : Variation des taux d'hématocrite des canaris suite à l'injection de *Plasmodium relictum*-lignées SGS1 et GRW11, ou de sang non-parasité (contrôle).

<i>Variables explicatives</i>	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Traitement	2,27	11,98	0,0002
Temps	1,498	8,37	0,004
(Temps) ²	1,498	40,43	< 0,0001
Temps x Traitement	2,498	3,71	0,025
(Temps) ² x Traitement	2,498	28,1	< 0,0001

Tableau 2.3 : Résultats statistiques d'un modèle à effets mixtes visant à expliquer la variation d'hématocrite des canaris au cours du temps et en fonction du traitement reçu (SGS1, GRW11 ou contrôle).

Toutes les variables explicatives considérées présentent un effet significatif sur les variations d'hématocrite

b. Comparaison des dynamiques de multiplication entre SGS1 et GRW11

Les parasitémies résultantes des infections par *Plasmodium relictum*-SGS1 et GRW11 présentent des dynamiques significativement différentes (Interaction Traitement x Temps : $p < 0,0001$). En effet les parasites de la lignée GRW11 se multiplient plus rapidement et présentent un pic d'intensité plus important que ceux provenant de la lignée SGS1 (figure 2.13). Tout comme pour les variations d'hématocrite, les parasitémies des oiseaux infectés par SGS1 et GRW11 se rejoignent dans la dernière phase des dynamiques. Dans un cas comme dans l'autre, les hôtes arrivent progressivement à éliminer l'infection.

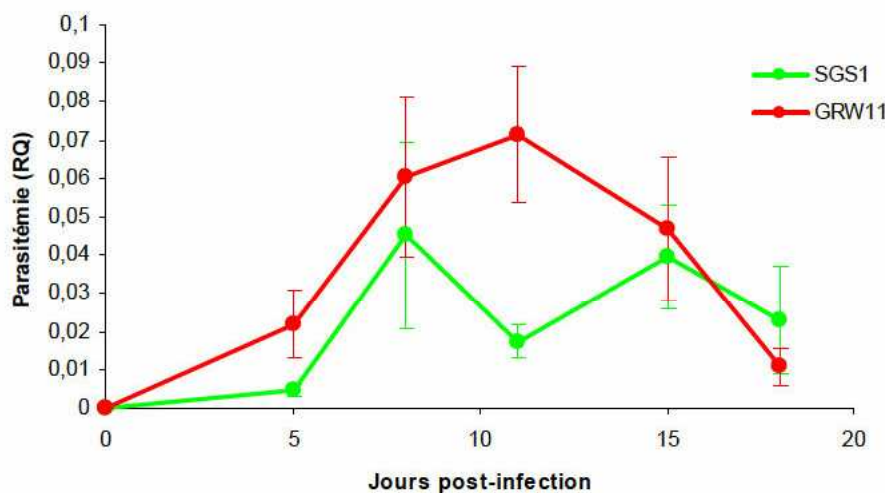


Figure 2.13 : *Dynamique des parasitémies des lignées SGS1 et GRW11 de Plasmodium relictum dans le sang des canaris.*

c. Conclusion

Même si les lignées SGS1 et GRW11 sont associées à la même espèce de parasite, *Plasmodium relictum*, elles présentent des différences dans leur exploitation de l'hôte (observée ici par la dynamique des taux de multiplication) ainsi que dans leur impact pour les oiseaux. Il est vrai que nous n'observons pas de différence de mortalité entre les hôtes ayant reçu l'une ou l'autre des souches, ce qui peut indiquer que les différences de virulence entre ces deux dernières restent peu conséquentes. Cependant les oiseaux utilisés lors de cette expérience ont été maintenus dans des volières, protégés ainsi des prédateurs, et nourris *ad*

libitum. En conditions naturelles, la différence d'anémie, entre des hôtes ayant reçu SGS1 et ceux infectés par GRW11, pourrait entraîner de plus lourdes conséquences pour les oiseaux.

L'échantillonnage régulier que nous avons fait dans cette population de moineaux domestiques, de laquelle sont extraites les deux lignées de parasites, nous a permis d'observer une prévalence plus importante de SGS1 que de GRW11. Si cette dernière est plus virulente, comme ce que nos résultats semblent indiquer, elle pourrait potentiellement entraîner une mortalité plus élevée des oiseaux et cela expliquerait que nous la retrouvions en plus faible proportion lors de nos échantillonnages. Pour corroborer cette hypothèse, nous devrions procéder en un suivi épidémiologique plus poussé de cette population.

La diversité des lignées parasitaires semble être un facteur important dans la compréhension des interactions hôtes-parasites et dans l'étude de l'évolution de la virulence. En effet, une diversité génétique élevée pourrait résulter en une diversification élevée des stratégies d'exploitation de l'hôte et influencer ainsi sur l'issue de l'interaction entre l'organisme et son parasite (Vizoso et Ebert 2005). Si l'on se focalise sur la malaria, McQueen et McKenzie (2004 et 2006), par exemple, ont montré par la théorie que les parasites infectant préférentiellement les réticulocytes (jeunes globules rouges) seraient susceptibles de causer une anémie beaucoup plus sévère. Ainsi la diversité des parasites serait un facteur important à prendre en compte pour expliquer les dommages que ces derniers peuvent causer à leurs hôtes, mais cette diversité pourrait aussi promouvoir le maintien de la variation génétique du système immunitaire des hôtes (Hedrick 2002).

Il serait intéressant par la suite de mettre en compétition au sein des mêmes hôtes les deux lignées que nous avons considérées dans notre étude. Nous pourrions ainsi déterminer si une des deux lignées prend l'avantage et surtout comment la compétition entre lignées génétiquement distinctes peut influencer sur l'évolution de la virulence.

Chapitre 3 : Expositions répétées à la malaria aviaire

Face au parasitisme, les espèces hôtes peuvent développer trois types de défenses :

(1) Éviter d'entrer en contact avec l'agent infectieux, en choisissant par exemple des milieux de vie ou des sites de reproduction non infestés (Reckardt et Kerth 2007).

(2) Limiter la prolifération des parasites si le contact ne peut être évité. Nous pouvons citer comme exemple des comportements particuliers de certains oiseaux qui ajoutent à leurs nids des plantes possédant des propriétés anti-pathogéniques (Clark et Mason 1985)

(3) Augmenter le taux de guérison si l'organisme est infecté. C'est à ce niveau ci qu'intervient le système immunitaire de l'hôte.

Lorsqu'un pathogène est présent dans l'environnement biotique d'un hôte, ce dernier est susceptible de le rencontrer plusieurs fois au cours de sa vie. Le système immunitaire peut souvent se souvenir de l'identité d'un pathogène pendant un certain laps de temps (Ahmed et Gray 1996), ce qui le rend capable de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une réinfection (Brake 2003 ; Kurtz 2004). Nous avons voulu savoir si un tel phénomène pouvait se produire à la suite d'une infection par la malaria aviaire : les coûts sont-ils réduits lors d'une réinfection ?

Les modèles épidémiologiques des maladies infectieuses se décomposent souvent en deux catégories : les modèles dits SIS (pour Susceptible Infectious Susceptible) et les modèles dits SIR (pour Susceptible Infectious Recovered) (Anderson et May 1991, figure 3.1). Les modèles SIS supposent que les individus « susceptibles » d'une population peuvent être infectés par un parasite, et que, s'ils survivent à l'infection, ne développent pas d'immunité protectrice et redeviennent susceptible au parasite. Dans les modèles SIR au contraire, les individus survivant à une infection ne sont plus vulnérables face à ces parasites et sortent définitivement de la population susceptible. Certains modèles SIR supposent que ces individus peuvent développer une immunité juste partielle face à l'agent infectieux. Ce dernier peut alors toujours les contaminer, mais les hôtes toléreront mieux l'infection et élimineront les parasites plus rapidement. Les dynamiques épidémiologiques de maladies type SIS et SIR vont différer, et ceci peut déterminer les conditions nécessaires au maintien du pathogène dans la population hôte. Par exemple, dans le cas d'un modèle SIR, si les individus deviennent résistants à la suite d'une première infection, les parasites ne peuvent

perdurer que si le nombre d'hôtes susceptibles est suffisamment élevé. Afin de pouvoir prédire et comprendre l'épidémiologie d'une maladie infectieuse, il est important de déterminer si une association hôte-parasite donnée suit les prédictions des modèles SIS ou SIR. Ceci peut être particulièrement crucial pour les espèces hôtes concernées par des programmes de conservation, entrant en contact avec un nouvel agent infectieux.

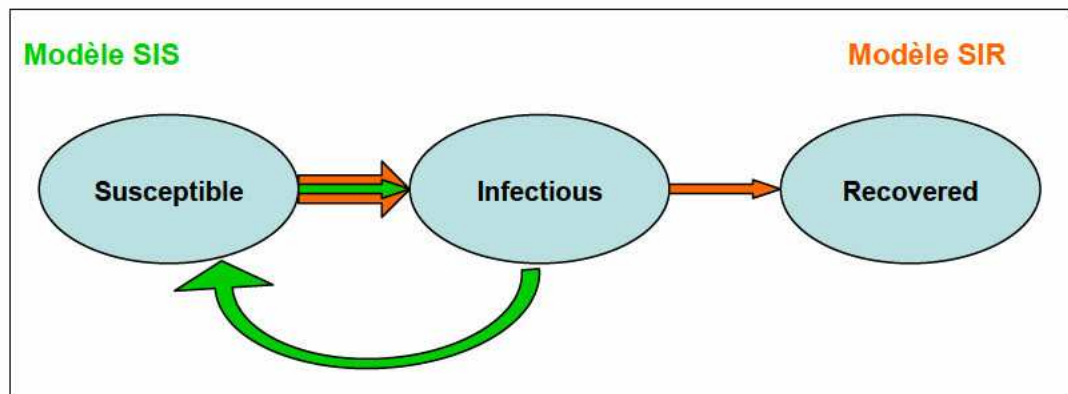


Figure 3.1 : Représentation schématique des étapes par lesquelles passe un individu suivant une épidémiologie de type SIS (Susceptible-Infectious-Susceptible) ou SIR (Susceptible-Infectious-Recovered).

Dans ce cadre, il n'y a eu que très peu d'études concernant la malaria aviaire. Dans la première moitié du 20^{ème} siècle, certains groupes de recherche ont procédé à des expériences de « vaccination » par l'injection de sérum extrait d'oiseaux infectés ou bien de parasites non actifs (Hegner et Dobler 1939 ; Manwell et Goldtein 1940 ; Russel et Mohan 1942 ; Corradetti et Cavaceppi 1952). Les frères Edmond et Etienne Sergent (1952) ont fait une série d'expériences d'infection/réinfection dans le système canaris-*Plasmodium relictum*. Ils ont pu montrer qu'après la phase aiguë d'une primo-infection, s'ensuit une période de latence où les parasémiés sont extrêmement faibles conduisant à une certaine protection contre de futures inoculations. On parle alors de prémunition, à savoir un maintien de l'immunité succédant à un état infectieux grâce à la présence de l'agent infectieux dans l'organisme. Nous avons, nous aussi, procédé à des expériences de réinfection de canaris avec *Plasmodium relictum* (annexe 2), en contrôlant la lignée de parasites et en standardisant la dose infectieuse (à un million de parasites pour l'infection et la réinfection), ce que les frères Sergent n'ont pu faire.

Comme nous l'avions supposé, les canaris développent une certaine protection à la suite d'une primo-infection. Lorsque ces oiseaux sont réinfectés :

(1) ils maîtrisent plus rapidement l'infection. En effet les intensités parasitaires sont nettement plus faibles lors des réinfections, avec un pic de parasitémie plus précoce et trois fois moins fort que dans le sang des individus infectés pour la première fois (figure 3.2)

(2) ils paient moins de coûts. Le résultat le plus flagrant quant à cela concerne les pertes d'hématocrite. En effet les individus réinfectés présentent une diminution de leur hématocrite nettement plus faible que les individus primo-infectés (figure 2.3). Ceci peut, bien sûr, provenir du fait que les oiseaux limitent la prolifération des parasites et par conséquent la destruction des globules rouges qu'ils occasionnent. Il est également possible que ces individus arrivent à mieux anticiper les coûts potentiels de l'infection et par exemple stimuler l'érythropoïèse avant que la prolifération des parasites ne soit trop importante.

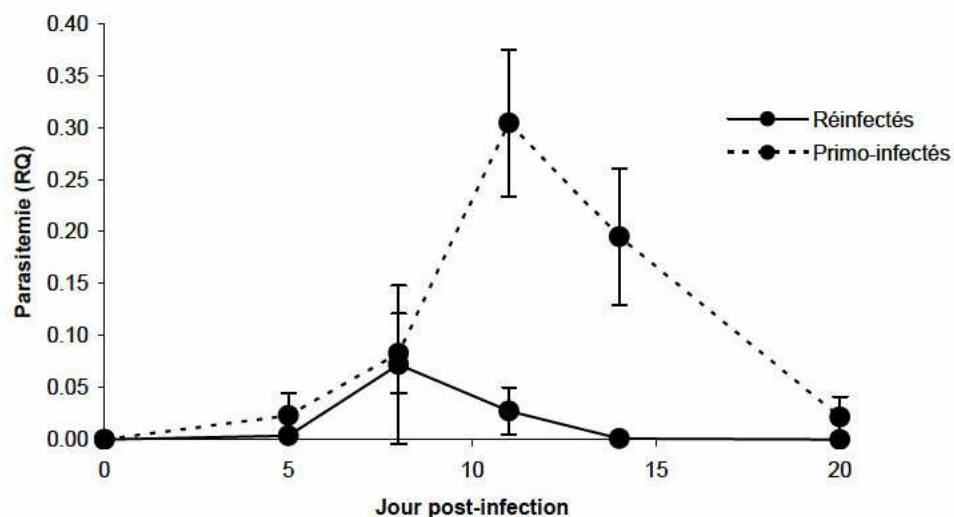


Figure 3.2 : Dynamique de multiplication de *Plasmodium relictum* dans le sang de canaris expérimentalement infectés ou réinfectés.
Figure extraite de l'annexe 2.

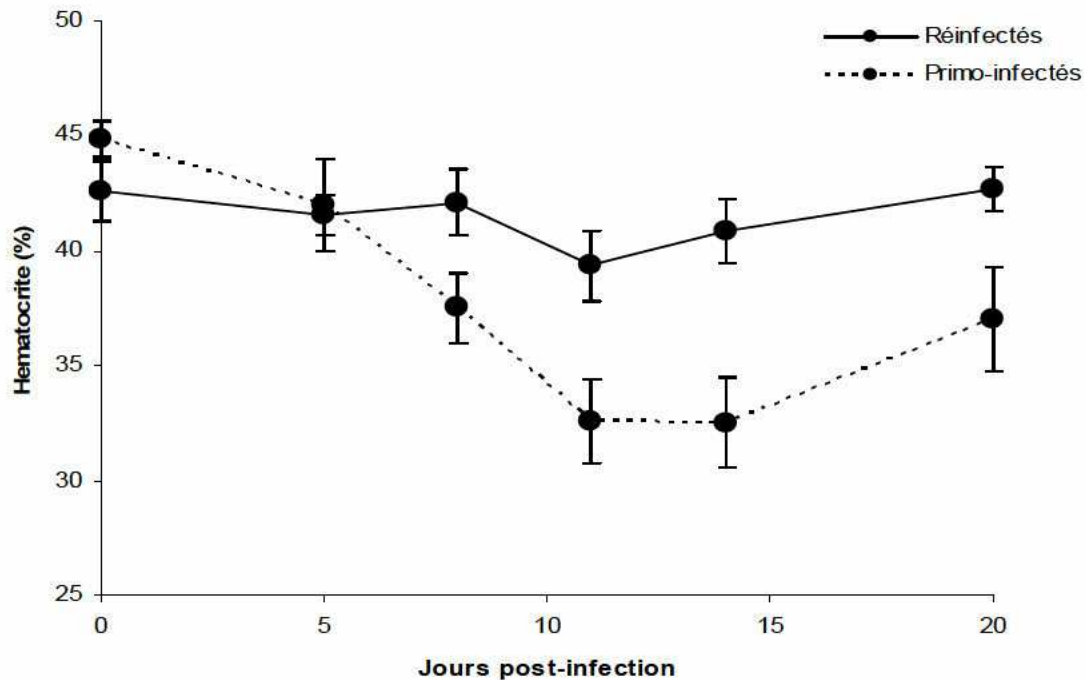


Figure 3.3 : Variation des taux d'hématocrite de canaris expérimentalement infectés ou réinfectés par *Plasmodium relictum*
Figure extraite de l'annexe 2.

Le système *Plasmodium relictum*-canaris se rapproche en partie d'une dynamique épidémiologique de type SIR. En effet même si les oiseaux survivants à un premier contact avec le parasite peuvent être infectés de nouveau, ils tolèrent nettement mieux l'infection et en prennent plus rapidement le contrôle. Ces oiseaux sortent donc de la population totalement susceptible. Nous pouvons nous demander si les individus ne sont définitivement plus susceptibles ou bien s'ils finissent par le redevenir au bout d'un certain temps. Quelle peut être la durée d'une protection contre la malaria aviaire ? Atkinson *et al.* (2001) ont montré chez des oiseaux hawaïens (*Hemignathus virens*) que de précédentes expositions à *Plasmodium relictum* conféraient une certaine protection face à de futures infections. Ils ont pu mettre en évidence que, plus de 3 ans après l'exposition initiale, les anticorps anti-paludéens étaient toujours détectables chez les oiseaux. Ceci suggère que l'effet protecteur serait susceptible de durer longtemps. Nous ne disposons malheureusement pas d'une telle information pour notre étude. Cependant il est important de noter que dans le cas de la malaria, la période de transmission des parasites, dans l'hémisphère nord, se situe au printemps et en été (voire début de l'automne), moment où les vecteurs sont présents dans le milieu. Donc, même si l'effet protecteur s'estompe d'une année sur l'autre, nos résultats

indiquent que les oiseaux peuvent développer des mécanismes de protection au cours de la période de transmission active des parasites.

Comme nous avons pu voir dans le chapitre 2 (section 4), les infections micro-parasitaires résultent souvent en un mélange de lignées de parasite génétiquement distinctes. Il serait particulièrement intéressant de tester si la protection acquise à la suite d'une infection par une lignée précise, pourrait également défendre l'organisme contre d'autres lignées du même parasite. Nous avons, à ce sujet, mené une expérience de réinfection croisée entre les lignées SGS1 et GRW11 de *Plasmodium relictum*. Les résultats de cette étude, en cours d'analyse, pourraient nous offrir de précieuses informations quant à la spécificité de la mémoire immunitaire développée à la suite d'une primo-infection par la malaria aviaire.

Les pressions de sélection vont être différentes pour les parasites infectant des hôtes avec ou sans passé infectieux avec eux. Nos résultats suggèrent qu'un hôte naïf (jamais encore infecté) pourra être infectieux pendant plus longtemps, laisser le temps aux parasites de se multiplier et de produire leurs stades de transmission aux vecteurs. La contrepartie étant que les coûts de l'infection seront, pour ces hôtes, plus importants risquant d'entraîner une mortalité qui empêcherait la transmission des parasites. En revanche, un hôte ayant déjà été en contact avec le parasite, pourra éliminer l'infection plus rapidement, diminuant ainsi le temps disponible au parasite pour se multiplier et se transmettre. Cependant comme les coûts de l'infection seront réduits, les parasites pourront ainsi exploiter l'hôte avec plus de sûreté et il se pourrait que les souches les plus virulentes soient avantagées. On pourrait ainsi s'attendre à ce que les parasites adoptent des stratégies différentes en fonction du profil immunologique de l'hôte. Si des expériences d'évolution de la virulence de la malaria avec des hôtes naïfs et « immunisés » ont été menés chez des souris (Mackinnon et Read 2004b), montrant que la virulence augmentait chez les hôtes non-naïfs, ceci n'a jamais été testé pour les formes aviaires et pourraient représenter une perspective intéressante à explorer par la suite.

Chapitre 4 : Exploitation de l'hôte vs. Immunopathologie

1. Les coûts de l'immunité

Les parasites sont présents dans l'environnement biotique de la plupart des espèces et peuvent exercer sur elles de fortes pressions de sélection. Face à cela, les espèces hôtes ont développé des mécanismes de défense afin de ne pas rencontrer les agents infectieux, de limiter leur prolifération en cas de contact ou de monter une réponse immunitaire efficace pour lutter contre l'infection. En population naturelle, un organisme immuno-déprimé serait soumis à de forts risques d'infection et de mortalité (Loa *et al.* 2002 ; Reisen *et al.* 2003). Aux vues des bénéfices évidents que confère une défense efficace contre les parasites, on pourrait s'attendre à ce que la sélection naturelle favorise des individus présentant une immunité de plus en plus performante. Or, il existe une très grande variabilité de la réponse immunitaire entre individus (intra et inter espèces) : variation dans la force de la réponse, sa spécificité, son efficacité et sa rapidité d'action (Schmidt-Hempel 2003). Cette hétérogénéité peut être expliquée par le fait que l'immunité implique certains coûts pour l'hôte. En effet maintenir un système immunitaire compétent et monter une réponse immunitaire nécessitent de l'énergie, des ressources métaboliques (Martin *et al.* 2002 ; Råberg *et al.* 2002 ; Eraud *et al.* 2005) qui ne seront plus disponibles pour d'autres fonctions de l'organisme (elles aussi demandeuses d'énergie) comme la croissance ou encore la reproduction (Sheldon et Verhulst 1996 ; Lochmiller et Derenberg 2000 ; Norris et Evans 2000 ; Rolff et Siva-Jothy 2003). Soler et ses collaborateurs (2003) ont montré que des poussins de pies bavardes (*Pica pica*), dont on a stimulé la réponse immunitaire, présentent une croissance réduite par rapport aux individus témoins. De la même façon, French *et al.* (2007) ont pu mettre en évidence chez des lézards (*Urosaurus ornatus*) que le fait de monter une défense immunitaire pouvait avoir un impact négatif sur l'investissement dans la reproduction, dans un contexte où les ressources alimentaires étaient limitées.

L'investissement dans l'immunité est ainsi un compromis entre les bénéfices que confère une défense efficace contre les parasites, et les coûts occasionnés par une immunité trop importante (Viney *et al.* 2005). Or, en plus des coûts énergétiques, une réponse immunitaire surexprimée pourrait prendre pour cible les structures mêmes de l'hôte et générer des dommages (Sorci et Faivre 2009). Le système immunitaire est soumis à de nombreux

mécanismes de contrôle qui l'empêchent de s'emballer et de se retourner contre son propre organisme. Pourtant, des dysfonctionnements peuvent se produire ; les pathologies dues à l'immunité sont d'ailleurs assez courantes. On parle d'auto-immunité quand le système immunitaire prend les cellules de l'hôte pour cible, ou bien d'allergie quand ce dernier s'attaque à des substances inoculées telles que la nourriture par exemple. Plus généralement de telles maladies provoquées par l'immunité sont appelées immunopathologies. Dans le cas du diabète de type 1, ce sont les cellules de l'immunité qui détruisent les cellules β du pancréas qui sécrètent l'insuline (Cooke *et al.* 2004).

De telles immunopathologies se produisent également dans le cas de maladies infectieuses. Il semblerait, en effet, que des symptômes de maladies humaines, comme le paludisme, la tuberculose ou la dengue, ne sont pas dus aux effets directs des pathogènes, mais à l'emballement du système immunitaire suite à l'infection (voir tableau 4.1).

Maladie	Agent infectieux	Rôle de la réponse immunitaire
Tuberculose	<i>Mycobacterius tuberculosis</i>	Séquelles sur les poumons
Malaria	<i>Plasmodium</i> sp.	Accentue la gravité de la maladie
Leishmaniose	<i>Leishmania</i> sp.	Augmente la taille des lésions cutanées
Maladie du sommeil	<i>Trypanosoma brucei</i>	Séquelles du système nerveux central
Dengue	Virus de la Dengue	Fièvre hémorragique, et 11% des dommages au niveau du foie
Schistosomiasis	<i>Schistosoma</i> sp.	Dommages au niveau du foie et du système urinaire
Maladie de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Dommages cardiaques
Lèpre	<i>Mycobacterium leprae</i>	Séquelles du système nerveux

Tableau 4.1 : Exemple de maladies infectieuses humaines où la réponse immunitaire engendre des coûts pour l'hôte. Tableau modifié de Graham *et al.* (2005a)

Dans le cas de la malaria, il a été montré chez des rongeurs que 10% de l'anémie pouvait être expliquée par l'exubérance de la réponse immunitaire face à l'infection (Graham

et al. 2005b). Est-ce que cela se produit également pour les formes aviaires de la maladie ? C'est à cette question, jamais encore étudiée, que nous allons tenter de répondre.

Dans le cas d'une infection par la malaria aviaire, nous observons un certain nombre de symptômes chez l'oiseau, en particulier une réduction importante de son taux d'hématocrite (voir chapitre 2). Nous nous sommes demandé si les symptômes observés provenaient uniquement des effets directs de l'exploitation de l'hôte par *Plasmodium relictum*, ou bien si une partie des coûts de la maladie pouvait être expliquée par une réponse immunitaire de l'hôte trop importante (annexe 5).

2. Inhibition de la réponse immunitaire

Afin de pouvoir dissocier les coûts immunopathologiques de ceux dus à l'exploitation par les parasites, nous avons inhibé la réponse immunitaire de canaris. Pour cela nous leur avons injecté une solution de cyclophosphamide, agent alkylant prenant pour cible des cellules de l'immunité. Le cyclophosphamide présente des propriétés immuno-suppressives, et est régulièrement utilisé comme tel dans des expériences immunologiques sur des mammifères et des oiseaux (Lerman et Weidanz 1970 ; Glick 1971 ; Hiraga *et al.* 1976 ; Calabrese *et al.* 1996 ; Hemendinger et Bloom 1996 ; Loa *et al.* 2002 ; Reisen *et al.* 2003 ; Pantin-Jackwood *et al.* 2004 ; Muroga *et al.* 2006 ; Caldas *et al.* 2008 ; Zimecki *et al.* 2010). Les oiseaux ayant reçu un traitement de cyclophosphamide présentent généralement une grande susceptibilité aux pathogènes (Desmidt *et al.* 1998 ; Muroga *et al.* 2006). C'est pourquoi un tel produit est utilisé pour faciliter les infections et permettre l'établissement d'infections chroniques.

Il faut tout de fois noter que l'action du cyclophosphamide sur le système immunitaire est dose-dépendante (Brode *et al.* 2006 ; Desmidt *et al.* 1998 ; Fang *et al.* 2006 ; Ghiringhelli *et al.* 2007 ; Liu *et al.* 2007) :

(1) À haute dose le cyclophosphamide détruit les lymphocytes B, produit une déficience passagère en lymphocytes T et agit négativement sur la fonction des macrophages (Fang *et al.* 2006). Après un tel traitement, les individus sont au mieux immuno-déprimés pendant quelques jours, incapables de monter une réponse immunitaire correcte et se trouvent par conséquent exposés aux infections ; au pire après des injections fortes et fréquentes dans les premiers jours de vie le cyclophosphamide peut aller jusqu'à la suppression de la bourse de Fabricius des oiseaux (site de maturation des lymphocytes B). Une telle ablation chimique

a été réalisée chez de jeunes volailles dans le but d'évaluer l'implication de certaines composantes de l'immunité face aux infections.

(2) Par contre une faible dose de cyclophosphamide (dont la concentration dépend des espèces considérées), est associée, non à une immuno-dépression des individus, mais au contraire à une intensification de la réponse immunitaire. Certaines études ont en effet montré que le cyclophosphamide, injecté à faible dose, prend préférentiellement pour cible des cellules régulatrices de l'immunité, en particulier provoque l'apoptose de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ (Brode *et al.* 2006 ; Ghiringhelli *et al.* 2007) mais également inhibe la fonction régulatrice de ces cellules (Liu *et al.* 2007). Les applications médicales d'un tel traitement sont nombreuses permettant notamment de contrôler la progression de certaines tumeurs (Ghiringhelli *et al.* 2007) et ainsi augmenter l'efficacité des immunothérapies anti-tumorales (Liu *et al.* 2007).

C'est dans un but d'immuno-suppression que nous désirions utiliser le cyclophosphamide. Ne disposant pas d'information quant aux doses à utiliser chez les canaris, nous nous sommes référée à des études conduites chez d'autres espèces d'oiseaux (voir tableau 4.2). Nous avons en conséquence choisi deux doses : 50 et 100 mg/kg.

Il reste à noter qu'après une unique injection de cyclophosphamide, comme ce que nous prévoyions de faire, l'action immunosuppressive est provisoire (Di Paolo *et al.* 2006). Nous n'avons donc pas détruit l'immunité des canaris de façon définitive.

Objectif de l'étude	Modèle aviaire	Dose par individu	Références
Effet de l'immuno-suppression au cours d'infection par des virus Encephalites	Roselin familial (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	125 et 62,5 mg/kg à J-3 et J-1 avant l'infection, J+1 et J+3 après	Reisen <i>et al.</i> 2003
Evaluer l'immunité impliquée dans la protection contre des coronavirus	Dinde	5 mg/j pendant les 3 premiers jours de vie	Loa <i>et al.</i> 2002
Effet de l'immuno-suppression sur la gravité d'une proventriculite	Poulet	4 mg/j pendant les 4 premiers jours de vie	Pantin-Jackwood <i>et al.</i> 2004
Estimer le pouvoir pathogène d'adenovirus chez des individus immuno-déprimés	Poulet	40 mg/j pendant les 3 premiers jours de vie	Muroga <i>et al.</i> 2006
Estimer le pouvoir pathogène d'adenovirus chez des individus immuno-déprimés	Poulet	50 mg/j entre le 18ème et 20ème jour de vie	Nakamura <i>et al.</i> 2003
Etude de l'immunité impliquée contre des birnavirus à ARN	Poulet	3 mg/j pendant les 4 premiers jours de vie	Yeh <i>et al.</i> 2002
Rôle de la médiation humorale dans l'élimination de <i>Salmonella enteritidis</i>	Poulet	4 mg/j pendant les 3 premiers jours de vie	Desmidt <i>et al.</i> 1998
Etude du pouvoir pathogène de la grippe aviaire chez des individus immuno-déprimés	Pigeons et poulets	10 mg (pigeons) et 50 mg (poulet) pendant 4 jours avant l'infection	Fang <i>et al.</i> 2006
Estimer l'immunité impliquée contre une infection par <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	Poulet	3 mg/j pendant les 4 premiers jours de vie	Schuijffel <i>et al.</i> 2005

Tableau 4.2 : Études conduites chez des espèces aviaires utilisant le cyclophosphamide pour moduler la réponse immunitaire

3. Mise en évidence des coûts immunopathologiques

Le premier point à soulever, est que notre traitement de cyclophosphamide a agit comme nous le souhaitions. En effet les oiseaux traités se sont révélés plus susceptibles à l'infection par *Plasmodium relictum* (figure 4.1):

(1) le développement des parasites dans le sang s'est avéré être plus important chez les oiseaux sous traitement de cyclophosphamide.

(2) contrairement aux individus dont le système immunitaire n'a pas été manipulé, les oiseaux traités ne semblaient pas prendre le contrôle de l'infection après 17 jours. Bien au contraire, les intensités de parasites continuaient d'augmenter à cette date.

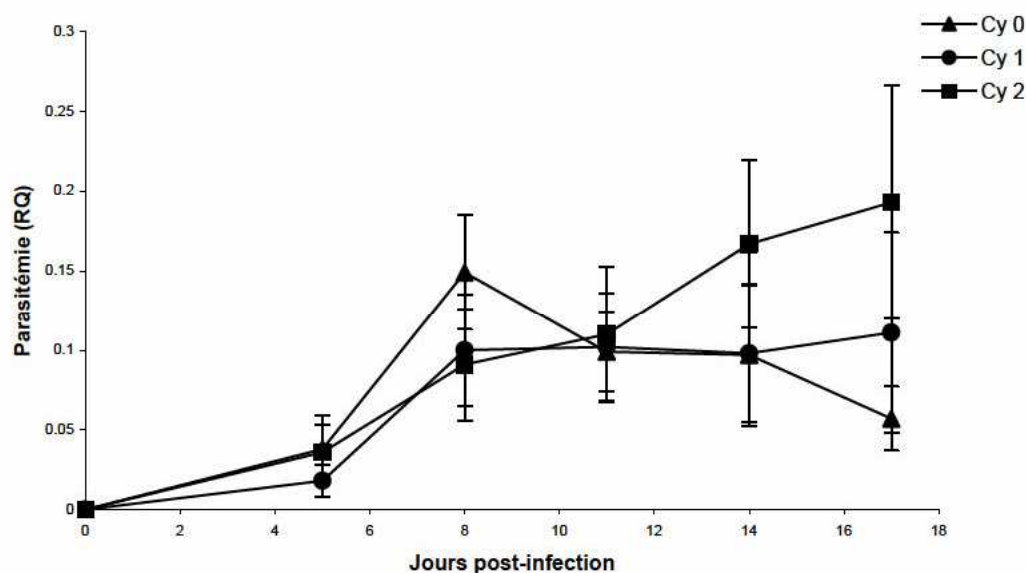


Figure 4.1 : Dynamiques des parasitémies de *Plasmodium relictum* dans le sang de canaris expérimentalement infectés et ayant reçu une dose de cyclophosphamide

Cy = 0mg/kg ; Cy 1 = 50mg/kg ; Cy 2 = 100mg/kg.

Figure extraite de l'annexe 5

Les canaris immuno-déprimés ne peuvent répondre correctement à l'infection et en particulier semblent avoir quelques difficultés à contenir la prolifération des parasites. Quelles sont les conséquences de cette immuno-suppression sur la virulence de *Plasmodium relictum* ? Si les symptômes de la maladie proviennent uniquement de l'exploitation de l'hôte par les parasites, les individus dont le système immunitaire a été manipulé devraient payer un coût supplémentaire à l'infection. Les résultats seront différents si une partie des symptômes provient de l'exubérance immunitaire, car dans ce cas les oiseaux immuno-déprimés pourraient moins souffrir de l'infection.

Notre étude a réussi à montrer, pour la première fois, que les coûts d'une infection par la malaria aviaire étaient dus aux effets combinés de l'exploitation de l'hôte par les parasites (estimée ici par la multiplication parasitaire) et de l'activation de la réponse immunitaire. Les canaris immuno-déprimés ont globalement moins souffert de l'infection que les individus dont l'immunité n'a pas été manipulée. Plus précisément pour des intensités parasitaires équivalentes les oiseaux ayant reçu une dose de cyclophosphamide présentent des pertes d'hématocrite moins importante et une mortalité réduite par rapport aux oiseaux contrôles (figures 4.2 et 4.3). Nos résultats rejoignent ainsi ceux trouvés dans des cas de malaria humaine et chez les rongeurs, et permettent de comprendre les discordances parfois observées entre la charge parasitaire et la gravité des symptômes de la maladie.

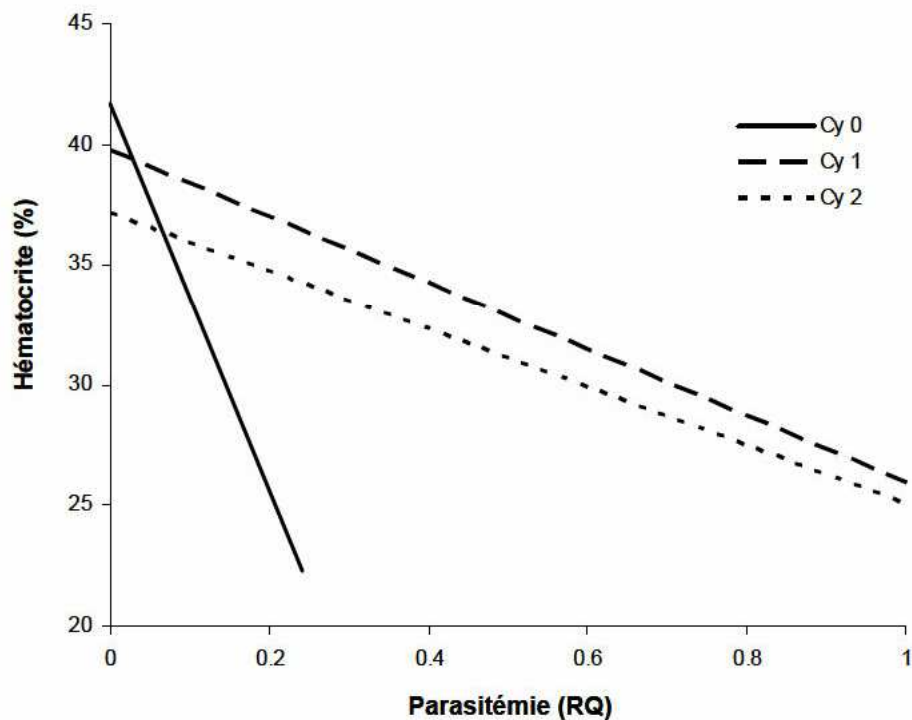


Figure 4.2 : Taux d'hématocrite de canaris expérimentalement infectés par *Plasmodium relictum* en fonction de l'intensité parasitaire, ceci pour trois doses de cyclophosphamide

Cy0 = 0mg/kg ; Cy1 = 50mg/kg ; Cy2 = 100mg/kg.

Figure extraite de l'annexe 5

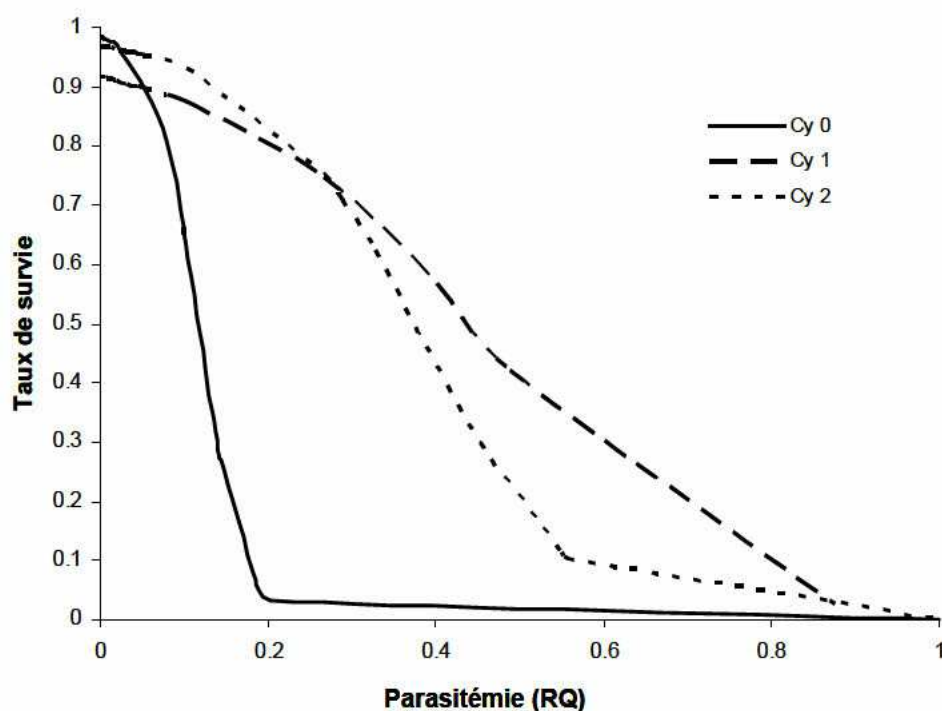


Figure 4.3 : Probabilité de survie de canaris expérimentalement infectés par *Plasmodium relictum* en fonction des parasitémies trouvés dans leur sang, et ceci pour trois doses de cyclophosphamide.

Cy0 = 0mg/kg ; Cy1 = 50mg/kg ; Cy2 = 100mg/kg

Figure extraite de l'annexe 5

4. Conséquences de l'immunopathologie

Dans notre expérience nous avons inhibé la réponse immunitaire des individus ; dans la nature certains parasites manipulent eux aussi l'immunité de leurs hôtes. Les parasites qui atténuent la réponse immunitaire de leurs hôtes pourraient donc avoir la capacité de réduire la gravité des symptômes d'une maladie si cette dernière est due à un dysfonctionnement de l'immunité montée contre l'infection. Cela a été montré dans des cas d'infection par des helminthes (vers parasites pluricellulaires) (Maizels *et al.* 2004 ; Zaccane *et al.* 2006). Ces parasites survivent souvent dans des hôtes immunocompétents en provoquant des mécanismes d'immunorégulation. Cette sous-réponse immunitaire face à l'infection permet aux vers de ne pas être éliminés par le système immunitaire de l'hôte, mais elle permet également de protéger ce dernier contre une immunité excessive (Maizels et Yazdanbakhsh 2003 ; Maizels 2005).

Si l'immunopathologie augmente les risques de mortalité de l'hôte, elle représente alors un coût important pour les parasites, pouvant de fait empêcher leur transmission à de

nouveaux hôtes. Cependant dans certains cas l'immunopathologie pourrait être bénéfique pour l'établissement et/ou la transmission de certains parasites. Dans le cas de la Tuberculose les nécroses immunopathologique des poumons facilitent la transmission de *Mycobacterius tuberculosis*. Cela a aussi été montré pour la dengue ou la leishmanioses (Graham *et al.* 2005a).

Quelles peuvent être les conséquences de l'immunopathologie sur l'évolution de la virulence des parasites ? Cette question a été abordée récemment par Day et ses collaborateurs en 2007. Si les coûts immunopathologiques augmentent proportionnellement à l'exploitation de l'hôte par le parasite, on peut supposer que la sélection favorise des parasites plus « prudents » (exploitant moins leurs hôtes). Par contre il serait possible que dans certains systèmes hôte-parasites, l'immunopathologie soit indépendante du niveau d'exploitation des agents infectieux. Dans ce cas, les parasites les plus virulents n'entraîneraient pas de coûts immunopathologiques supérieurs aux parasites plus « prudents », et devraient être favorisés par la sélection naturelle. Il serait donc intéressant de comprendre comment l'immunopathologie, et plus généralement la réponse immunitaire de l'hôte, agissent sur l'évolution de la virulence des parasites. Nous tenterons de répondre à cette question dans la suite de cette thèse (chapitre 5) en comparant la façon dont la virulence des parasites de la malaria évolue au sein d'hôtes immunocompétents et d'hôtes immunodéficients.

Chapitre 5 : Évolution de la virulence

1. Contexte théorique et méthodes expérimentales

Dans les expériences présentées précédemment dans ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressée à la virulence de parasites de la malaria aviaire, plus précisément aux facteurs pouvant moduler cette virulence tels que l'immunité de l'hôte et la dose infectieuse. En provoquant expérimentalement l'évolution des parasites, nous allons nous focaliser à présent sur les forces évolutives impliquées dans l'évolution de leur virulence.

Beaucoup de modèles théoriques ont été développés pour comprendre l'évolution de la virulence des parasites, et nombreux sont ceux qui avancent l'hypothèse que cette virulence n'est pas maximale puisqu'elle va être le résultat d'un compromis entre les bénéfices et les coûts qu'elle confère aux parasites (Anderson et May 1982 ; Ewald 1983 ; Bull 1994 ; Frank 1996 ; Alizon *et al.* 2009). D'après cette hypothèse un parasite plus virulent exploitera plus les ressources de l'hôte, produira plus de formes de transmission par unité de temps et persistera plus longtemps au sein de l'organisme (une multiplication active limitant les risques d'une élimination rapide par les défenses de l'hôte). Cependant une telle exploitation pourrait aboutir à la mort de l'hôte, mettant un terme aux chances de transmission des parasites à de nouveaux hôtes. Qu'une infection parasitaire dégrade l'état de santé de l'hôte peut présenter certains avantages pour les parasites, en rendant l'hôte plus susceptible aux vecteurs par exemple (Day et Edman 1983 ; Ewald 1994), mais un hôte en trop mauvaise condition physique aurait des risques de mortalité élevés, en particulier en présence de prédateurs et de compétiteurs. Nous pourrions, dans ce contexte, supposer que la virulence d'un parasite évolue non vers une valeur maximale, mais plutôt vers un optimum (Frank 1996). Cette hypothèse, dite du « trade-off », n'est pas applicable à tous les systèmes hôte-parasite, en particulier lorsque les symptômes de la maladie sont indépendants du taux de réplication des parasites. Chez les souris, par exemple, les dommages résultant d'une infection par les virus de la chorioméningite lymphocytaire (virus à ARN de la famille des arenavirus) seraient uniquement le résultat de la réponse immunitaire de l'hôte (Lipsitch et Moxon 1997).

Une méthode, régulièrement utilisée en laboratoire, pour étudier l'évolution de la virulence des parasites consiste à faire passer plusieurs fois des parasites entre groupes d'hôtes (appelée SPE pour *Serial Passage Experiments*). Lors des SPE les parasites sont

transférés d'un ensemble d'hôtes à un autre soit artificiellement, par exemple par l'injection directe des parasites par l'expérimentateur à l'aide d'une seringue (Mackinnon et Read 1999 (*a* et *b*), 2003 et 2004a ; Scully et Bidochka 2005), ou plus naturellement soit en utilisant les vecteurs naturels ou bien en mettant les hôtes en contact direct (Hughes *et al.* 2002 ; Mackinnon *et al.* 2005 ; Scully et Bidochka 2005 ; Carillo *et al.* 2007). Ce type d'expériences est souvent pratiqué en microbiologie, parasitologie et même dans les sciences agricoles et permet de comprendre les causes et conséquences de l'évolution des parasites. Les SPE sont en particulier utilisées dans le développement de vaccins (cela a été le cas pour mettre au point les vaccins contre la polio ou la fièvre jaune par exemple), mais aussi pour maintenir des stocks de parasites en laboratoire (le passage régulier entre hôtes évitant l'extinction des souches parasitaires concernées). En transférant ainsi les parasites, les scientifiques peuvent provoquer expérimentalement leur évolution, et le résultat généralement trouvé dans les SPE est une augmentation de la virulence de ces derniers au fil des passages (Ebert 1998 et 2000). Ces changements de virulence peuvent se produire plus ou moins rapidement en fonction des caractéristiques des parasites considérés, en particulier leur temps de génération et leur taux de mutation. Par exemple, lors d'une expérience de passages de virus de l'hépatite entre canards, Woolcock et Crichton (1979) ont pu observer une augmentation de virulence après seulement trois transferts. Pourquoi observons nous de tels changements de virulence au cours des SPE ? Trois hypothèses peuvent être avancées et ont été clairement exposées par Ebert (2000) :

(1) Le coût de la virulence : d'après l'hypothèse des *trade-off* exposée précédemment, la stratégie optimale d'un parasite est de maximiser sa fitness en limitant les coûts occasionnés par sa virulence (Anderson et May 1982 ; Bull 1994 ; Ewald 1994 ; Read 1994). Or lorsque les parasites sont expérimentalement passés d'un hôte à un autre, ils ne paient par conséquent plus de coûts dus à la mortalité de ces derniers puisque les transferts sont assurés par l'expérimentateur. Ainsi une augmentation de la virulence pourrait représenter une stratégie tout à fait avantageuse pour les parasites concernés par l'expérience.

(2) Croissance versus transmission : cette hypothèse concerne les parasites qui présentent différents stades de vie comme c'est le cas des parasites de la malaria : des stades parasitaires pour la multiplication au sein de l'hôte et d'autres pour la transmission à de nouveaux hôtes. S'il existe un compromis dans l'investissement entre ces deux types de stades parasitaires, les SPE pourraient en changer la balance. En effet, comme le transfert se

fait expérimentalement, les stades assurant la transmission à de nouveaux hôtes (ex : les gamétocytes dans le cas de la malaria) ne sont plus nécessaires. Dans ce cas on pourrait supposer que les stades de multiplication asexuée, assurant la persistance de l'infection au sein de l'hôte, seraient avantagés. Nous pourrions ainsi nous attendre à une augmentation des taux de multiplication intra-hôte et, si nous admettons une corrélation entre multiplication et virulence, à une aggravation des dommages que l'infection génère chez l'hôte.

(3) Diversité génétique : certaines études ont avancé l'hypothèse qu'en populations naturelles, un des facteurs limitant l'augmentation de la virulence des parasites serait la diversité génétique des hôtes (Ebert et Hamilton 1996). En effet la diversité des stratégies et mécanismes de défense contre le parasitisme entre hôtes pourraient limiter l'adaptation des parasites. Dans le cadre des SPE, les hôtes ont souvent une diversité génétique réduite (sélection de lignée d'hôtes, voir utilisation de clones). L'adaptation, souvent rapide, des parasites à ces hôtes pourrait expliquer l'augmentation de virulence observée.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons donc conduit des expériences de passages en série de *Plasmodium relictum* entre groupes de canaris afin de provoquer artificiellement l'évolution des parasites. Les SPE n'ont que peu été conduites en utilisant la malaria aviaire comme modèle. En effet nous n'avons trouvé, dans la littérature scientifique, qu'un seul exemple : une étude conduite en 1945 par Fruma Wolfson qui a procédé à des passages réguliers de *Plasmodium relictum* entre canards et a pu observer une augmentation des parasitémies au fil des transferts effectués. En revanche de nombreuses études impliquant des SPE de parasites de la malaria chez des rongeurs peuvent être répertoriées (Mackinnon et Read 1999 (*a* et *b*) ; Mackinnon *et al.* 2002 ; Ferguson *et al.* 2003 ; Mackinnon et Read 2003 et 2004 (*a* et *b*) ; Mackinnon *et al.* 2005 et 2008). Leurs résultats s'avèrent être globalement en accord avec l'hypothèse du *trade-off*. En effet en transférant *Plasmodium chabaudi* entre souris, ils ont pu montrer que les clones de parasites avec les plus forts taux de multiplication (sélectionnés au fil des passages) provoquaient une anémie, une perte de poids et une mortalité plus importantes que les clones à faible taux de réplication. En reproduisant ce type d'expérience chez les oiseaux, nous présumons une augmentation des parasitémies et une aggravation de la virulence sur les hôtes au fil des passages.

Nous avons conduit deux expériences de passages en série : une en incluant l'effet de la dose infectieuse, et une en considérant l'impact de l'immunité des hôtes dans l'évolution des parasites. Le protocole général des passages de parasites reste le même pour les deux études et est résumé par la figure 5.1. Nous invitons le lecteur à consulter l'annexe 6 pour plus de détails sur les méthodologies utilisées. Les parasites ont été passés entre groupes de canaris. Après chaque infection, nous avons laissé les parasites se développer dans le sang des oiseaux pendant un certain laps de temps (8 jours) avant de les utiliser pour infecter un nouveau groupe d'oiseau. À l'issue de chaque passage, nous avons testé la force de multiplication des parasites et la virulence occasionnée en les injectant à des groupes d'oiseaux naïfs dont nous avons suivi plus précisément la condition physique et les parasitémies.

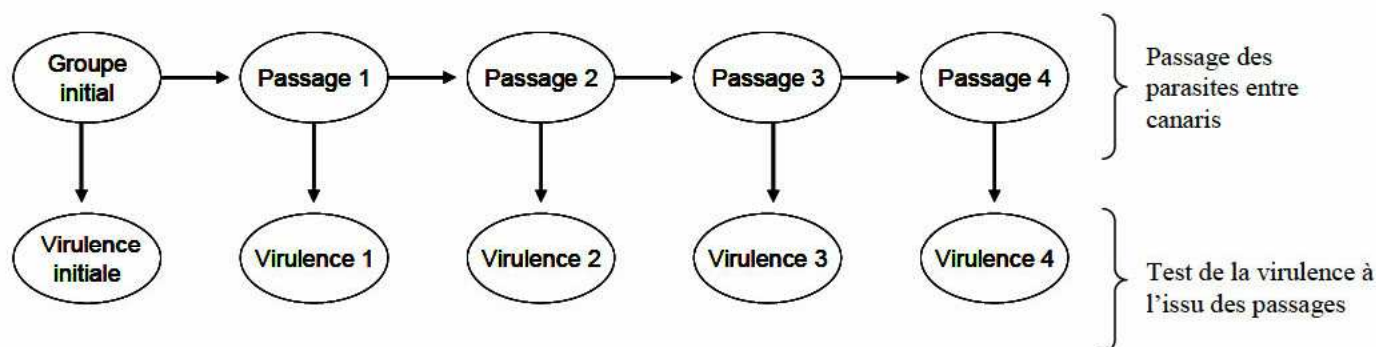


Figure 5.1 : Protocole des expériences de passages en série de *Plasmodium relictum* entre groupes de canaris. A partir du groupe initial, les parasites ont été transférés artificiellement entre groupes d'oiseaux tous les 8 jours (bulles « passage » sur le schéma). Afin de tester les changements de virulence occasionnés par les passages, nous avons transféré les parasites « passés » à des groupes de canaris naïfs (bulles « virulence » sur le schéma).

2. Effet de la dose infectieuse sur l'évolution de *Plasmodium relictum*

L'évolution de la virulence d'un parasite peut être influencée par différents facteurs liés aux caractéristiques de ce dernier, de l'hôte et de l'environnement. Ici nous avons choisi de nous intéresser à la façon dont la dose infectieuse serait susceptible d'agir sur l'évolution de *Plasmodium relictum* (annexe 6). Nous avons pu observer, précédemment, que l'effet du nombre de parasites injectés à l'hôte offrait des résultats assez contrastés, affaiblissant le lien que nous pourrions tisser entre dose et virulence. Nous avons, néanmoins, pu mettre en évidence qu'une forte dose infectieuse (un million de parasites inoculés) entraînait une

parasitémie importante dans le sang de l'hôte, ainsi qu'une anémie et une perte de poids plus élevées qu'après l'injection d'un nombre plus faible de parasites. La compétition intra-hôte pourrait être un facteur particulièrement important dans ce cas. En réalisant une SPE, nous supposons qu'une plus forte dose infectieuse augmenterait la probabilité d'avoir des souches de parasites plus virulents dans les *inoculums* et conduirait à une compétition plus intense entre parasites ; ceci pouvant conduire à la sélection de souches de plus en plus virulentes au fil des passages entre groupes d'hôtes.

Au cours des passages nous avons sélectionné des parasites présentant des taux de multiplication de plus en plus élevés, en particulier lorsque ces derniers ont été transférés à des doses de 10^5 et 10^6 individus (figure 5.2). En revanche le résultat est différent pour les parasites « passés » avec une dose de 10^4 , ces derniers ne présentant pas d'augmentation des parasitémies au fil des transferts. Nous n'avons pas été en mesure, pour cette dose infectieuse, de conduire le dernier passage de l'expérience, ne disposant pas d'un nombre suffisant de parasites. Globalement ces résultats sont en accord avec ceux généralement trouvés au cours des SPE, à savoir une augmentation des taux de multiplication au cours des passages. Pour la plus faible dose, il est possible que la compétition entre parasites n'ait pas été assez importante pour sélectionner des souches avec des taux de croissance plus importants et/ou une plus grande capacité à lutter contre les défenses de l'hôte.

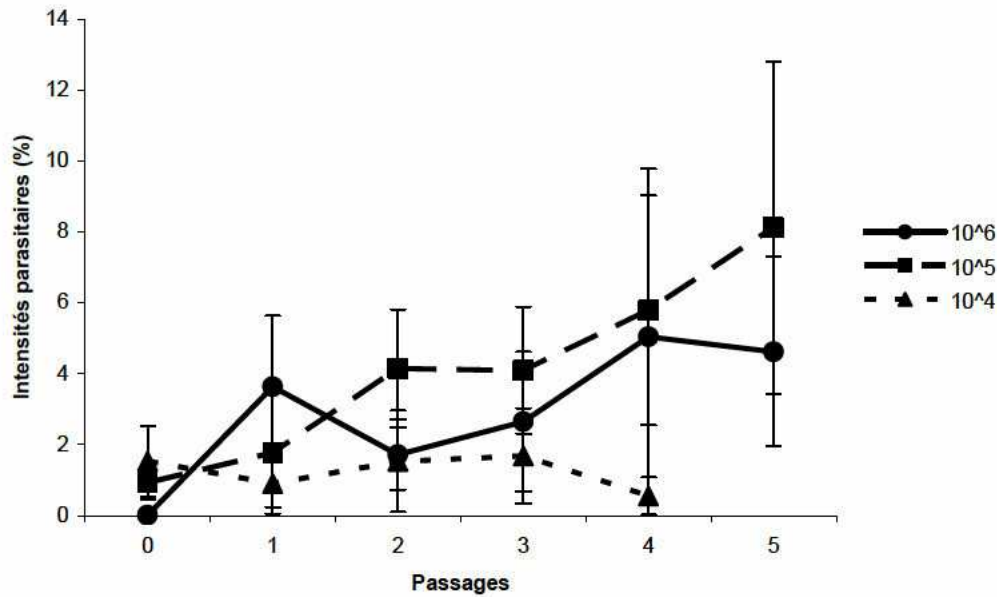


Figure 5.2 : Suivi des changements d'intensités de *Plasmodium relictum* au cours des passages entre groupes de canaris à trois doses différentes (10^4 , 10^5 et 10^6).

Le passage des parasites a été conduit à 3 doses différentes, mais les tests de virulence ont été effectués sur des canaris naïfs à une dose commune de 100.000 parasites. Les parasitémies ont été mesurées 8 jours après l'infection. Figure extraite de l'annexe 6.

Nous ne nous sommes pas seulement intéressée aux changements de parasitémies au fil des passages, mais également à la proportion de parasites sexués et asexués. Comme expliqué précédemment, les parasites de la malaria présentent deux voies de développement au sein de l'hôte vertébré : une multiplication asexuée directement impliquée dans la persistance de l'infection et la production de parasites sexués qui se reproduiront au sein du vecteur. La théorie des traits d'histoire de vie nous permet de supposer un *trade-off* entre réplication et transmission du parasite à de nouveaux hôtes (Stearns 1992). L'hypothèse de ce *trade-off* a été explorée par certaines études de passage en série de parasites (Dearsly *et al.* 1990 ; Mackinnon et Read 1999 (*a* et *b*) ; Mackinnon *et al.* 2002 ; Mackinnon et Read 2003). Une des hypothèses expliquant l'augmentation de virulence au cours des SPE repose sur l'idée qu'au cours de ces expériences les formes parasitaires assurant la transmission à de nouveaux hôtes ne sont plus nécessaires (transferts assurés par l'expérimentateur), ceci pouvant modifier la balance entre réplication et transmission. Ebert (2000) avance l'idée que les formes parasitaires assurant la transmission seraient plus coûteuses à produire car elles doivent posséder des structures les protégeant de l'environnement extérieur à l'hôte. On s'attendrait donc, au cours des SPE, à une diminution de l'investissement dans ces formes et une augmentation des formes assurant la réplication intra-hôte. Si Dearsly *et al.* (1990)

montrent que la proportion de gamétocytes de *Plasmodium chabaudi* diminue au cours des passages entre souris, ce n'est pas le cas des études conduites par Mackinnon et Read (Mackinnon et Read 1999 (*a* et *b*) ; Mackinnon *et al.* 2002 ; Mackinnon et Read 2003). Ces derniers sélectionnent des clones de *Plasmodium chabaudi* de plus en plus virulents au cours des transferts, produisant plus de formes asexuées mais aussi sexuées. Nos résultats, en revanche, rejoignent la théorie du *trade-off* puisque nous constatons que la proportion de gamétocytes diminue au fil des transferts (figure 5.3). Nous sommes bien sûr dans un cadre totalement artificiel où les vecteurs ne sont plus nécessaires à la transmission des parasites de la malaria entre hôtes. Ce résultat souligne néanmoins l'extraordinaire capacité d'adaptation de ces parasites à de nouvelles conditions.

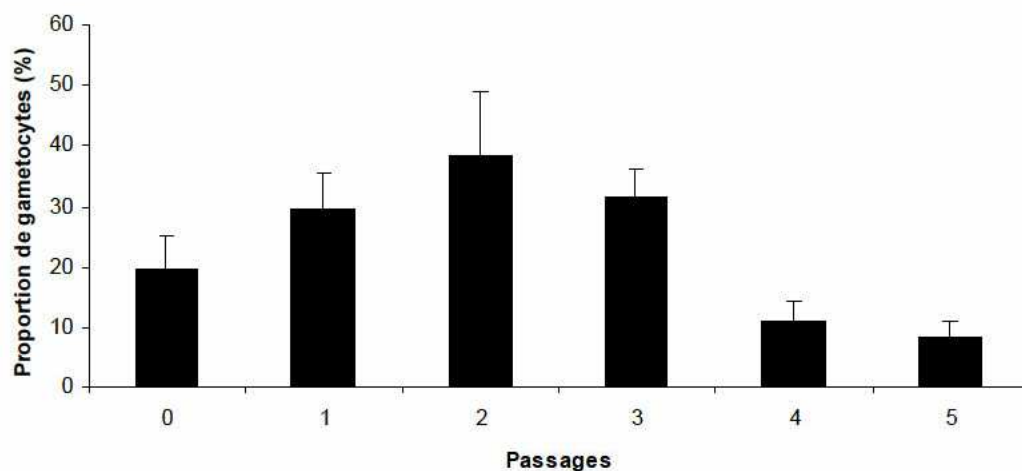


Figure 5.3 : Changement de la proportion de gamétocytes de *Plasmodium relictum* au fil des passages entre groupes de canaris.
Figure extraite de l'annexe 6.

Les résultats que nous obtenons quant à l'évolution des parasites (augmentation des taux de multiplication et diminution de l'investissement dans les formes de transmission) nous laisseraient volontiers supposer une augmentation de virulence au cours des passages. Or nous n'avons pu déceler un tel résultat. En effet les oiseaux ne présentaient pas de perte de poids, d'anémie ou de mortalité plus élevées au cours des passages. Nous pouvons avancer deux hypothèses expliquant ce résultat :

(1) Il est envisageable que nous n'ayons pas été capable de déceler l'évolution de virulence recherchée, soit parce que le suivi des oiseaux n'a pas été assez long (8 jours), soit parce nous n'avons pas conduit assez de passages pour que l'augmentation de virulence soit réelle et effective. Cependant avec le nombre de passages effectués, et le suivi à 8 jours post-infection, nous avons constaté une augmentation des parasitémies et un investissement

préférentiel des parasites dans la voie asexuée de leur développement. Nous aurions donc du percevoir les tout premiers signes d'une augmentation de virulence (même au bout de 8 jours et après seulement 5 passages).

(2) Nous avons pu mettre en évidence au cours d'une précédente expérience (voir chapitre 4) que les coûts résultant d'une infection par la malaria aviaire provenaient de la multiplication des parasites au sein de l'hôte mais également de la réponse immunitaire de ce dernier face à l'infection. Au cours de notre SPE, nous avons sélectionné des parasites avec des taux de multiplication de plus en plus élevés, mais une possible dissociation entre charge parasitaire et virulence pourrait expliquer pourquoi ces parasites n'entraînent pas plus de coûts pour leurs hôtes.

Ne pouvant apporter plus d'éléments d'explication sur ce point, nous pensons que l'hypothèse (1) reste plus probable. Quoiqu'il en soit, il semble important de considérer la réponse immunitaire de l'hôte dans l'évolution de la virulence des parasites. C'est ce que nous avons voulu tester lors de l'étude présentée par la suite (section 6.3).

Provoquer l'évolution des parasites en laboratoire, et comprendre pourquoi cela ne se produit pas en conditions naturelles, peut nous permettre de déceler les forces évolutives influençant la virulence des parasites. Globalement nos résultats mettent en relief la formidable capacité d'adaptation des parasites, et soulignent le rôle important de la compétition intra-hôte pour l'évolution de ces derniers. Ainsi, en conditions naturelles, des facteurs écologiques ou épidémiologiques qui augmenteraient le taux des infections multiples (ex : augmentation du nombre de vecteurs, des probabilités de piqûres), pourraient conduire à une évolution des parasites de la population, voir une augmentation de leur virulence (Nowak et May 1994 ; Herre 1995 ; Frank 1996).

3. Effet de l'immunité de l'hôte

Nous avons pu constater précédemment (voir chapitre 4) que la virulence est un trait composite qui dépend de l'exploitation de l'hôte par le parasite mais aussi de la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection. Nous avons pu le démontrer dans le cas de la malaria aviaire, et nos conclusions rejoignent celles d'autres études concernant des maladies infectieuses chez les mammifères, notamment dans le cas de malaria humaine et chez des rongeurs (Graham *et al.* 2005 (*a* et *b*)). Quels peuvent être les effets de l'immunité de l'hôte

dans l'évolution de la virulence des parasites de la malaria aviaire ? C'est à cette question que nous allons tenter de répondre ici, en intégrant les effets de l'immunité dans une expérience de passages de parasites en série.

L'effet de l'immunité sur l'évolution de la virulence a été considéré, par des études théoriques et expérimentales, dans des contextes de vaccination des populations hôtes. Les vaccins n'offrent que très rarement une protection totale face aux maladies infectieuses. Cependant des vaccins dits « imparfaits » peuvent être utilisés afin de conférer aux hôtes une protection partielle contre un agent infectieux. Gandon et ses collaborateurs (2001) ont développé des modèles afin d'estimer l'impact de différents types de vaccins « imparfaits » sur l'évolution de la virulence des parasites (considérée par les auteurs de l'étude en terme de mortalité des hôtes), et les conséquences de cela en santé humaine.

La résistance de l'hôte face à une infection peut se situer à trois niveaux (figure 5.4) :

- r_1** - une résistance contre l'infection, diminuant ainsi la probabilité pour l'hôte d'être infecté.
- r_2** - une résistance contre la croissance du parasite au sein de l'organisme, ce qui, si l'on considère une relation positive entre multiplication parasitaire et virulence, réduirait les dommages que le parasite est susceptible de générer à son hôte.
- r_3** - une résistance diminuant le taux de transmission du parasite.

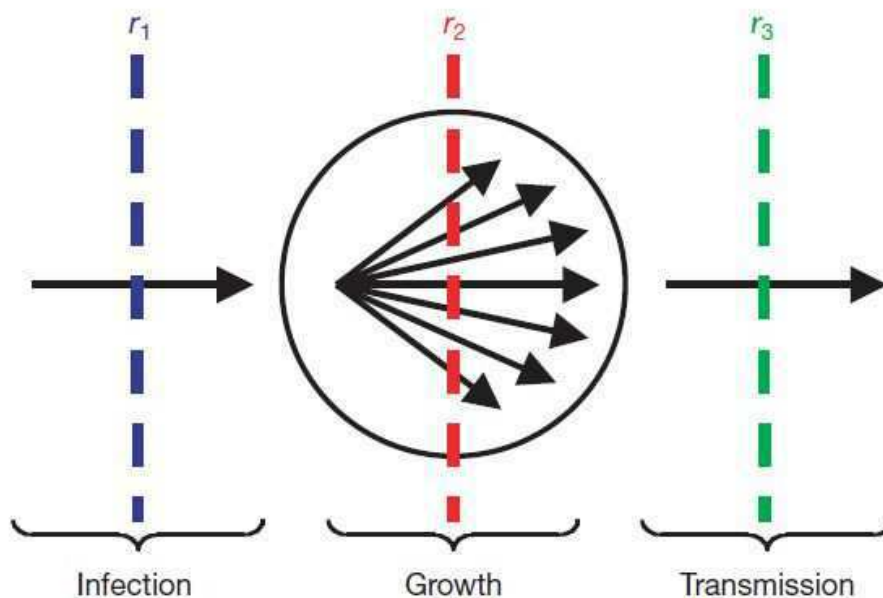


Figure 5.4 : Représentation schématique de l'action de différents types de résistance de l'hôte à différents moments du cycle du parasite. Figure extraite de Gandon et al. 2001

r_1 : résistance contre l'infection - r_2 : résistance face à la croissance du parasite au sein de l'hôte - r_3 : résistance bloquant la transmission du parasite

Ces modèles, ajustés à partir d'expériences sur la malaria des rongeurs et de données sur la malaria humaine (Mackinnon *et al.* 2008), prédisent qu'une intervention de type vaccin ou médication qui réduirait la densité de parasites asexués dans le sang des hôtes, sans pour autant bloquer l'infection, pourrait conduire à une évolution des parasites vers une virulence plus forte. En effet dans un hôte semi-immunisé contre la malaria, les parasites pourraient avoir un niveau de virulence intrinsèque (celle que l'on mesurerait si ce dernier infectait un hôte immunologiquement naïf) élevée, sans pour autant provoquer la mort de l'hôte semi-résistant. On s'attendrait donc à ce que la virulence évolue plus fortement dans une population présentant un niveau d'immunité élevé par rapport à une population immunologiquement naïve. Cette hypothèse a été testée au cours d'expériences de passages en série de *Plasmodium chabaudi* entre souris immunisées et naïves (Mackinnon et Read 2004, Mackinnon *et al.* 2008). Les parasites transférés entre souris immunisées présentent des virulences plus élevées que ceux passés entre souris immunologiquement naïves. Ce résultat est en accord avec les conclusions des modèles théoriques qui prédisent que les vaccins dirigés contre les stades sanguins de la malaria devraient sélectionner des parasites plus virulents. Au contraire des vaccins, des mesures d'hygiène, évitant l'infection et la transmission des parasites (résistances de type r_1 et r_3 , voir figure 5.4), seraient supposées favoriser une virulence plus faible.

Ces études présentent un intérêt capital dans la mise en place de stratégies de lutte contre le paludisme, et révèlent une nouvelle fois la nécessité d'intégrer les sciences de l'évolution aux sciences médicales. Cependant l'immunité n'est, dans ce cas, considérée que par sa fonction de protection de l'organisme contre les attaques extérieures. Qu'en serait-il dans un système où la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection serait responsable d'une partie des symptômes de la maladie ? D'après les études de Day *et al.* (2007), ceci dépendrait de la relation existante entre exploitation des parasites et immunopathologie :

- si les coûts immunopathologiques sont indépendants du niveau d'exploitation des parasites (c.-à-d. plus de parasites n'entraînent pas plus de coûts immunopathologiques) alors les prédictions avancées par les modèles de Gandon *et al.* (2001) restent valides.
- au contraire s'il existe une relation positive entre immunopathologie et exploitation des parasites, une augmentation du taux d'élimination des parasites (par des vaccins ou médicaments) conduirait potentiellement à une évolution vers des taux d'exploitation plus réduits.

L'affaire se complique si l'on considère un système où l'immunopathologie engendre certains bénéfices pour les parasites. Dans le cas de la tuberculose par exemple, le système immunitaire provoque des lésions au niveau des poumons de l'hôte ce qui facilite la transmission de *Mycobacterius tuberculosis* (Graham *et al.* 2005a). Dans ce contexte, les parasites auraient tout intérêt à ce que l'infection entraîne des coûts immunopathologiques (sans aller jusqu'à la mort de l'hôte).

Sortant du cadre de la vaccination, nous avons voulu tester l'effet de l'immunité de l'hôte sur l'évolution de la virulence dans un système où nous avons noté l'existence de coûts immunopathologiques. Pour cela nous avons effectué une expérience de passages en série de parasites (*Plasmodium relictum*-lignée SGS1) soit entre groupes de canaris dont nous avons inhibé la réponse immunitaire, soit entre groupes d'oiseaux non manipulés. Pour inhiber l'immunité, nous avons, comme lors de l'expérience décrite dans le chapitre 4, injecté une solution de cyclophosphamide aux canaris, la veille de leur infection par les parasites. La dose choisie était cette fois ci de 200mg/kg. Ainsi *Plasmodium relictum* a été passé huit fois entre groupe d'oiseaux contrôles et huit fois entre groupe d'oiseaux dont la réponse immunitaire (et par conséquent les coûts immunopathologiques) a été inhibée par l'action du cyclophosphamide. A l'issue des 6^{ème} et 8^{ème} passages, nous avons testé la virulence et la capacité multiplicatrice des parasites en les injectant à des canaris naïfs dont nous avons suivi les changements de condition physique et de parasitémie pendant 17 jours.

Lors d'une précédente expérience, nous avons pu montrer que les coûts d'une infection par *Plasmodium relictum* provenaient à la fois de la multiplication des parasites au sein des oiseaux, mais également de la réponse immunitaire de l'hôte contre l'infection. Nous avons pu constater que lorsque nous inhibons l'immunité des canaris, ces derniers présentaient certes des parasitémies plus importantes mais en revanche payaient moins de coûts suite à l'infection. Si les oiseaux immuno-déprimés souffrent moins de l'infection, nous pourrions donc nous attendre à ce que les parasites évoluent vers des taux d'exploitation plus importants sans risquer la mort de l'hôte immuno-déficient. Si ces derniers infectent par la suite un hôte présentant une immunité « normale », on pourrait alors s'attendre à ce que la virulence occasionnée soit, par conséquent, plus forte.

A l'issue du 6^{ème} passage, les résultats obtenus semblaient prometteurs. En effet nous avons observé que les parasites passés entre canaris immuno-déprimés présentaient des taux

de multiplication plus importants (Interaction Traitement x Jours post-infection : $p < 0,0001$, Figure 5.5).

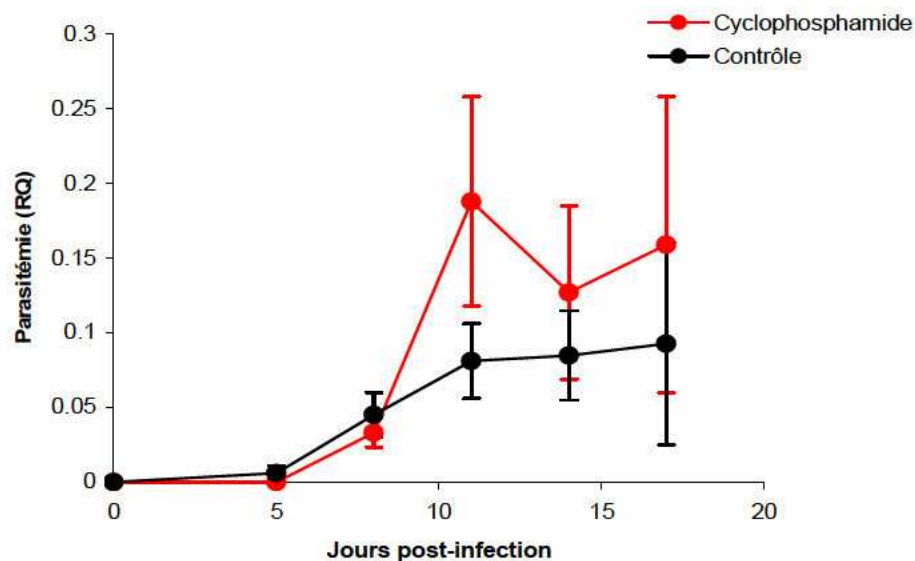


Figure 5.5 : Dynamique de *Plasmodium relictum* dans le sang de canaris expérimentalement infectés.
Les parasites utilisés ont effectué au préalable 6 passages entre groupes de canaris immuno-déprimés par une injection de cyclophosphamide (courbe rouge) ou non manipulés (courbe noire)

Cette parasitémie plus importante est associée à une virulence plus accrue. En effet les parasites passés entre hôtes immuno-déprimés provoquent une perte de poids plus importante (Interaction Traitement x Jours post-infection : $p = 0,0001$, Figure 5.6). De plus, les différences de mortalité sont sans équivoque puisque 50 % des canaris décèdent après l'injection de parasites transférés au préalable sur des hôtes sous traitement de cyclophosphamide, contre aucun décès observé pour les parasites contrôles. En ce qui concerne les variations des taux d'hématocrite, nous n'observons pas de différences statistiquement significatives (Interaction Traitement x Jours post-infection : $p = 0,14$) bien que graphiquement les oiseaux ayant reçu les parasites passés entre oiseaux immuno-déprimés présentent une perte maximale plus importante (Figure 5.7).

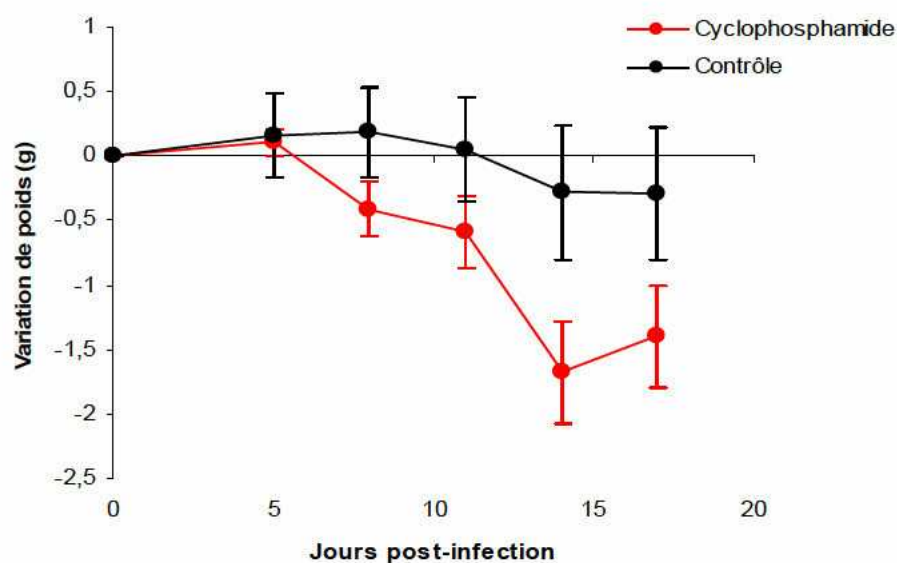


Figure 5.6 : Variation de poids de canaris expérimentalement infectés par *Plasmodium relictum*
 Les parasites utilisés ont effectué au préalable 6 passages entre groupes de canaris immuno-déprimés par une injection de cyclophosphamie (courbe rouge) ou non manipulés (courbe noire)

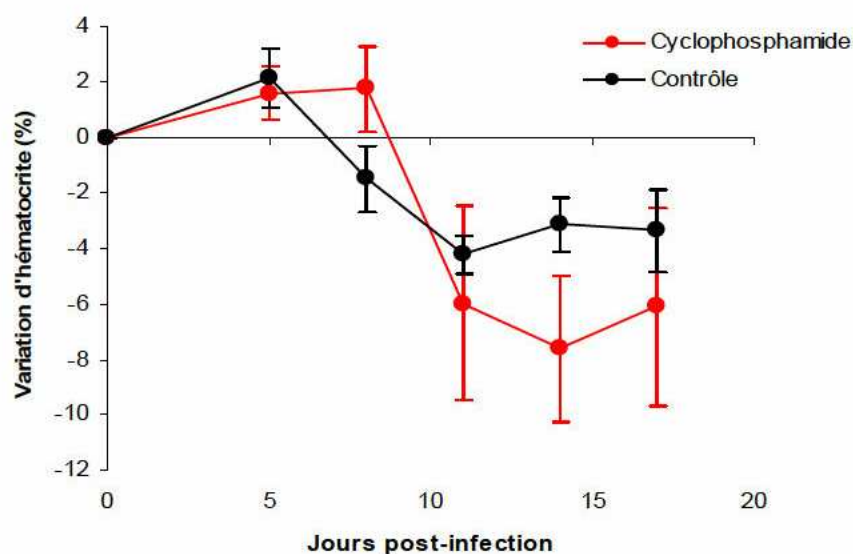


Figure 5.7 : Variation des taux d'hématocrite de canaris expérimentalement infectés par *Plasmodium relictum*
 Les parasites utilisés ont effectué au préalable six passages entre groupes de canaris immuno-déprimés par une injection de cyclophosphamie (courbe rouge) ou non manipulés (courbe noire)

Si les résultats semblaient significatifs à l'issue des six premiers passages, ils sont tout autres après huit passages. En effet à ce moment là, aucun effet du traitement ne se dégage ni sur les parasitémies, ni sur les signes de virulence. Le fait d'avoir passé les parasites deux fois

de plus entraîne une augmentation des taux de multiplication parasitaire ($p = 0,0009$) et une diminution plus importante des taux d'hématocrite ($p < 0,0001$). Cette augmentation de virulence au fil des passages représente un résultat classique des expériences de passages en série de parasites (Ebert 1998 et 2000). Cependant ces résultats apparaissent être les mêmes pour les parasites transférés au préalable entre hôtes immuno-déprimés et hôtes contrôles. Pour expliquer cela nous pouvons avancer deux hypothèses :

- Absence d'effet : le fait d'avoir passé les parasites entre hôtes immuno-déprimés n'entraîne pas d'évolution remarquable des parasites. La virulence augmente au fil des passages, mais ceci ne semble pas être lié aux caractéristiques de l'immunité des oiseaux. Le fait que nous observions des différences de virulence au bout de six passages entre les deux catégories de parasites (passés sur hôte immuno-déprimés ou contrôles), puis que cette différence soit « gommée » à l'issue du 8^{ème} passage, indique peut être une évolution plus rapide des parasites lorsque la réponse immunitaire est inhibée. Cependant après huit passages, ces parasites sont « rattrapés » (en terme de virulence) par ceux passés entre hôte contrôles. Existe-t-il un seuil ou une saturation de l'évolution de la virulence des parasites après un certain nombre de passages ? Ce phénomène observé et cette dernière hypothèse nécessiteraient une investigation plus poussée par un nouveau plan expérimental.

- Problème expérimental : les parasites passés huit fois (sous les deux conditions expérimentales) ont entraîné une mortalité élevée des canaris naïfs chez lesquels nous avons testé la virulence, et cela a réduit considérablement les tailles d'échantillons de chacun des deux groupes d'oiseaux, rendant délicate l'analyse statistique et l'interprétation des données obtenues en raison d'une faible puissance des tests statistiques utilisés. L'absence d'effet observée à l'issue de huit passages en est peut être la conséquence. Il serait donc nécessaire de reproduire cette expérience en augmentant les tailles d'échantillon de chacun des groupes de canaris.

Ainsi, à l'issue de cette expérience, nous ne pouvons pas encore conclure sur un éventuel effet permanent ou cumulé de l'immunité sur l'évolution de la virulence des parasites. Toutefois, les résultats significatifs à l'issue des six premiers passages nous invitent à étudier plus en profondeur cette question. Cela nécessiterait une nouvelle planification d'expérience permettant de répondre au problème soulevé ainsi qu'une nouvelle investigation plus affinée par l'étude plus précise des mécanismes immunitaires mis en place au cours d'une infection par la malaria aviaire.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les relations existantes entre *Plasmodium relictum*, l'un des parasites de la malaria aviaire les plus fréquemment trouvés dans les populations naturelles d'oiseaux, et l'un de ces hôtes aviaires : le canari domestique (*Serinus canaria*). Par des approches expérimentales, nous avons pu appréhender l'impact de certains facteurs, liés aux caractéristiques du parasite ou de l'hôte, sur la virulence de *P. relictum* ainsi que sur son évolution. Nous avons pu mettre en évidence que des facteurs tels que le passé infectieux de l'hôte, la dose infectieuse reçue, la prévalence du parasite dans la population ou encore la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection, pouvaient agir sur les dommages observés chez l'oiseau. Comprendre et expliquer les différences de virulence, en particulier pourquoi un parasite va se trouver dangereux pour ses hôtes sous certaines conditions, ainsi que prédire les changements de virulence représentent des challenges important en biologie évolutive autant que pour les sciences médicales.

Comme nous avons pu le souligner tout au long de ce travail, les études concernant la malaria aviaire ne sont pas récentes puisque depuis plus d'un siècle les scientifiques accumulent les connaissances à ce sujet. Pourtant notre étude puise son originalité dans les plans d'expérience mis en œuvre et les techniques expérimentales utilisées ainsi que dans les champs thématiques abordées. En effet l'étude des coûts immunopathologiques suite à l'infection, ou encore l'utilisation d'expériences de passages en série de parasites afin de déterminer les facteurs impliqués dans leur évolution, n'ont, à notre connaissance, jamais été réalisées dans le cas de la malaria aviaire.

Lorsqu'un parasite de la malaria aviaire infecte son hôte vertébré, il va présenter une multiplication active pour lui permettre de persister suffisamment longtemps afin de produire des formes de transmission aux vecteurs avant que l'infection ne soit contrôlée par l'oiseau. Cette multiplication, avantageuse au premier abord pour le parasite, va entraîner un certain nombre de coûts pour l'hôte risquant d'entraîner sa mort. Nous avons mesuré certains de ces coûts, comme la destruction des globules rouges par exemple, mais il faut garder à l'esprit que les parasites sont également susceptibles d'agir sur d'autres aspects de la physiologie de leur hôte. Ils peuvent, par exemple, libérer des toxines qui augmentent leurs chances de s'établir au sein de l'hôte (White et Ho 1992 ; McKerrow *et al.* 1993 ; Marsh et Snow 1997) ou encore

entraîner des phénomènes de cytoadhérence des cellules infectées (agglutination des cellules les unes aux autres ; Makinnon et Read 2004). Cette agglutination de cellules peut diminuer les risques d'élimination des parasites par le système immunitaire de l'hôte (Urban et Roberts 2002) mais, en contrepartie, cela peut provoquer une obstruction des vaisseaux sanguins, une hypoxie et plus globalement de nombreux dommages au niveau des organes (Clark et Rockett 1996 ; Mackinnon et Read 2004). Si nous nous sommes surtout concentrée sur les symptômes physiques de la maladie, il pourrait être intéressant par la suite d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents. À ce schéma des coûts de la malaria aviaire, notre étude nous permet d'ajouter l'effet de la réponse immunitaire de l'hôte dont l'exubérance peut entraîner certaines pathologies. À ce sujet, la figure c.1 illustre, de façon simplifiée, les coûts et bénéfices de la virulence de parasites de la malaria.

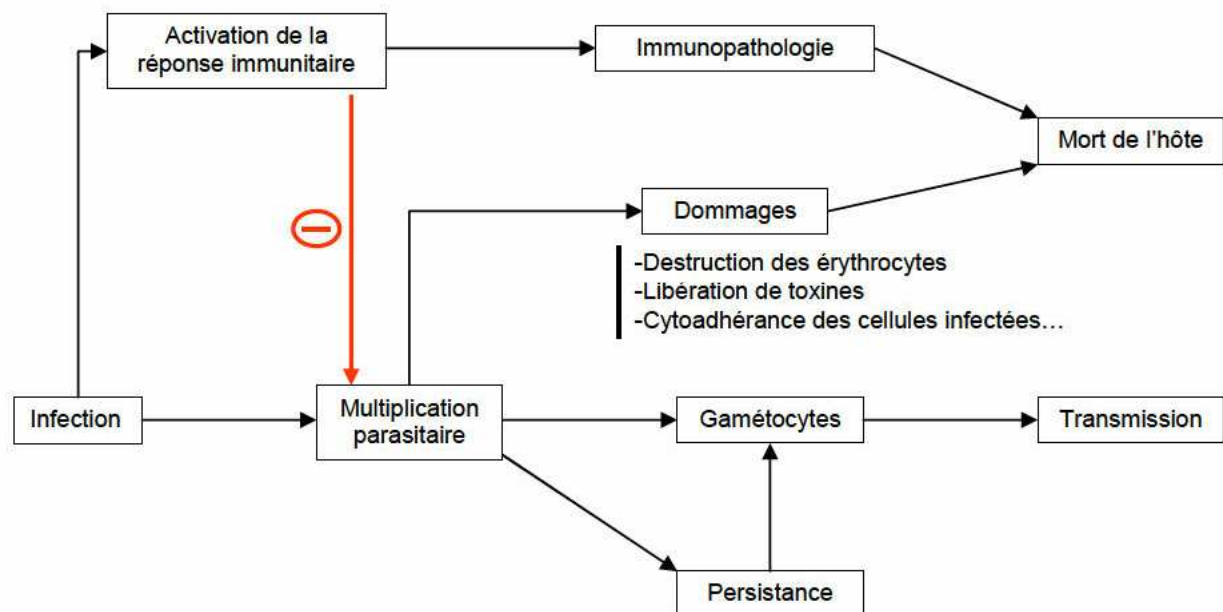


Figure c.1 : Représentation schématique des conséquences de l'infection par des parasites de la malaria. Figure modifiée de Mackinnon et Read (2004).

Une multiplication active des parasites leur permet de persister au sein de l'hôte et de produire les formes de transmission aux vecteurs. Cette multiplication peut aussi entraîner des coûts directs (ex : destruction des érythrocytes) et indirects (immunopathologie) pouvant conduire à la mort de l'hôte.

L'approche expérimentale, pour laquelle nous avons opté, nous a permis de dissocier les coûts de la malaria aviaire et de tester les facteurs impliqués en nous détachant du contexte écologique dans lequel se trouvent les oiseaux en populations naturelles. Ce contexte peut entraîner un certain nombre de facteurs confondants qui rendent difficile la réelle estimation

de l'impact d'une infection. En effet la prédation, la compétition, la disponibilité des ressources alimentaires...peuvent se surajouter aux coûts qu'un individu va payer suite à une infection parasitaire. Si nous avons procédé à des infections expérimentales en conditions contrôlées, il faut garder à l'esprit qu'en conditions naturelles les individus vivent dans des environnements variables dans l'espace et dans le temps, et cela va avoir des conséquences pour les interactions entre hôtes et parasites. Le contexte écologique représente une source importante de variation pouvant moduler les bénéfices de la résistance des hôtes ainsi que les coûts des infections. À ce titre, les scientifiques accumulent les preuves des effets de l'environnement sur l'issue des interactions entre hôtes et parasites. Par exemple, il a été montré que la température ambiante pouvait quantitativement affecter la résistance d'invertébrés à des infections microbiennes (Mitchell *et al.* 2005 ; Lazzaro *et al.* 2008 ; Linder *et al.* 2008). En nous détachant du contexte écologique, nous sommes consciente que nos résultats ne sont peut être pas généralisables aux populations naturelles d'oiseaux et à leurs cortèges de parasites. Cependant comprendre pourquoi certains phénomènes se produisent en laboratoire et pas dans des environnements naturels peut nous permettre de déceler les forces évolutives impliquées dans la virulence des parasites. Il pourrait être intéressant, dans la poursuite de nos travaux, de prendre en compte le contexte écologique dans lequel se déroule l'exposition aux parasites, notamment d'étudier l'évolution des réponses phénotypiques des hôtes en réponse à l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la pression parasitaire (Agrawal 2001 ; Gandon et Michalakis 2002).

Notre étude s'est concentrée sur les formes parasitaires se développant dans le sang des hôtes vertébrés, laissant de côté la seconde partie du cycle de ces parasites se déroulant au sein des insectes piqueurs (principalement des moustiques). Siège incontournable de la reproduction sexuée des parasites, les vecteurs sont susceptibles de jouer un rôle important dans l'évolution de la virulence de ces derniers. En effet le comportement des moustiques ainsi que plusieurs aspects de leur écologie vont déterminer les hôtes vertébrés dans lesquels les parasites seront transmis. Les parasites, en fonction du bon vouloir de leurs vecteurs, sont susceptibles d'être transférés à des hôtes de différentes espèces aviaires, présentant différents niveaux de défenses immunitaires. Par ailleurs, pendant le temps nécessaire aux parasites pour achever leur développement au sein du vecteur, ils peuvent provoquer dans ce dernier un certain nombre de dommages (Ferguson et Read 2002 ; Dawes *et al.* 2009). Si l'impact du parasite est trop important pour la survie du vecteur, il ne pourra être transmis à son hôte vertébré. Ainsi le passage au vecteur impose de nouvelles pressions de sélection : (1) survivre

à l'immunité du vecteur (2) y assurer la reproduction sexuée (3) pouvoir être transmis à un hôte vertébré avant la mort du moustique. Si l'étude des relations entre parasites et vecteurs semble nécessaire, elles n'ont que peu été étudiées dans le cas de la malaria aviaire (Valkiūnas 2005). Cela pourrait constituer une perspective de recherche intéressante.

L'étude de l'évolution de la virulence présente des implications importantes tant en santé humaine que dans des perspectives de conservation d'espèces. De nombreux facteurs sont susceptibles d'influer sur l'évolution de la virulence des parasites, et, parmi eux, la compétition intra-hôte a été suggérée jouer un rôle important (De Roode *et al.* 2005). Nous avons pu aborder cette notion de compétition au travers de nos expériences en procédant à l'injection d'un nombre croissant de parasites et en testant son effet sur la virulence occasionnée et sur son évolution. Quels peuvent être les mécanismes impliqués dans la compétition entre parasites ? Read et Taylor (2001) en proposent trois :

(1) la compétition peut être vue comme un phénomène passif où un parasite va être affecté par la quantité de ressources restantes une fois que d'autres parasites les ont exploitées.

(2) la compétition peut passer par l'attaque ou l'exclusion, mécanique ou chimique, des compétiteurs.

(3) l'augmentation de la densité d'un clone donné de parasites peut avoir des effets négatifs sur les autres clones en stimulant la réponse immunitaire de l'hôte. Dans ce contexte, les parasites avec la plus forte représentation numérique pourraient être avantagés puisque l'immunité éliminera plus rapidement ceux dont la densité au sein de l'hôte est plus faible.

En populations naturelles, les hôtes sont susceptibles d'être infectés par plusieurs lignées différentes de parasites, voir même plusieurs espèces. L'hôte peut ainsi faire face à différents types de pressions parasitaires. Si les différents parasites exploitent les mêmes ressources au sein de l'hôte, la compétition entre eux est susceptible d'être importante. Intégrer la diversité génétique des parasites, leurs relations et leurs impacts pour l'hôte à l'étude de l'évolution des interactions hôte-parasites représente un challenge stimulant pour les études à venir.

Nous avons mis en évidence que les symptômes résultants d'une infection par la malaria aviaire provenaient en partie de la réponse immunitaire de l'hôte. Ceci remet en question l'image que nous pouvions avoir d'une immunité toujours bénéfique et d'un parasite endossant « le rôle du méchant ». Il existe de nombreux exemples d'infection où les parasites

n'ont pas l'effet négatif escompté, allant jusqu'à générer certains bénéfices pour l'hôte. En effet certains parasites peuvent :

- **Protéger l'hôte contre d'autres infections parasitaires.** Par exemple Lysenko *et al.* (2005) ont montré que lorsque qu'une souris était co-infectée par les bactéries *Haemophilus influenza* et *Streptococcus pneumoniae* (bactéries colonisant les voies respiratoires), la première éliminait complètement la deuxième.

- **Réduire la gravité d'autres maladies infectieuses.** Par exemple la forme cérébrale de la malaria des rongeurs, suite à une infection par *Plasmodium berghei* est atténuée suite à l'inoculation de *Brugia pahangi* (nématodes microfilaire) (Yan *et al.* 1997)

- **Réduire le risque de développer une maladie auto-immune.** Par exemple l'infection expérimentale de souris par le trématode *Schistosoma mansoni* a été montrée éviter le développement des diabètes de type 1 (Cooke *et al.* 1999)

Parasites impliqués dans la diversité et le fonctionnement des écosystèmes (Poulin *et al.* 2000 ; Hudson *et al.* 2006), dans le maintien de la reproduction sexuée (Hamilton 1980 ; Hamilton et Zuk, 1982), dans la diversité phénotypique des hôtes et maintenant dans la protection contre des maladies...nous sommes loin de l'image uniquement néfaste que nous pouvions avoir d'eux il y a quelques décennies.

Les hôtes et les parasites sont engagés dans une véritable course aux armements, le premier tentant d'éviter les coûts infligés par le parasite, et ce dernier désirant optimiser son exploitation de l'hôte. L'issue de ce conflit va dépendre de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, mais le facteur environnemental le plus crucial pour le parasite semble être l'immunité de l'hôte. Depuis les années 90, la communauté scientifique a pu assister à l'émergence d'une nouvelle discipline : l'immuno-écologie (Foldstad et Karter 1992 ; Sheldon et Verhulst 1996). Cette dernière inscrit le fonctionnement du système immunitaire dans un contexte d'écologie évolutive afin de comprendre ce qui génère et maintient de la diversité au niveau des défenses immunitaires, et comment la sélection naturelle a façonné l'investissement des individus dans l'immunité. Nous avons abordé certaines thématiques immuno-écologiques dans ce travail de thèse, et nous suggérons poursuivre les efforts d'investigation dans cette voie afin d'explorer cette facette de la co-évolution entre hôtes et parasites. Pour cela nous ne saurions que trop suggérer l'utilisation de ce fascinant modèle qu'est la malaria aviaire de part ses applications dans le domaine médical et dans la conservation d'espèces. De plus l'accumulation des connaissances depuis plus d'un siècle sur

la malaria forme une véritable pyramide sur laquelle nous pouvons nous élever pour démêler chaque jour un peu plus les relations complexes entre ces parasites et leurs hôtes. Tout ceci, ajouté à la formidable capacité d'adaptation de ces parasites à de nouvelles conditions environnementales, font des parasites de la malaria aviaire des candidats idéals pour l'étude de l'évolution des interactions hôtes-parasites

Bibliographie

- [1] Ahmed, R. and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60.
- [2] Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**, 321-326.
- [3] Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. and Van Baalen, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*. **22**, 245-259.
- [4] Anderson, R.M. and May, R.M. (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology* **47**, 219-247.
- [5] Anderson, R.M. and May, R.M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411-426.
- [6] Anderson, R.M. and May, R.M. (1991). *Infectious Diseases in Humans: Dynamics and Control*. Oxford University Press, Oxford.
- [7] Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Wood, K.L. and Lease, J.K. (2001). Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Disease* **37**, 20-27.
- [8] Atkinson, C.T., Woods, K.L., Dusek, R.J., Sileo, L.S. and Iko, W.M. (1995). Wildlife disease and conservation in Hawaii: Pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology* **111**, S59-S69.
- [9] Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Wood, K.L. and Iko, W.M. (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Disease* **36**, 197-204.
- [10] Atkinson, C.T. and Samuel, M.D. (2010). Avian malaria *Plasmodium relictum* in native Hawaiian forest birds: epizootiology and demographic impacts on apapane *Himatione sanguinea*. *Journal of Avian Biology* **41**, 357-366.
- [11] Ball, G. H. and Chao, J. (1961). Infectivity to canaries of sporozoites of *Plasmodium relictum* developing *in vitro*. *The Journal of Parasitology* **47**, 787-790.
- [12] Bates, D. and Maechler, M. (2010). *Lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes*. R package version 0.999375-33. Disponible sur le site [<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>] (consulté en janvier 2010).

- [13] Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B.H., Atkinson, C.T., Bensch, S., Graves, G.R., Jhala, Y.V., Peirce, M.A., Rahmani, A.R., Fonseca, D.M. and Fleischer, R.C. (2006). Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences B* **273**, 2935-2944.
- [14] Bedhomme, S., Agnew, P., Vital, Y., Sidobre, C. and Michalakakis, Y. (2005). Prevalence-dependent costs of parasite virulence. *PLoS Biology* **3** (8), e262.
- [15] Bell, A.S., De Roode, J.C., Sim, D. and Read, A.F. (2006). Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution* **60**, 1358-1371.
- [16] Belyi, Y., Niggeweg, R., Opitz, B., Vogelsgesang, M., Hippenstiel, S., Wilm, M. and Aktories, K. (2006). *Legionella pneumophila* glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **103**, 16953-16958.
- [17] Bennett, G.F., Peirce, M.A. and Caines, J.R. (1993). Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* **27**, 993-1001.
- [18] Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldensrtöm, J. and Hellgren, O. (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* **58**, 1617-1621.
- [19] Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H. and Pinheiro, R.T. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences B* **267**, 1583-1589.
- [20] Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D. and Hasselquist, D. (2007). Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology* **76**, 112-122.
- [21] Boyd, G.H. (1925). The influence of certain experimental factors upon the course of infections with *Plasmodium praecox*. *American Journal of Hygiene* **5**, 818-837.
- [22] Brake, D.A. (2003). Parasites and immune responses: Memory illusion? *DNA and Cell Biology* **22**, 405-419.
- [23] Brode, S., Raine, T., Zacccone, P. and Cooke, A. (2006). Cyclophosphamide-induced Type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* **177**, 6603-6612.
- [24] Brodeur, J. and Boivin, G. (2004). Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology* **49**, 27-49.
- [25] Brown, M.E. (1996) Assessing body condition in birds, in Nolan V.Jr & Ketterson E.D (Eds). *Current ornithology*, Vol 13. Plenum Press, New York, 67-136.

- [26] Brown, A.F. and Pascoe, D. (1989). Parasitism and host sensitivity to cadmium – an acanthocephalan infection of the fresh-water amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Applied Ecology* **26**, 473-487.
- [27] Bull, J.J. (1994). Virulence. *Evolution* **48**, 1423-1437.
- [28] Calabrese, K.S., Lagrange, P.H. and Gonçalves da Costa, S.C. (1996). Chagas' disease: enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. *International Journal Immunopharmacology* **18**, 505-514.
- [29] Caldas, S., Santos, F.M., de Lana, M., Diniz, L.F., Machado-Coelho, G.L.L., Veloso, V.M. and Bahia, L.T. (2008). *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. *Experimental Parasitology* **118**, 315-323.
- [30] Carillo, C., Lu, Z., Borca, V., Vagnozzi, A., Kutish, G.F. and Rock, D.L. (2007) Genetic and phenotypic variation of Foot-and-Mouth Disease Virus Turing serial passages in a natural host. *Journal of virology* **81**, 11341-11351
- [31] Celli, A. and Sanfelice, F. (1891). Ueber die Parasiten des rothen Blutkörperchens im Menschen und in Thieren. *Fortschritte der Medizin* **9**, 499-511, 541-552, 581-586.
- [32] Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. (2010). Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology* **40**, 1447-1453.
- [33] Chu, F.L.E. and Volety, A.K. (1997). Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in eastern oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Disease of Aquatic Organisms* **28**, 61-68.
- [34] Clark, L. and Mason, J.R. (1985). Use of nest material as insecticidal and anti-pathogenic agents by the European starling. *Oecologia* **67**, 169-176.
- [35] Clark, I. A. and Rockett, K. A. 1996 Nitric oxide and parasitic disease. *Advances in Parasitology* **37**, 1-56.
- [36] Coatney, G. R., Cooper, W. C., Eddy, N. B. and Greenberg, J. (1953). Survey of antimalarial agents. Chemotherapy of *Plasmodium gallinaceum* infections, toxicity, correlation of structure and action. *Public Health Monograph* **9**, 322p.
- [37] Combes, C. (2001). *Parasitism. The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Chicago University Press, Chicago, 552p.
- [38] Cooke, A., Tonks, P., Jones, F.M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A.J.C. and Dunne, D.W. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology* **21**, 169-176.

- [39] Cooke, A., Zaccane, P., Raine, T., Phillips, J.M. and Dunne, D.W. (2004). Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends in Parasitology* **20**, 316-321.
- [40] Corradetti, A. and Cavaceppi, L. (1952). Relations between the Endohistiocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* and the immunological course of the infection in fowls inoculated with infected brain tissue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1**, 761-767.
- [41] Corradetti, A., Garnham, P.C.C., Neri, I., Scanga, M. and Cavallini, C. (1970). A redescription of *Plasmodium (Haemamoeba) relictum* (Grassi and Feletti, 1891). *Parassitologia* **12**, 1-10.
- [42] Cosgrove, C.L., Wood, M.J., Day, K.P. and Sheldon, B.C. (2008). Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* **77**, 540-548.
- [43] Cranfield, M.R., Graczyk, T.K., Beall, F.B., Ialeggio, D.M., Shaw, M.L. and Skjoldager, M.L. (1994). Subclinical avian malaria infections in African Black-Footed Penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. *Journal of Wildlife Disease* **30**, 372-376.
- [44] Davey, D.G. (1951). Chemotherapy of malaria. *British Medical Bulletin* **8**, 37-46.
- [45] Dawes, E.J., Churcher, T.S., Zhuang, S., Sinden, R.E. and Basáñez, M.G. (2009). *Anopheles* mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malaria Journal* **8**, 228.
- [46] Day, J.F. and Edman, J.D. (1983). Malaria renders mice susceptible to mosquito feeding when gametocytes are most infective. *Journal of Parasitology* **68**, 163-170.
- [47] Day, T. and Burns, J.G. (2003). A consideration of patterns of virulence arising from host-parasite coevolution. *Evolution* **57**, 671-676.
- [48] Day, T., Graham, A.L. and Read, A.F. (2007). Evolution of parasite virulence when host responses cause disease. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **274**, 2685-2692.
- [49] De Meeûs, T. and Renaud, F. (2002). Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* **18**, 247-251.
- [50] De Roode, J.C., Chi, J., Rarick, R.M. and Altizer, S. (2009). Strength in numbers: high parasite burdens increase transmission of a protozoan parasite of monarch butterflies (*Danaus plexippus*). *Oecologia* **161**, 67-75.
- [51] De Roode, J.C., Pansini, R., Cheesman, S.J., Helinski, M.E.H., Huijben, S., Wargo, A., Bell, A.S., Chan, B.H.K., Walliker, D. and Read, A.F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 7624-7628.

- [52] Dearsly, A.L., Sinden, R.E. and Self, I.A. (1990) Sexual development in malarial parasites: gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. *Parasitology* **100**, 359-368.
- [53] Desmidt, M., Ducatelle, R., Mast, J., Goddeeris, B.M., Kaspers, B. and Haesebrouk, F. (1998). Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **63**, 355-367.
- [54] Diggs, C., Joseph, K., Flemmings, B., Snodgrass, R. and Hines F. (1975) Protein-synthesis in vitro by cryopreserved *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **24**, 760-763.
- [55] Di Paolo, N.C., Tuve S., Ni, S., Hellström, K.E., Hellström, I. and Lieber, A. (2006). Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune response. *Cancer Research* **66**, 960-969.
- [56] Dronamraju, K.R. (2004). *Infectious disease and host-pathogen evolution*. Cambridge University Press, 370p.
- [57] Ebert, D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* **282**, 1432-1435.
- [58] Ebert, D. (2000) Experimental evidence for rapid parasite adaptation and its consequences for the evolution of virulence, in R. Poulin, S. Morand & A. Skorping (Eds.) *Host-parasite evolution*. Elsevier, 163-184.
- [59] Ebert, D. and Hamilton, W.D. (1996). Sex against virulence: The coevolution of parasitic diseases. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, A79-A82.
- [60] Eraud, C., Duriez, O., Chastel, O. and Faivre, B. (2005). The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Functional Ecology* **19**, 110-118.
- [61] Ewald, P.W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematic* **14**, 465-485.
- [62] Ewald, P.W. (1994). *The evolution of infectious diseases*. Oxford University Press, Oxford.
- [63] Fallon, S.M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. (2005) Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: A regional analysis in the Lesser Antilles. *American Naturalist* **165**, 466-480.
- [64] Fang, T.H., Lien, Y.Y., Cheng, M.C. and Tsai, H.J. (2006). Resistance of immune-suppressed pigeons to subtypes H5N2 and H6N1 low pathogenic avian influenza virus. *Avian Disease* **50**, 269-272.
- [65] Ferguson, H.M., Mackinnon, M.J., Chan, B.H. and Read, A.F. (2003). Mosquito mortality and the evolution of malaria virulence. *Evolution* **57**, 2792-2804.

- [66] Ferguson, H.M., and Read, A.F. (2002). Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **269**, 1217-1224.
- [67] Fix, A.S., Waterhouse, C., Greiner, E.C. and Stoskopf, M.K. (1988). *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Wildlife Disease* **24**, 610-619.
- [68] Folstad, I. and Karter, A.J. (1992). Parasites, bright Males, and the immunocompetent handicap. *American Naturalist* **139**, 603-622.
- [69] Franceschi, N., Rigaud, T., Moret, Y., Hervant, F. and Bollache, L. (2007). Behavioural and physiological effects of the trophically transmitted cestode parasite, *Cyathocephalus truncates*, on its intermediate host, *Gammarus pulex*. *Parasitology* **134**, 1839-1847.
- [70] Frank, S.A. (1996). Models of parasite virulence. *The Quaterly Review of Biology* **71**, 37-78.
- [71] Frank, S.A. (2002). *Immunology and Evolution of Infectious Diseases*. Priceton University Press, Priceton.
- [72] French, S.S., Johnston, G.I.H. and Moore, M.C. (2007). Immune activity suppresses reproduction in foot-limited female tree lizards *Urosaurus ornatus*. *Functional Ecology* **21**, 1115-1122.
- [73] Gandon, S., Mackinnon, M.J., Nee, S. and Read, A.F. (2001). Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* **414**, 751-756.
- [74] Gandon, S. and Michalakis, Y. (2002). Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 451-462.
- [75] Garnham, P. C. C. (1966). *Malaria parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1144p.
- [76] Garnham, P.C.C. (1954). Life history of malaria parasites. *Annual Review of Microbiology* **8**, 153-166
- [77] Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P.E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L. and Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patents. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 641-648.
- [78] Gilman, S., Blumstein, D.T. and Foufopoulos, J. (2007). The effect of hemosporidian infections on white-crowned sparrow singing behavior. *Ethology* **113**, 437-445.
- [79] Glick, B. (1971). Morphological changes and humoral immunity in cyclophosphamide-treated chicks. *Transplantation* **11**, 433-439.

- [80] Glynn, J.R. and Bradley, D.J. (1995). Inoculum size and severity of malaria induced with *Plasmodium ovale*. *Acta Tropica* **59**, 65-70.
- [81] Glynn, J.R., Collins, W.E., Jeffery, G.M. and Bradley, D.J. (1995). Infecting dose and severity of falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 281-283.
- [82] Goymann, W., Moore, I.T., Scheuerlein, A., Hirschenhauser, K., Grafen, A. and Wingfield, J.C. (2004). Testosterone in tropical birds: Effects of environmental and social factors. *American Naturalist* **164**, 327-334.
- [83] Goymann, W. and Wingfield, J.C. (2004). Allostatic load, social status, and stress hormones – The costs of social status matter. *Animal Behavior* **67**, 591-602.
- [84] Graham, A.L., Allen, J.E. and Read, A.F. (2005a). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**, 373-397.
- [85] Graham, A.L., Lamb, T.J., Read, A.F. and Allen, J.E. (2005b). Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *Journal of Infectious Disease* **191**, 410-421.
- [86] Grassi, B. und Feletti, R. (1891). Malariaparasiten in den Vögeln. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **9**, 403-409.
- [87] Grenfell, B.T. and Dobson, A.P. (1995). *Ecology of infectious diseases in natural populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [88] Griner, L. (1974). Avian malaria in penguins. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* **18**, 263-271.
- [89] Gupta, S., Hill, A.V.S., Kwiatkowski, D., Greenwood, A.M., Greenwood, B.M. and Day, K.P. (1994). Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 3715-3719.
- [90] Hamilton, W.D. (1980). Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* **35**, 282-290.
- [91] Hamilton, W.D. and Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* **218**, 384-387.
- [92] Harvell, D. (2004). Ecology and evolution of host-pathogen interactions in nature. *American Naturalist* **164**, S1-S4.
- [93] Hayworth, A.M., van Ripper III, C. and Weathers, W.W. (1987). Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (*Serinus canarius*). *The Journal of Parasitology* **73**, 850-853.
- [94] Hedrick, P.W. (2002). Pathogen resistance and genandic variation at MHC loci. *Evolution* **56**, 1902-1908.

- [95] Hegner, R. and Dobler, M. (1939). Attempts to obtain passive immunity in avian malaria with blood serum and spleen. *American Journal of Hygiene* **30**, 81-91.
- [96] Hellgren, O., Waldenström, J., Pérez-Tris, J., Szöll, Ö.E., Hasselquist, D., Križanauskienė, A., Ottosson, U., Bensch, S. (2007). Detecting shifts of transmission area in avian blood parasites – a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* **16**, 1281-1290.
- [97] Hemendinger, R.A. and Bloom, S.E. (1996). Selective mitomycin C and cyclophosphamide induction of apoptosis in differentiating B lymphocytes compared to T lymphocytes in vivo. *Immunopharmacology* **35**, 71–82.
- [98] Herre, E.A. (1995) Factors affecting the evolution of virulence: Nematode parasites of fig wasps as a case study. *Parasitology* **111**, S179-S191.
- [99] Hewitt, R. (1942). Studies on the host-parasite relationships of untreated infections with *Plasmodium lophurae* in ducks. *American Journal of Hygiene* **36**, 6-42.
- [100] Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers in Sunderland, Massachusetts, 655p.
- [101] Hiraga, T., Sugimura, M. and Kudo, N. (1976). Effect of cyclophosphamide on the thymus and the bursa of Fabricius in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Research* **24**, 87–98.
- [102] Hudson, P.J., Dobson, A.P. and Lafferty K.D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* **21**, 381-385.
- [103] Hughes, G.J., Mioulet, V., Haydon, D.T., Kitching, R.P., Donaldson, A.I. and Woolhouse, M.E.J. (2002) Serial passage of food-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *Journal of General Virology* **83**, 1907-1914.
- [104] Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996). R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299–314.
- [105] Ishtiaq, F., Clegg, S.M., Phillimore, A.B., Black, R.A., Owens, I.P.F. and Sheldon, B.C. (2010). Biogeographical patterns of blood parasite lineage diversity in avian hosts from southern Melanesian islands. *Journal of Biogeography* **37** 120-132.
- [106] Jenni, L., Müller, S., Spina, F., Kvist, A. and Lindström, A. (2006). Effect of endurance flight on haematocrit in migrating birds. *Journal of Ornithology* **147**, 531-542.
- [107] Jones, S.R.M., Palmen, M., Van Muiswinkel, W.B. (1993). Effects of inoculum route and dose on the immune response of common carp, *Cyprinus carpio* to the blood parasite, *Trypanoplasma borreli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **36**, 369-378.

- [108] Killick-Kendrick, R. (1974). Parasitic protozoa of the blood of rodents: a revision of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* **69**, 225-237.
- [109] Kilpatrick, A. M. (2006). Facilitating the evolution of resistance to avian malaria in Hawaiian birds. *Biological Conservation* **128**, 475-485.
- [110] Koch, R. (1899). Über die Entwicklung der Malariaparasiten. *Zeitschrift für Hygiene und Infektion* **32**, 1-24.
- [111] Kochin, B.F., Yates, A.J., de Roode, J.C. and Antia, R. (2010). On the control of acute rodent malaria infections by innate immunity. *PLoS* **5**, 1-5.
- [112] Kurtz, J. (2004). Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes and Infection* **6**, 1410-1417.
- [113] Lazzaro, B. P., Flores, H. A., Lorigan, J. G. and Yourth, C. P. (2008). Genotype by environment interactions and adaptation to local temperature affect immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens* **4**, e1 000 025.
- [114] Lebarbenchon, C., Brown, S.P., Poulin, R., Gauthier-Clerc, M. and Thomas, F. (2008) Evolution of pathogens in a man-made world. *Molecular Ecology* **17**, 475-484.
- [115] Lefèvre, T., Adamo, S.A., Biron, D.G, Misse, D., Hughes, D. and Thomas, F. (2009). Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Advances in parasitology* **68**, 45-83.
- [116] Lerman, S.P. and Weidanz, W.P. (1970). The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens. *Journal of Immunology* **105**, 614-619.
- [117] Levin, B.R. (1996). The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerging Infectious Diseases* **2**, 93-102.
- [118] Levin, I.I., Outlaw, D.C., Vargas, F.H. and Parker, P.G. (2009). *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biological Conservation* **142**, 3191-3195.
- [119] Linder, J. E., Owers, K. A. and Promislow, D. E. (2008). The effects of temperature on host pathogen interactions in *D. melanogaster*: who benefits? *Journal of Insect Physiology* **54**, 297–308.
- [120] Lipsitch, M. and Moxon, E.R. (1997). Virulence and transmissibility of pathogens: What is the relationship? *Trends in Microbiology* **5**, 31-37.
- [121] Liu, J.Y., Wu, Y., Zhang, X.S., Yang, J.L., Li, H.L., Mao, Y.Q., Wang, Y., Cheng, X., Li, Y.Q., Xia, J.C., Masucci, M. and Zeng, Y.X. (2007). Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1597-1604.

- [122] Lysenko, E.S., Ratner, A.J., Nelson, A.L. and Weiser, J.N. (2005). The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathogens* **1**(1), e1.
- [123] Loa, C.C., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T., Hooper, T. and Schrader, D. (2002). The effect of immunosuppression on protective immunity of turkey poult against infection with turkey coronavirus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **25**, 127-138.
- [124] Lochmiller, R.L. and Derenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- [125] Mackinnon, M.J., Bell, A. and Read, A.F. (2005) The effects of mosquito transmission and population bottlenecks on virulence, multiplication rate and resetting in rodent malaria. *International Journal for Parasitology* **35**, 145-153.
- [126] Mackinnon, M.J., Gaffney, D.J. and Read, A.F. (2002) Virulence in rodent malaria: host genotype by parasite genotype interactions. *Infection, Genetics and Evolution* **1**, 287-296.
- [127] Mackinnon, M.J., Gandon, S. and Read, A.F. (2008) Virulence evolution in response to vaccination: The case of malaria. *Vaccine* **26**, C42-C52.
- [128] Mackinnon, M.J. and Read, A.F. (1999a) Genetic relationships between parasite virulence and transmission in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* **53**, 689-703.
- [129] Mackinnon, M.J. and Read, A.F. (1999b) Selection for high and low virulence in the malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **266**, 741-748.
- [130] Mackinnon, M.J. and Read, A.F. (2003) The effects of host immunity on virulence-transmissibility relationships in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* **126**, 103-112.
- [131] Mackinnon, M.J. and Read, A.F. (2004a). Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLoS Biology* **2**, 1286-1292.
- [132] Mackinnon, M.J. and Read, A.F. (2004b) Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**, 965-986.
- [133] Maizels, R.M. (2005). Infections and allergy – helminths, hygiene and host immune regulation. *Current Opinion in Immunology* **17**, 656-661.
- [134] Maizels, R.M., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D. and Allen, J.E. (2004). Helminth parasites – masters of regulation. *Immunological Reviews* **201**, 89-116.

- [135] Maizels, R.M. and Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: Cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* **3**, 733-744.
- [136] Manwell, R.D. and Goldstein F. (1940). Passive immunity in avian malaria. *The Journal of Experimental Medicine* **71**, 409-422.
- [137] Marsh, K. (1992). Malaria – a neglected disease. *Parasitology* **104**, S53-S69.
- [138] Marsh, K. and Snow, R. W. (1997). Host–parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **352**, 1385–1394.
- [139] Martin, L.B., Scheuerlein, A. and Wikelski, M. (2002). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 153-158.
- [140] Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C. and Møller, A.P. (2005). Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142**, 541-545.
- [141] McGhee, R. B., Singh, S. D. and Weathersby, A. B. (1977). *Plasmodium gallinaceum*: vaccination in chickens. *Experimental Parasitology* **43**, 231- 238.
- [142] McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J. and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* **47**, 821-853.
- [143] McQueen, P.G. and McKenzie, F.E. (2004). Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 9161-9166.
- [144] McQueen, P.G. and McKenzie, F.E. (2006). Competition for red blood cells can enhance *Plasmodium vivax* parasitemia in mixed-species malaria infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 112-125.
- [145] McQueen, P.G. and McKenzie, F.E. (2008). Host control of malaria infections: Constraints on immune and erythropoietic response kinetics. *PLoS Computational Biology* **4**, e1000149.
- [146] Merino, S., Moreno, J., Sanz, J.J. and Arriero, E. (2000). Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**, 2507-2510.
- [147] Mitchell, S. E., Rogers, E. S., Little, T. J. and Read, A. F. (2005). Host–parasite and genotype-by environment interactions: temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. *Evolution* **59**, 70–80.
- [148] Muroga, N., Taharaguchi, S., Ohta, H., Yamazaki, K. and Takase, K. (2006). Pathogenicity of fowl adenovirus isolated from gizzard erosions to immuno-suppressed chickens. *The Journal of Veterinary Medical Science* **68**, 289-291.

- [149] Norris, K. and Evans, M.R. (2000). Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**, 19-26.
- [150] Nowak, M.A. and May, R.M. (1994) Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **255**, 81-89.
- [151] Palinauskas, V., Kosarev, V., Shapoval, A., Bensch, S. and Valkiūnas, G. (2007). Comparaison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida : Plasmodiidae). *Zootaxa* **1626**, 39-50.
- [152] Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C.V. and Bensch, S. (2008). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* **120**, 372-380.
- [153] Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Križanauskiene, A., Bensch, S. and Bolshakov, C.V. (2009). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with MalaroneTM. *Experimental Parasitology* **123**, 134-139.
- [154] Pantin-Jackwood, M.J., Brown, T.P., Kim, Y. and Huff, G.R. (2004). Proventriculitis in broiler chickens: effects of immunosuppression. *Avian Disease* **48**, 300-316.
- [155] Parisot, M., Nagle, L., Vallet, E. and Kreutzer (2004). Dominance-related foraging in female domesticated canaries under laboratory conditions. *Canadian Journal of Zoology* **82**, 1246-1250.
- [156] Perez-Tris, J. and Bensch, S. (2005). Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology Letters* **8**, 838-845.
- [157] Permin, A. and Juhl, J. (2002). The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Veterinary Parasitology* **105**, 1-10.
- [158] Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. and the R Development Core Team (2010). *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-97. Disponible sur le site [<http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/>] (consulté janvier 2010)
- [159] Pinheiro, J.C. and Bates, D.M. (2000). *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer Verlag New York, LLC, 528p.
- [160] Potti, J., Moreno, J., Merino, S., Frias, O. and Rodriguez, R. (1999). Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledgling pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* **120**, 1-8.
- [161] Poulin, R. (2007). *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2nd Edition. Princeton University Press, Princeton.

- [162] Poulin, R. and Combes, C. (1999). The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today* **15**, 474-475.
- [163] Poulin, R., Morand, S. and Skorping, A. (2000). *Evolutionary Biology of Host-Parasite Relationships: Theory Meets Reality*. Elsevier, Amsterdam.
- [164] Poulin, R. and Thomas, F. (1999). Phenotypic variability induced by parasites: Extent and evolutionary implications. *Parasitology Today* **15**, 28-32.
- [165] Quillfeldt, P., Martinez, J., Hennicke, J., Ludynia, K., Gladbach, A., Masello, J.F., Riou, S. and Merino, S. (2010). Hemosporidian blood parasites in seabirds – a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. *Naturwissenschaften* **97**, 809-817.
- [166] Råberg, L., Vestberg, M., Hasselquist, D., Holmdahl, R., Svensson, E. and Nilsson, J.A. (2002). Basal metabolic rate and the evolution of the adaptative immune system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **260**, 817-821.
- [167] Read, A.F. (1994). The evolution of virulence. *Trends in Microbiology* **2**, 73-76.
- [168] Read, A.F. and Taylor, L.H. (2001). The ecology of genetically diverse infections. *Science* **292**, 1099-1102.
- [169] Reckardt, K. and Kerth, G. (2007). Roost selection and roost switching of female Bechstein's bats (*Myotis bechsteinii*) as a strategy of parasite avoidance. *Oecologia* **154**, 581-588.
- [170] Reisen, W.K., Chiles, R.E., Green, E.N., Fang, Y., Mahmood, F., Martinez, V.M. and Laver, T. (2003). Effects of immunosuppression on encephalitis virus infection in the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *Journal of Medical Entomology* **40**, 206-214.
- [171] Rivero, A. and Ferguson, H.M. (2003). The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 1365-1371.
- [172] Rolff, J. and Siva-Jothy, M.T. (2003). Invertebrate ecological immunology. *Science* **301**, 472-475.
- [173] Ross, R. (1899). Life-history of the parasites of malaria. *Nature* **60**, 322-324.
- [174] Sacristán, S. and Garcia-Arenal, F. (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular plant pathology* **9**, 369-384.
- [175] Salcedo, S.P. and Holden, D.W. (2005). Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 92-98.
- [176] Schall, J.J. (1983). Lizard malaria: parasite-host ecology. In: Huey, R.B., Pianka, E.R. and Schoener, T.W. (Eds). *Lizard ecology: studies of a model organism*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 84-100.

- [177] Schall, J.J. and Dearing, M.D. (1987). Malarial parasitism and male competition for mates in the western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Oecologia* **73**, 389-392.
- [178] Schmid-Hempel, P. (2009). Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 85-98.
- [179] Scully, L.R. and Bidochka, M.J. (2005) Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. *Canadian Journal of Microbiology* **51**, 185-189.
- [180] Sergent, E. et Sergent, E. (1921). Etude expérimentale du paludisme. Paludisme des oiseaux (*Plasmodium relictum*). 1. Efficacité de la quininisation préventive. 2. Moment où elle doit commencer. 3. Races de *Plasmodium* quininisées. 4. Essais de médicaments autres que la quinine. 5. Essais de vaccination. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* **14**, 72-77.
- [181] Sergent, E. et Sergent, E. (1952). Recherches expérimentales sur l'infection latente et la premonition dans le paludisme. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie* **30**, 203-239.
- [182] Sheldon, B.C. and Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 317-321.
- [183] Silveira, P., DaMatta, R.A. and Dagosto, M. (2009). Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium* (*Bennettinia*) *juxtannucleare*. *Veterinary Parasitology* **162**, 257-262.
- [184] Slater, L. (2005) Malarial birds: modeling infectious human disease in animals. *Bulletin of the History of Medicine* **79**, 261-294.
- [185] Soler, J.J., De Neve, L., Perez-Contreras, T., Soler, M. and Sorci, G. (2003). Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 241-248.
- [186] Sorci, G. and Faivre, B. (2009). Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 71-83.
- [187] Spencer, K.A., Buchanan, K.L., Leitner S., Goldsmith, A.R. and Catchpole, C.K. (2005). Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 2037-2043.
- [188] Stearns, S.C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, 264p.
- [189] Thomas, F., Poulin, R. and Renaud, F. (1998). Nonmanipulative parasites in manipulated hosts: 'Hitch-hikers' or simply 'lucky passengers'. *Journal of Parasitology* **84**, 1059-1061.

- [190] Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P. and Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 356-361.
- [191] Thomas, F., Guégan, J.F. and Renaud, F. (2009) *Ecology and Evolution of Parasitism*. Oxford University Press, New York, 240p.
- [192] Thomas, F., Poulin, R. and Brodeur, J. (2010). Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *OIKOS* **119**, 1217-1223.
- [193] Thompson, S.N., Redak, R.A. and Wang, L.W. (2001). Altered dietary nutrient intake maintains metabolic homeostasis in parasitized larvae of the insect *Manduca sexta* L. *Journal of Experimental Biology* **204**, 4065-4080.
- [194] Timms, R., Colegrave, N., Chan, B.H.K. and Read, A.F. (2001). The effect of parasite dose on severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* **123**, 1-11.
- [195] Urban, B. C. and Roberts, D. J. (2002). Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Current Opinion in Immunology* **14**, 458-465.
- [196] Valkiūnas, G. (2001). Blood parasites of birds: some obstacles in their use in ecological and evolutionary biology studies. *Avian Ecology and Behaviour* **7**, 87-100.
- [197] Valkiūnas, G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [198] Valkiūnas, G., Žičkus, T., Shapoval, A.P. and Lezhova, T.A. (2006). Effect of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the Blackcap *Sylvia atricapilla*. *Journal of Parasitology* **92**, 1123-1125.
- [199] Van Baalen, M. (1998). Coevolution of recovery ability and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**, 317-325.
- [200] Van Riper, C., Van Riper, S.G., Goff, M.L. and Laird, M. (1986). The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* **56**, 327-344.
- [201] Viney, M.E., Riley, E.M. and Buchanan, K.L. (2005). Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 665-669.
- [202] Vizoso, D.B. and Ebert, D. (2005). Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia* **143**, 157-166.
- [203] Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, D., Hasselquist, D. and Ottosson, U. (2002). Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* **11**, 1545-1554.

- [204] Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. and Östman, Ö. (2004). A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infection from avian blood. *Journal of Parasitology* **90**, 191-194.
- [205] Warner, R. E. (1968). The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avi-fauna. *Condor* **70**, 101-120.
- [206] Weatherhead, P.J. (1990). Secondary sexual traits, parasites, and polygyny in red-winged blackbirds, *Agelaius phoeniceus*. *Behavioral Ecology* **1**, 125-130.
- [207] Wiehn, J., Korpimäki, E. and Pen, I. (1999). Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of parental effort. *OIKOS* **84**, 87-98.
- [208] White, N. J. and Ho, M. (1992) The pathophysiology of malaria. *Advances in Parasitology* **31**, 83-173.
- [209] Wolfson, F. (1945). Virulence of the IG strain of *Plasmodium relictum* for the duck. *American Journal of Hygiene* **42**, 111-118.
- [210] Wood, M.J., Cosgrove, C.L., Wilkin, T.A., Knowles, S.C.L., Day, K.P. and Sheldon, B.C. (2007). Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. **16**, 3263-3273.
- [211] Woodworth, B.L., Atkinson, C.T., LaPointe, D.A., Hart, P.J., Spiegel, C.S., Tweed, E.J., Henneman, C., LeBrun, J., Denette, T., DeMots, R., Kozar, K.L., Triglia, D., Lease, D., Gregor, A., Smith, T. and Duffy, D. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 1531-1536.
- [212] Woolcock, P.R. and Crichton, G.W. (1979) Duck virus hepatitis – serial passage of attenuated virus in ducklings. *Veterinary Record* **105**, 30-32.
- [213] World Health Organisation (2008) *World Malaria Report 2008*. WHO Press, Geneva, 215p.
- [214] Yan, Y., Inuo, G., Akao, N., Tsukidate, S. and Fujita, K. (1997). Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malaria by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Parasitology* **114**, 333-338.
- [215] Yanoviak, S.P., Kaspari, M., Dudley, R. and Poinar, G. (2008). Parasite-induced fruit mimicry in a tropical canopy ant. *American Naturalist* **171**, 536-544.
- [216] Yorinks, N. and Atkinson, C. T. (2000). Effects of malaria on activity budgets of experimentally infected juvenile Apapane (*Himatione sanguinea*). *The Auk* **117**, 731-738.
- [217] Young, M. D., Porter, J. A. and Johnson, C. M. (1966). *Plasmodium vivax* Transmitted from Man to Monkey to Man. *Science* **153**, 1006-1007.

- [218] Zaccone, P., Fehervari, Z., Phillips, J.M., Dunne, D.W. and Cooke, A. (2006). Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology* **28**, 515-523.
- [219] Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiūnas, G. and Bensch, S. (2008). Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology* **119**, 99-110.
- [220] Zimecki, M., Artym, J., Kocieba, M., Weber-Dabrowska, B., Boryosowski, J. and Gorski, A. (2010). Prophylactic effect of bacteriophages on mice subjected to chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant upon infection with *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology* **199**, 71-79.

Annexes

Annexe 1

Esparza-Salas, R., Cellier-Holzem, E., Bru, D., Garnier, S. and Sorci, G. A quantitative PCR assay for the detection of avian malaria (*Plasmodium spp.*) in all bird species. *Submitted to Molecular Ecology Resources*.

Title:

A quantitative PCR assay for the detection of avian malaria (*Plasmodium spp.*) in all bird species

RODRIGO ESPARZA-SALAS*‡, ELISE CELLIER-HOLZEM*, DAVID BRU†, STÉPHANE GARNIER* and GABRIELE SORCI*

*Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS/uB 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne. 6 Bd. Gabriel, 21000 Dijon, France.

†Service de Séquençage et de Génomique, Service Commun de Biologie, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

‡Present address: Department of Biology, PO Box 3000, 90014 University of Oulu, Finland

Keywords: Avian malaria, *Plasmodium*, qPCR, 18s rDNA

Corresponding author: Rodrigo Esparza-Salas, Department of Biology, University of Oulu
PO Box 3000, 90014 Oulu, Finland. Tel. +358 8553 1786 Fax +358 8553 1061.

Email address: Rodrigo.EsparzaSalas@gmail.com

Running title: Quantitative PCR assay for avian malaria

Abstract

We describe a quantitative PCR method for the detection of avian malaria parasites of the genus *Plasmodium* using markers that target conserved regions of the nuclear 18s rDNA gene, and using 18s rDNA gene of the bird hosts as a reference gene for relative quantification. We tested the method on a population of experimentally infected domestic canaries. Relative parasite intensities obtained with this method are highly correlated with intensities obtained using conventional microscopy methods. We were able to detect a little as 6.69 copies of 18s rDNA of plasmodium in a reaction. This method is applicable for the study of a wide variety of *Plasmodium* species and their bird hosts.

Introduction

Malaria is a common disease caused by haemosporidian parasites, which are transmitted to vertebrate hosts via blood-sucking insect vectors. Malaria parasites of the genus *Plasmodium* are present found widely in mammal, bird and reptile species. In humans, malaria is a life threatening disease. About half of the human population are at risk of contracting this disease, which caused nearly one million deaths during 2006, predominantly in developing countries (World Health Organisation 2008). Given the socio-economical impacts of this disease, it is imperative to study the mechanisms of development if malaria parasites in hosts. Avian malaria has been used as a model for pathogenesis and physiology of human malaria (Nagao *et al.* 2008; Slater 2005). Malaria parasites are ubiquitous in wild bird populations, making them also ideal for the study of ecology and evolution of host-parasite-relationships (Fallon *et al.* 2005).

Several methods are available for the diagnosis of malaria parasites, among which detection in blood smears by microscopy is one of the most widely used (Perandin *et al.* 2004;

Warhurst & Williams 1996). However, microscopy has the disadvantage of being less accurate in the detection low parasitemia, being time consuming, and requiring specific expertise for parasite identification.

Molecular methods have been efficiently applied for the detection of malaria and other parasites. These include highly sensitive detection by nested polymerase chain reaction amplification of mitochondrial genes (Hellgren *et al.* 2004; Waldenstrom *et al.* 2004), to detect presence or absence of the parasites. Although malaria parasites are present in most bird species, the infections are often chronic and can be asymptomatic (Valkiūnas 2005). In wild bird populations, parasitemia is often maintained below a threshold of pathogenicity, although the severity of infections can increase, during stressful events for hosts (Atkinson *et al.* 2000; Gilman *et al.* 2007; Merino *et al.* 2000). Quantification of parasites in host can provide a mean to detect not only their presence, but to determine the relative severity of an infection in the host.

Although microscopy continues to be the most widely used method for the quantification of blood parasites, quantitative PCR (qPCR) has been used as a quicker and cost-efficient method for the detection and quantification of a wide range of pathogens, including malaria. There are methods available for the detection of avian malaria using qPCR, that target the mitochondrial cytochrome-b gene of particular strains of *Plasmodium* (Bentz *et al.* 2006; Zehindjiev *et al.* 2008). Other qPCR methods for human malaria target the nuclear 18s rDNA gene (Hermsen *et al.* 2001; Malhotra *et al.* 2005; Perandin *et al.* 2004).. The fact that the 18s rDNA gene is present in several copies in the genome allows for increased sensitivity in the detection of parasites.

Here, we describe a quantitative PCR assay that targets the nuclear 18s rDNA gene of avian malaria parasites of the genus *Plasmodium* and using the 18s rDNA gene of bird hosts as a reference gene for relative quantification. We tested our method on a population of domestic

canaries (*Serinus canaria*) infected experimentally with *Plasmodium relictum* and compare our results with those obtained using conventional microscopy.

Materials and methods

Parasite collection and preparation.

House sparrows (*Passer domesticus*) were captured with mist nets from two localities in Dijon, France, in October 2007. Approximately 20 to 50 µl of blood were collected from the brachial vein and stored in 500 µl of Queens lysis buffer (QLB) (Seutin *et al.* 1991). DNA was extracted using a phenol-chloroform protocol (Modified from Hills *et al.* 1996). We screened all individuals using the nested PCR method described in Waldenstrom *et al.* (2004) for detection of avian malaria parasites. Positive PCR products were sequenced, and avian malaria parasites were confirmed to be of the strain SGS1 of *Plasmodium relictum* by blasting the sequences with those available in GenBank using the algorithm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Sparrows that tested positive were cross-infected by injecting 50 µl of blood from one infected sparrow to another, in order to increase parasite intensity. After 11 days, blood smears were prepared in order to quantify initial parasite intensities to be used in for subsequent experimental infections of domestic canaries (*Serinus canaria*).

Twenty four domestic canaries were infected with 50 µl of infected house sparrow blood (equivalent to one million parasites). Eight days after infection, blood slides were prepared as described above, and approximately 20 µl of blood were stored in QLB for subsequent qPCR analyses

Quantification of Plasmodium parasites by microscopy

Blood Smears were fixed with 100 % methanol and stained in a 10 % Giemsa solution (Sigma-Aldrich) for 45 minutes. We observed the smears at a 1 000 x magnification using a Nikon E400 microscope. We counted the number of parasites observed in a total of 5 000 erythrocytes in order to determine parasite intensities. Parasites were recognized using criteria of Campbell (1995) and Valkiūnas (2005).

Primer and fluorescent probe design

We aligned 18s rDNA sequences of 14 *Plasmodium* species that typically infect a range of bird and primate hosts (Supplementary table 1), in order to identify conserved regions of the nuclear 18s RNA gene. Likewise, we aligned 18s rDNA sequences from 33 bird species encompassing 23 bird orders (Supplementary table 1). We aligned the consensus sequences of 18s rDNA of birds and *Plasmodium*, respectively, in order to avoid designing primers in regions of the 18s rDNA gene that are conserved amongst eukaryotes.

Primers 18sPlasm7 (5'-AGC CTG AGA AAT AGC TAC CAC ATC TA-3'), 18sPlasm8 (5'-TGT TAT TTC TTG TCA CTA CCT CTC TTC TTT-3') and fluorescent probe Plasm Hyb2 (5'-6FAM-CAG CAG GCG CGT AAA TTA CCC AAT TC-BHQ1-3') were designed to target a 90 bp section of the 18s-rDNA gene of *Plasmodium*. In order to obtain a relative quantification, we targeted a 91 bp fragment of the 18s rDNA gene of the bird hosts using Primers 18sAv7 (5'-GAA ACT CGC AAT GGC TCA TTA AAT C-3'), 18sAv8 (5' –TAT TAG CTC TAG AAT TAC CAC AGT TAT CCA-3') and fluorescent probe 18sAv Hyb (5'-VIC-TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC-BHQ1-3').

All qPCR reactions described below were carried out in an ABI Prism 7900 cycler (Applied Biosystems).

Target gene primer optimisation

Given that parasites are often present in very small numbers, we determined the amounts of primers 18sPlasm7 and 18sPlasm8 that produced optimal sensitivity of detection. We tested all 25 possible combinations of 1, 500, 250 and 125 μM of each primer respectively using DNA from a positive control (infected canary) and a negative control (uninfected canary). Quantitative PCR reactions for optimisation were performed in a total volume of 20 μl including 1x Absolute QPCR SYBR green mix (Thermo scientific), the respective amounts of primer combinations mentioned above, and 5 μl of DNA template. PCR cycle profile included an initial denaturation at 95° C for 15 minutes, followed by 45 cycles of 94° C for 15 seconds and annealing/extension at 60° C for one minute. Following the cycles we included a step of 56° C for 15 seconds and 95° C for 15 seconds in order to obtain melting curves to identify possible non-specific targets. The optimal primer combination was chosen as that with the lowest cycle threshold value (Ct) in the positive control (indicating maximum sensitivity) and a Ct of 0 in the respective negative control (indicating the absence of non-specific target amplification).

Quantification of Plasmodium parasites by qPCR

For each bird we carried out qPCR reactions targeting the 18s rDNA gene of *Plasmodium* and the 18s rDNA of host, respectively. Each of these reactions was carried out in duplicate for each sample, and we included two non-template controls per run. All DNA samples were vortexed briefly immediately before every PCR setup to ensure constant DNA content.

PCR reactions for the target 18s rDNA *Plasmodium* gene were carried out in 20 μl volume including 1x Absolute QPCR ROX mix (Thermo scientific), 1 μM of primer 18sPlasm7, 0.125 μM of primer 18sPlasm8, 0.25 μM of probe 18sPlasmHyb2 and 5 μl of template DNA solution. Reactions for the reference 18s rDNA gene of bird hosts included 1x Absolute QPCR ROX mix, 0.5 μM of each primer, 0.25 μM of probe 18sAvHyb and 5 μl of template DNA. Thermal

cycling conditions were as described above for target gene primer optimisation, with the exception of the final melting curve step.

In order to detect the presence of PCR inhibitors, we performed qPCR reactions in three infected birds (as described above) using a series of 10-fold dilutions of the template to create calibration curves. Efficiencies were calculated from the respective curves using the formula $\text{Efficiency} = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$.

Relative parasite intensities (RQ) were calculated as $2^{-(\text{Ct } 18\text{s } Plasmodium - \text{Ct } 18\text{s } Bird)}$. RQ can be interpreted as the fold-amount of target gene (*Plasmodium* 18s rDNA) with respect to the amount of the reference gene (host 18s rDNA).

We compared microscopy and qPCR results using a non-parametric test of correlation (Spearman method), as residuals of the model did not follow a Gaussian distribution.

Sensitivity assay

We cloned PCR products of the target gene and the reference gene respectively in a Pgem-T Easy vector (Promega) following recommendations of the manufacturer. Recombinant plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). We used a series of 10-fold dilutions of the cloned PCR products (equivalent to 0.669×10^1 to 0.669×10^7 copies of target *Plasmodium* gene and 0.535×10^1 to 0.535×10^7 copies of target bird gene, respectively) to construct standard curves for calibration relating the log copy number of the respective gene (*c*) as a function of Ct. Efficiencies of the resulting calibration curves were calculated as above.

Results

We determined that a 1:10 dilution of our initial DNA solution was necessary to avoid the effect of PCR inhibitors on the efficiency of the reactions. The sensitivity assay revealed this method is able to detect a minimum of 6.7 copies of 18s rDNA of *Plasmodium* and 53 copies of 18s rDNA of birds, respectively. Efficiency of detection was 98.61% ($\log(c) = -3.36 \text{ Ct} + 13.64$) for *Plasmodium* and 97.58% ($\log(c) = -3.38 \text{ Ct} + 14.617$) for birds. Ct values for *Plasmodium* above 36.1 (corresponding to the minimum detectable amount of 18s copies in our assay) were considered as negative.

Linear coefficient of correlation between parasite intensities calculated using microscopy and qPCR was very high ($R^2=0.953$; Fig. 1) and test of Spearman correlation highly significant ($\rho=0.881$, $p<0.0001$). We were able to detect parasites using qPCR in one case for which parasitemia calculated by microscopy was zero.

Discussion

This method has some advantages over the use of microscopy for the quantification of parasites in blood samples, including a higher sensitivity of detection, and ability to obtain results more rapidly. It also eliminates of uncertainties produced when blood cells are damaged during infection, which makes the cell count difficult (Pers. Obs.). Moreover, results obtained using this protocol are highly correlated to those obtained using microscopy.

This method is sensitive for the detection of *Plasmodium* DNA in bird blood samples. Although the number of genomic copies of 18s rDNA copies in *Plasmodium relictum* is unknown, the number of copies in other *Plasmodium* species ranges from four to eight (Mercereau-Puijalon *et al.* 2002). Since our assay is able to detect as few as 6.69 copies of 18s rDNA in *Plasmodium*, we are potentially able to detect the presence of genomic DNA of as little as one parasite in the

template used in the qPCR reaction. However, quantitative comparisons of parasitemias between bird species calculated with this method should be interpreted carefully, as the number of 18s rDNA copies can be variable between species (López-Andreo *et al.* 2005). Nonetheless, the copy number should remain constant within bird populations.

Aside from domestic canaries, we tested the technique successfully on different passerine bird species and their *Plasmodium* parasites: European blackbird (*Turdus merula*), European robin (*Erithacus rubecula*), Blue tit (*Cyanistes cyaneus*), Blackcap (*Sylvia atricapilla*), House sparrow (*Passer domesticus*) and Long-tailed tit (*Aegithalos caudatus*) (Data not shown). The PCR markers used in this assay are found in regions of the 18s rDNA gene across all bird groups and *Plasmodium* species from different host groups, respectively. Therefore this method is likely to be applicable for all bird/*Plasmodium* systems.

This method can be used routinely and efficiently for the detection of *Plasmodium* parasites. The fact that we use a reference host gene in parallel also eliminates the need for quantifying and diluting DNA previous to PCR setup. This is convenient, as there is typically a great deal of variation in the amounts collected from each bird, as well as hematocrit between samples. The parasitemias can be calculated proportionally, in function of host nuclear DNA content instead of in function of initial known DNA amount, and should remain constant irrespective of the amount of DNA used in the qPCR reaction.

The method as described here is highly sensitive. However, when transferring the protocol described here to other conditions (e.g. different qPCR equipments, DNA extraction methods or PCR reaction mixes), it is important to first determine the efficiency of the reactions remains high by constructing a standard curve of dilution series. This way it would be possible to detect the presence of inhibitors or whether it is necessary to perform further target primer optimisation.

Acknowledgements

This study was financed by the region of Bourgogne, through the program “Favoriser l’accueil en Bourgogne d’équipes de recherche” (FABER). We thank the Cercle Hippique Dijonnais and the Étrier de Bourgogne for allowing us using their facilities for collection of House Sparrows.

References

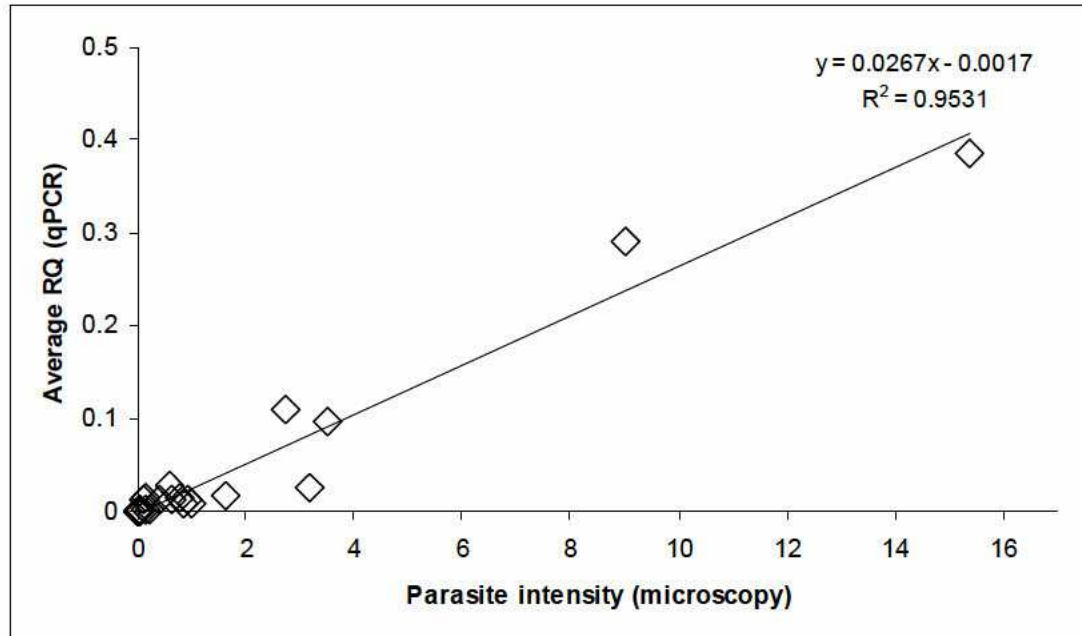
- Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM (2000) Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* **36**, 197-204.
- Bentz S, Rigaud T, Barroca M, *et al.* (2006) Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. *Parasitology* **133**, 685-692.
- Campbell TW (1995) *Avian Haematology and Cytology, 2nd Edition* Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Fallon SM, Bermingham E, Ricklefs RE (2005) Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: A regional analysis in the Lesser Antilles. *American Naturalist* **165**, 466-480.
- Gilman S, Blumstein DT, Foufopoulos J (2007) The effect of hemosporidian infections on White-crowned Sparrow singing behavior. *Ethology* **113**, 437-445.

- Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* **90**, 797-802.
- Hermesen CC, Telgt DSC, Linders EHP, *et al.* (2001) Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology* **118**, 247-251.
- Hills DM, Moritz C, Mable BK (1996) *Molecular Systematics, 2nd Edition* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- López-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **339**, 73-82.
- Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL (2005) Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 3630-3635.
- Mercereau-Puijalon O, Barale JC, Bischoff E (2002) Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *International Journal for Parasitology* **32**, 1323-1344.
- Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**, 2507-2510.
- Nagao E, Arie T, Dorward DW, Fairhurst RM, Dvorak JA (2008) The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte *Journal of Structural Biology* **162**, 460-467.
- Perandin F, Manca N, Calderaro A, *et al.* (2004) Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1214-1219.

- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 82-90.
- Slater L (2005) Malarial birds: modeling infectious human disease in animals. *Bulletin of the History of Medicine* **79**, 261-294.
- Valkiūnas G (2005) *Avian Malarial Parasites and Other Haemosporidia* CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Waldenstrom J, Bensch S, Hasselquist D, Ostman O (2004) A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. *Journal of Parasitology* **90**, 191-194.
- Warhurst DC, Williams JE (1996) Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* **49**, 533-538.
- World Health Organisation (2008) *World Malaria Report 2008* WHO Press, Geneva.
- Zehtindjiev P, Ilieva M, Westerdahl H, *et al.* (2008) Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology* **119**, 99-110.

Figure 1

Correlation between intensities obtained by microscopy and qPCR



Supplementary table 1

GenBank accession numbers of sequences used for the design of qPCR primers and fluorescent probes used in this study.

<i>Plasmodium</i>			Birds	
Species	Natural host	GenBank accession number	Species	GenBank accession number
<i>P. falciparum</i>	Human	M19173	<i>Nothoprocta ornata</i>	AF173606
<i>P. gallinaceum</i>	Birds	M61723	<i>Struthio camelus</i>	AF173607
<i>P. lophurae</i>	Birds	X13706	<i>Rhea americana</i>	AF173608
<i>P. juxtannucleare</i>	Birds	AF159790	<i>Apteryx australis</i>	AF173609
<i>P. cathemerium</i>	Birds	AY625607	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	AF173610
<i>P. reichenowi</i>	Apes	Z25819	<i>Coturnix pectoralis</i>	AF173611
<i>P. ovale</i>	Human	AB182490	<i>Gallus gallus</i>	AF173612
<i>P. cynomolgi</i>	Primates	L07559	<i>Ortalis guttata</i>	AF173613
<i>P. knowlesi</i>	Primates	AY580317	<i>Anas platyrhynchos</i>	AF173614
<i>P. vivax</i>	Human	U03079	<i>Picoides pubescens</i>	AF173615
<i>P. brasilianum</i>	Primates	AF130735	<i>Tyrannus tyrannus</i>	AF173616
<i>P. hylobati</i>	Primates	AY579421	<i>Urocolius macrourus</i>	AF173617
<i>P. simum</i>	Primates	U69605	<i>Musophaga porphyreolopha</i>	AF173618
<i>P. malariae</i>	Human	M54897	<i>Apus affinis</i>	AF173619
			<i>Bubo virginianus</i>	AF173620
			<i>Anthracothonax nigracollis</i>	AF173621
			<i>Chordeiles acutipennis</i>	AF173622
			<i>Trogon collaris</i>	AF173623
			<i>Galbula pastazae</i>	AF173624
			<i>Coracias caudata</i>	AF173625
			<i>Tockus nasutus</i>	AF173626
			<i>Upupa epops</i>	AF173627
			<i>Cuculus pallidus</i>	AF173628
			<i>Melopsittacus undulatus</i>	AF173629
			<i>Columba livia</i>	AF173630
			<i>Turnix sylvatica</i>	AF173631
			<i>Grus canadensis</i>	AF173632
			<i>Neophron percnopterus</i>	AF173633
			<i>Sula neboxii</i>	AF173634
			<i>Podiceps auritus</i>	AF173635
			<i>Ciconia nigra</i>	AF173636
			<i>Larus glaucoides</i>	AF173637
			<i>Charadrius semipalmatus</i>	AF173638

Annexe 2

Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. (2010). Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage *SGS1*) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology* **40**, 1447-1453.



Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries

Elise Cellier-Holzem *, Rodrigo Esparza-Salas, Stéphane Garnier, Gabriele Sorci

Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2010

Received in revised form 26 April 2010

Accepted 28 April 2010

Keywords:

Domestic canaries
Epidemiological models
Experimental infection
Plasmodium relictum
Primary infection
Secondary infection

ABSTRACT

Parasites are known to exert strong selection pressures on their hosts and, as such, favour the evolution of defence mechanisms. The negative impact of parasites on their host can have substantial consequences in terms of population persistence and the epidemiology of the infection. In natural populations, however, it is difficult to assess the cost of infection while controlling for other potentially confounding factors. For instance, individuals are repeatedly exposed to a variety of parasite strains, some of which can elicit immunological memory, further protecting the host from subsequent infections. Cost of infection is, therefore, expected to be particularly strong for primary infections and to decrease for individuals surviving the first infectious episode that are re-exposed to the pathogen. We tested this hypothesis experimentally using avian malaria parasites (*Plasmodium relictum* lineage SGS1) and domestic canaries (*Serinus canaria*) as a model. Hosts were infected with a controlled dose of *P. relictum* as a primary infection and control birds were injected with non-infected blood. The changes in haematocrit and body mass were monitored during a 20 day period. A protein of the acute phase response (haptoglobin) was assessed as a marker of the inflammatory response mounted in response to the infection. Parasite intensity was also monitored. Surviving birds were then re-infected 37 days post primary infection. In agreement with the predictions, we found that primary infected birds paid a substantially higher cost in terms of infection-induced reduction in haematocrit compared with re-exposed birds. After the secondary infection, re-exposed hosts were also able to clear the infection at a faster rate than after the primary infection. These results have potential consequences for the epidemiology of avian malaria, since birds re-exposed to the pathogen can maintain parasitemia with low fitness costs, allowing the persistence of the pathogen within the host population.

© 2010 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The role that parasites play in the ecology and evolution of hosts is now one of the most studied topics in evolutionary ecology (Thomas et al., 2005; Poulin, 2006; Archie et al., 2009; Duffy and Forde, 2009; Schmid Hempel, 2009). By definition, parasites divert hosts' resources and as such they can exert strong selection pressures on them. Parasite virulence is usually defined as the reduction in host fitness due to the infection (Frank, 1996; Poulin and Combes, 1999). Recent theoretical and empirical work has shown that pathogens can exhibit a large virulence spectrum which has apparent epidemiological and ecological consequences (Bull, 1994; Frank, 1996; Galvani, 2003; Lively, 2006). Host populations facing highly virulent parasites may suffer large reductions in the population size and possibly have increased risks of local extinction (Van Riper et al., 2002; Lips et al., 2006; Smith et al., 2006). For instance, the introduction of avian malaria in the Hawaiian

archipelago has resulted in the decline and the extinction of several native bird species, and has become a classic example of the negative impact of introduced diseases on natural host populations (Van Riper et al., 1986; Atkinson et al., 1995, 2000).

Theoretical models of the epidemiology of infectious diseases can be broadly divided into two categories: the susceptible infectious susceptible (SIS) and the susceptible infectious recovered (SIR) models (Anderson and May, 1991). The SIS model assumes that susceptible individuals can be infected and that, if they clear the infection, do not develop long lasting immunity. Therefore they re-enter the susceptible population and can be re-infected. On the other hand, the SIR model assumes that infected individuals that recover from the infection are no longer vulnerable to the pathogen and definitely exit the susceptible population. Recovered individuals can also exhibit partial immunity where the pathogen can still infect them but they better tolerate the infection. The epidemiological dynamics obviously differ depending on the types of models (Anderson and May, 1991). For instance, in the SIR model, where individuals become resistant after an infection, epidemics can only persist if there are enough susceptible hosts in the

* Corresponding author. Tel.: +33 681175979; fax: +33 380396231.

E-mail address: Elise.Cellier-Holzem@u-bourgogne.fr (E. Cellier-Holzem).

population. Therefore, it is critical to know whether a given host parasite system fits the assumptions of the SIS or the SIR model. This can be particularly relevant for species of concern from a conservation perspective, for example in the case of the introduction of pathogens in a novel environment. In spite of this, there is very little available information on the dynamics of the infection in primary exposed and re-exposed hosts for most host-parasite associations. This is understandable given the difficulty to run experimental infections, under standardised conditions, for most natural systems.

The aim of the present study was to investigate the cost of malaria infection and the dynamics of such infection, in immunologically naïve and immunologically experienced hosts. For this purpose, we used the avian parasite *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and one of its hosts, the domestic canary (*Serinus canaria*).

Malarial parasites are widespread pathogens in wild bird populations (Valkiūnas, 2005). Early work precisely described the parasite cycle and the infection dynamics in domestic canaries (Corradetti et al., 1970). However, costs of infection have been difficult to assess (Valkiūnas et al., 2006; Bensch et al., 2007), particularly because low chronic infections often prevail and the parasitemia is below the threshold where parasite effects become apparent (Valkiūnas, 2005). For this reason, avian malaria parasites have often been considered as non-pathogenic in wild birds. However, experimental work has shown that infection with avian malaria parasites can come with substantial costs during primary infections both in wild and domesticated birds (Garnham, 1954; Hayworth et al., 1987; Atkinson et al., 2000; Spencer et al., 2005; Palinauskas et al., 2008, 2009; Zehtindjiev et al., 2008).

In natural populations, birds are exposed to repeated infections during their lifespan. Therefore, in this study we experimentally challenged domestic canaries twice with *P. relictum*, in order to compare the cost and the dynamics of primary and secondary infections. Very early work attempted to “vaccinate” hosts using different approaches (injection of serum from parasitised birds, injection of inactivated or endohistiocytic parasites) (Hegner and Dobler, 1939; Manwell and Goldstein, 1940; Russel and Mohan, 1942; Corradetti and Cavacoppi, 1952). In addition, Sergent and Sergent (1952) performed a series of infection/re-infection experiments using the *P. relictum* canary association. They showed that the brief acute infection stage was followed by a long latent infection with very light parasitemia, leading to a certain protection against subsequent parasite inoculations (premunition). Here, we wished to go further than this early work by: (i) controlling the parasite lineage (*P. relictum* SGS1); (ii) using a standardised parasite dose in the inoculum; and (iii) reporting a detailed analysis of the infection dynamics and costs for the host.

2. Materials and methods

2.1. Parasite collection and identification

Parasites used for the experimental infections were obtained from a natural population of house sparrows (*Passer domesticus*) in Dijon, France. We captured birds using mist nets in October 2007 and collected 20–40 µl of blood by brachial vein puncture. Blood was preserved in 500 µl of Queen's Lysis Buffer (QLB) (Seutin et al., 1991) for subsequent molecular analyses. Sparrows were kept for 3 days in large outdoor aviaries until their infectious status was determined.

DNA was extracted using a standard phenol/chloroform protocol (modified from Hilis et al. (1996)). We used a nested PCR method (Waldenström et al., 2004) that amplifies a section of the mitochondrial cytochrome *b* gene, in order to detect the presence or absence of malaria parasites of the genera *Plasmodium* and

Haemoproteus. We identified the parasite strain by sequencing PCR products of infected individuals and sequences were compared with those of the GenBank database using the algorithm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Approximately 200 µl of blood were collected from house sparrows that were infected with *P. relictum* (lineage SGS1). The blood was directly transferred i.p. to five domestic canaries, using 0.5 ml insulin syringes, in order to increase parasite intensity. Eleven days after infection, we measured the haematocrit of these five birds and prepared blood smears for microscopic examination. Smears were made by spreading a drop of blood from each bird on a glass slide, fixing with absolute methanol and then staining with 10% Giemsa solution (Sigma Aldrich). We counted the number of asexual infectious stages of the parasite observed in a total of 10,000 erythrocytes. Parasite intensities and haematocrit allowed us to evaluate the number of parasites per µl of blood for each bird (a haematocrit of 50% corresponded approximately to 5,000,000 erythrocytes per microliter of blood). We collected blood from donors, which was subsequently diluted in 0.9% saline solution to obtain the desired number of parasites per inoculum (see Section 2.2).

2.2. Primary infection experiment

None of the canaries used in the experiments harboured haemosporidians prior to the experimental infection, as confirmed by quantitative PCR (qPCR) (see Section 2.4). Eighteen canaries were injected i.p. with a volume of 50 µl of blood containing 1×10^6 parasites. Eighteen canaries were kept as a control group and were injected with 50 µl of blood collected from uninfected canaries. On the day of the infection all canaries were weighed (± 0.1 g of precision), and 20 µl of blood were collected to measure haematocrit. One control bird died the day following the first blood sampling and was therefore excluded from the analyses.

At days 5, 8, 11, 14 and 20 p.i., we recorded body mass and haematocrit of each bird. Twenty microliters of blood were also collected and stored in QLB for subsequent molecular analyses. At day 0, 5, 11 and 20 p.i., approximately 70 µl of blood were collected and centrifuged. After centrifugation, plasma was collected and maintained at -80°C for analysis of haptoglobin concentrations.

At the end of the first infection experiment (day 20 p.i.), birds were left to recover for 2 weeks before the second experimental infection. At day 34 p.i., we recorded body mass and haematocrit.

2.3. Secondary infection experiment

Between the two experimental infections, parasites were maintained by transferring infected blood between naïve non-infected canaries. Therefore, parasites used in the secondary infection were passed twice through bird hosts.

At day 37 p.i., we infected birds from the two groups (infected and control) with 1×10^6 parasites in a volume of 50 µl of blood as described above. Birds were monitored and samples were collected at days 5, 8, 11, 14 and 20 post-secondary infection as for the first infection experiment.

2.4. Detection of parasite intensities

Parasite intensities were obtained using a qPCR assay developed by Esparza Salas et al. (unpublished data). For each individual, we conducted two qPCR in the same run: one targeting the nuclear 18S rDNA gene of *Plasmodium* (Primers 18sPlasm7 5' AGC CTG AGA AAT AGC TAC CAC ATC TA 3', 18sPlasm8 5' TGT TAT TTC TTG TCA CTA CCT CTC TTC TTT 3', and fluorescent probe Plasm Hyb2 5' 6FAM CAG CAG GCG CGT AAA TTA CCC AAT TC BHQ1 3') and the other targeting the 18S rDNA gene of bird (Primers 18sAv7

5' GAA ACT CGC AAT GGC TCA TTA AAT C 3', 18sAv8 5' TAT TAG CTC TAG AAT TAC CAC AGT TAT CCA 3' and fluorescent probe 18sAv Hyb 5' VIC TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC BHQ1 3').

Parasite intensities were calculated as relative quantification values (RQ) as 2^{-C_t} (C_t 18s *Plasmodium* C_t 18s Bird) using the software SDS 2.2 (Applied Biosystem). C_t represents the number of PCR cycles at which fluorescence is first detected as statistically significant above the baseline, which is inversely correlated with the initial amount of DNA in a sample. RQ can be interpreted as the fold amount of target gene (*Plasmodium* 18s rDNA) with respect to the amount of the reference gene (host 18s rDNA). All qPCR were run on an ABI 7900HT real time PCR system (Applied Biosystem). All qPCR were run in duplicate (we used the average of the two values for subsequent statistical analyses), and two negative controls were included in each run. With this method we were able to detect a minimum of 6.7 copies of 18s rDNA of *Plasmodium*, minimising the risk of false negatives.

2.5. Haptoglobin measurement

Haptoglobin is an acute phase protein that is found in the blood of a range of animal species including birds (Delers et al., 1988). Under normal conditions, it is present at very low levels (or even absent from the blood) but, in response to infection or trauma, the concentration of haptoglobin can increase significantly with the inflammatory response. Haptoglobin concentration was quantified in all plasma samples following the 'manual method' instructions provided with a commercially available assay kit (TP801; Tridelta Development Ltd., Ireland). All samples were run in duplicate (with a coefficient of variation of 6.48%) and for subsequent analyses we used the average of the two values.

2.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with SAS (1999). Changes in parasite intensity, host body mass, haematocrit and haptoglobin concentration were analyzed using linear mixed models. Given the repeated nature of the data, individual identity was always included as a random factor in each model. Body mass, haematocrit and haptoglobin were analyzed using a normal distribution of errors, whereas for parasite intensity we used a Poisson distribution. Degrees of freedom were corrected using the Satterthwaite method. We also investigated the potential effect of the infection on host mortality with a logistic regression model. A *P* value of 0.05 or less was considered significant.

3. Results

3.1. Primary infection

Parasitemia of primary infected birds presented the following dynamic: intensity rising in the first phase of the cycle, reaching a peak around day 14 p.i., and declining afterwards (time: $F_{1,82.7} = 26.64$, $P < 0.0001$; squared time: $F_{1,82.8} = 22.39$, $P < 0.0001$; Fig. 1).

Six birds died in the infected group (33.3%), whereas no bird died in the control group during the course of the experiment (logistic regression: $\chi^2_1 = 7.44$, $P = 0.0064$). Among infected birds, the mortality rate tended to be correlated with parasite intensity at day 14 p.i., with a *P* value approaching the significance threshold (logistic regression: $\chi^2_1 = 3.82$, $P = 0.051$).

Body mass tended to increase during the first days p.i. and then decreased at the end of the experiment, resulting in a significant squared time effect (squared time: $F_{1,163} = 12.98$, $P = 0.0004$). This pattern was similar for the two treatments (infected and control

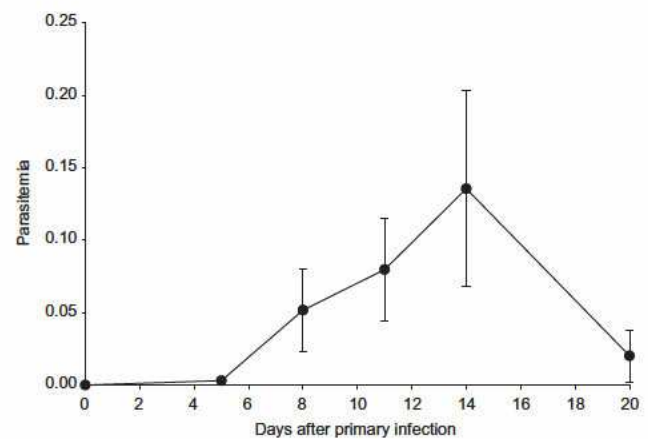


Fig. 1. Dynamics of parasitemia (mean RQ (relative amount of parasite DNA) $\pm$ standard error) of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) in canaries experimentally infected for the first time.

birds) (time $\times$ treatment $F_{1,163} = 2.16$, $P = 0.144$; squared time $\times$ treatment $F_{1,163} = 2.72$, $P = 0.101$).

Infection had a strong effect on haematocrit variation, which remained stable across the course of the experiment for the control group, whereas it sharply declined in infected individuals to reach a minimum value at days 11–14 p.i. Afterwards the haematocrit increased and approached the pre infection value (Fig. 2). This resulted in a significant interaction between time and treatment ($F_{1,156} = 12.29$, $P = 0.0006$); and a marginally significant interaction between squared time and treatment ($F_{1,156} = 3.52$, $P = 0.0624$).

Haptoglobin concentration was higher in birds in the infected group compared with control individuals ($F_{1,32.3} = 4.84$, $P = 0.0351$). Time and squared time also affected haptoglobin production with maximum haptoglobin production at day 5 p.i. (Fig. 3; time, $F_{1,95.7} = 7.77$, $P = 0.0064$; squared time, $F_{1,95.3} = 9.77$, $P = 0.0024$). However, temporal variation in haptoglobin concentration was similar for the two groups (all interactions $P > 0.1$).

3.2. Secondary infection

At day 34 post primary infection, infected birds had recovered in terms of body mass (infected versus control: *t* test,

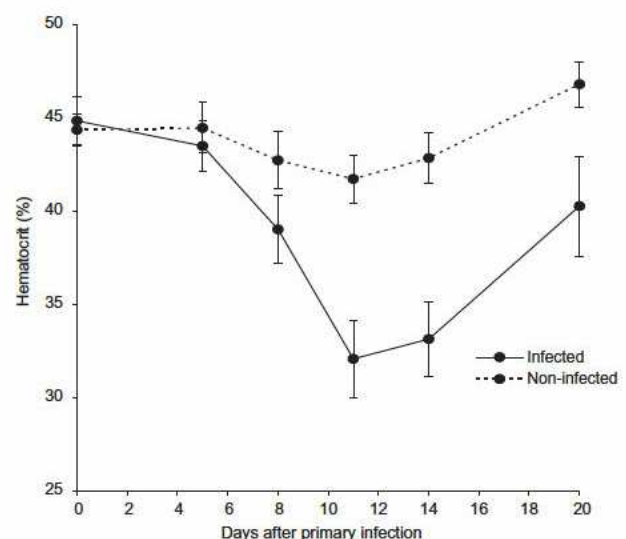


Fig. 2. Variation of haematocrit (mean percentage $\pm$ standard error) of canaries experimentally infected or not with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1).

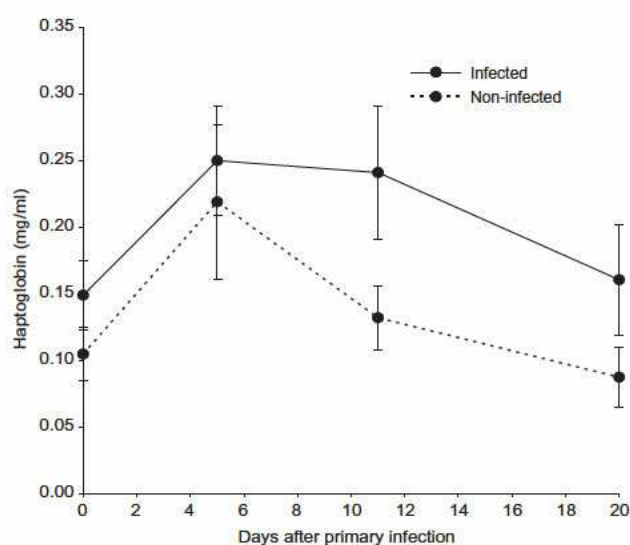


Fig. 3. Variation of haptoglobin concentration (mean mg/ml $\pm$ standard error) of canaries experimentally infected or not with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1).

$t_{27} = 1.067$, $P = 0.295$) and haematocrit ($t_{23} = 1.392$, $P = 0.177$). In addition, none of the birds had detectable signs of parasitemia in the blood, based on both qPCR and microscopic observation of blood smears.

As for the primary infection, the parasitemia showed a typical bell shaped function throughout time since infection. Re infected birds maintained the infection at much lower intensities compared with birds in the control group, for which this was the first exposure to parasites. This resulted in a significant interaction between time and treatment ($F_{1,129} = 5.61$, $P = 0.019$; Fig. 4).

Birds in the re infection group also maintained substantially higher haematocrit values compared with birds in the control group, and this resulted in a statistically significant interaction between time and treatment ($F_{1,132} = 14.55$, $P = 0.0002$, Fig. 5).

A similar result was found for body mass, with primary infected birds losing more weight during the course of the infection compared with the individuals who were re infected (interaction time by treatment, $F_{1,133} = 8.85$, $P = 0.0035$, Fig. 6).

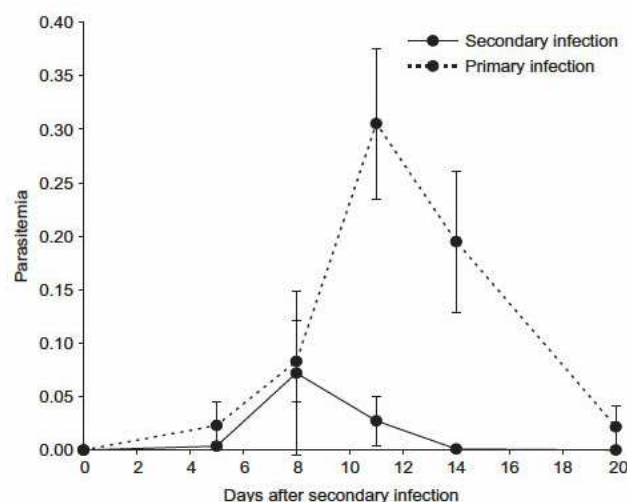


Fig. 4. Dynamics of parasitemia (mean RQ (relative amount of parasite DNA) $\pm$ standard error) of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) in canaries experimentally infected for the first time (primary infection) or re-infected (secondary infection).

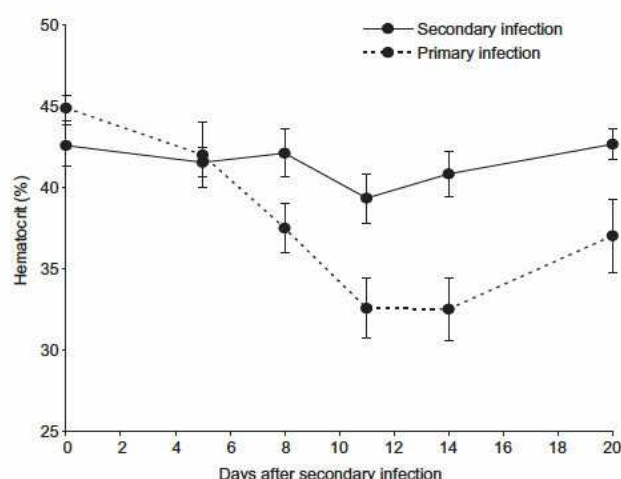


Fig. 5. Variation of haematocrit (mean percentage $\pm$ standard error) of canaries infected for the first time (primary infection) or re-infected (secondary infection) with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1).

Haptoglobin concentration increased during the first stage of the infection and declined after day 5 p.i. However, there was no difference between the two experimental groups ($F_{1,26.4} = 0.01$, $P = 0.909$).

The mortality rate during the secondary infection experiment did not depend on previous exposure to the parasite (25% versus 29% for previously exposed and naïve individuals, respectively; logistic regression, $\chi^2_1 = 0.07$, $P = 0.793$).

3.3. Comparing primary and secondary infection in the same individuals

We compared the effect of primary and secondary infection on the same individuals. This was necessary to ensure the results reported above were not due to the survival selection that operated during the primary infection. Therefore, we compared the infection dynamics of 12 birds during the primary and secondary infections.

Parasite intensity during the primary infection reached a peak value at day 11 p.i. and declined afterwards. For the secondary infection, parasite intensity reached a higher peak earlier during the course of the infection; however, re infected birds managed

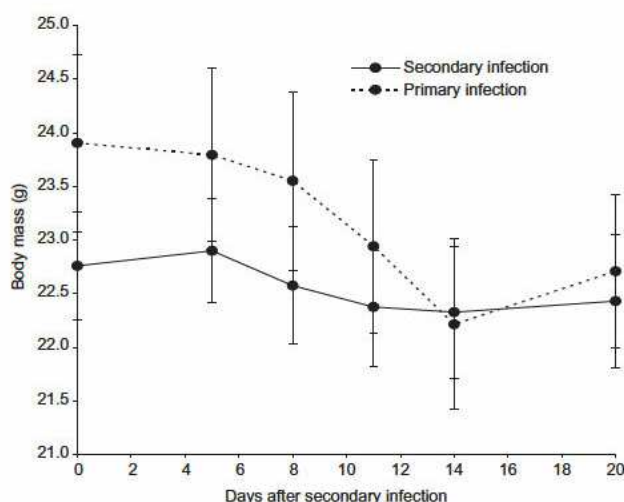


Fig. 6. Variation of body mass (mean g $\pm$ standard error) of canaries infected for the first time (primary infection) or re-infected (secondary infection) with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1).

to reduce the parasitemia at a faster rate compared with the levels observed during the primary infection (Fig. 7). This resulted in a statistically significant interaction between squared time and type of infection (primary versus secondary) ($F_{1,126} = 5.87$, $P = 0.0168$).

Haematocrit was also maintained at higher levels during the secondary infection. This resulted in a statistically significant interaction between time and type of infection ($F_{1,120} = 5.21$, $P = 0.0243$). Neither body mass nor haptoglobin levels differed between the two infection experiments (all $P > 0.05$).

Finally, we investigated whether the reduction in haematocrit due to the infection differed between the two infection experiments. If, when facing a re infection, birds can maintain higher haematocrit levels as a consequence of previous exposure to the parasite, we would expect a steeper slope for the regression of haematocrit on parasite intensity for the primary infection than for the re infection. In agreement with this hypothesis, we found that the slopes of the regression between haematocrit and parasite intensity were different between the two infection experiments (interaction parasite intensity by type of infection, $F_{1,119} = 4.58$, $P = 0.0345$).

4. Discussion

We found that the cost paid by malaria infected canaries can depend on the previous history of exposure to the same pathogen. During a primary infection with *P. relictum* (lineage SGS1), canaries paid a substantial cost both in terms of mortality and drop in haematocrit levels compared with non infected birds. In addition, we found that the inflammatory response was stronger for infected birds than for birds having received non infected blood. When subsequently infected, canaries managed to clear the infection at a faster rate than primary infected hosts, and to maintain higher haematocrit levels. The mortality rate was similar for primary and re infected birds (29% versus 25%). However, the results on mortality should be taken with caution since free ranging birds experiencing harsh environmental conditions (at least harsher than those encountered by captive birds) might suffer more from a reduction in haematocrit. Finally, haptoglobin concentrations were similar for primary and secondary infected birds, indicating that the intensity of the inflammatory response was independent of previous exposure to the parasite.

These results could arise as a consequence of the survival selection operated by the parasite during the primary infection. Birds

that harboured the highest parasite intensity had a higher chance of dying during the course of the experiment, and this might have selected more resistant birds that were, therefore, more able to cope with the re infection. However, we also showed that when restricting the sample to birds that survived the primary infection, the cost of infection was reduced in re infected birds. Parasite intensities were higher during the secondary infection, possibly because serial passages are supposed to select parasite strains with the fastest multiplication rate (Ebert, 1998). Parasites were passed twice prior to the secondary infection experiment (in order to maintain a stock of parasites), and this could have selected more virulent strains, possibly explaining why parasite intensity reached a higher and earlier peak during the re infection experiment. However, despite this possible increase in parasite multiplication rate, re infected birds managed to reduce the parasitemia at a faster rate and maintain higher hematocrit levels.

Overall, these results show that previous exposure to *P. relictum* (lineage SGS1) confers a partial protection to canary hosts. Previous work on the protective immunity against avian malaria has shown that “vaccination” of fowl with (i) serum from *Plasmodium gallinaceum* infected birds, and (ii) inactivated sporozoites, reduces parasitemia and mortality (Russel and Mohan, 1942). Our results, therefore, corroborate those early findings. The findings reported in our study are also in agreement with earlier work conducted in canaries experimentally infected with *P. relictum*, where following the first inoculation, canaries generally harboured very light parasitemia for several years, which resulted in increased protection against subsequent inoculations (Sergent and Sergent, 1952). Another natural *P. relictum* host (*Hemignathus virens*) association has also provided evidence in support of the idea that previous exposure enhances protection upon re infection (Atkinson et al., 2001). Chronically infected *H. virens* had no increase in blood parasitemia and no increase in body mass loss when re infected with the same isolate of *P. relictum*. Interestingly, when re infected with a different isolate of *P. relictum*, birds were immune to superinfection, suggesting that immunity extends to different parasite strains (Atkinson et al., 2001).

From an epidemiological perspective, these findings also suggest that the association between birds and *P. relictum* only partially fits the assumptions of the SIR model. Indeed, although primary infected birds that survive the infection can be re infected, they can clear the infection at a faster rate and with smaller costs in terms of haematocrit variations.

Although avian malaria parasites have long been considered non pathogenic for hosts that have a co evolutionary history with those pathogens, this belief was mostly based on correlational work (Fallis and Desser, 1977; Atkinson and Van Riper, 1991). Experimental evidence has more recently been gathered to show that *Plasmodium* and *Haemoproteus* parasites can both reduce reproductive success and survival prospects (Atkinson et al., 2000; Merino et al., 2000). Recently, Palinauskas et al. (2008, 2009) experimentally infected five species of wild passerines (*Fringilla coelebs*, *Loxia curvirostra*, *Passer domesticus*, *Spinus spinus* and *Sturnus vulgaris*) with *P. relictum* (lineage SGS1) in order to assess the dynamics of the infection and the impact on the host. They found extensive host species dependent variation for all traits measured (parasitemia, body mass and haematocrit). Interestingly, none of the infected birds died, however, they still harboured the infection as long as 30 days p.i., contrary to what was found with canaries in this study. The different mortality rates can stem from a number of reasons, including increased susceptibility of a domesticated species or different virulence of the parasite populations used in the two studies. The fact that we did not detect any sign of parasitemia in the blood at day 34 p.i. might reflect a poorer adaptation of *P. relictum* to the canary, compared with natural hosts with a long co evolutionary history. However, it is important

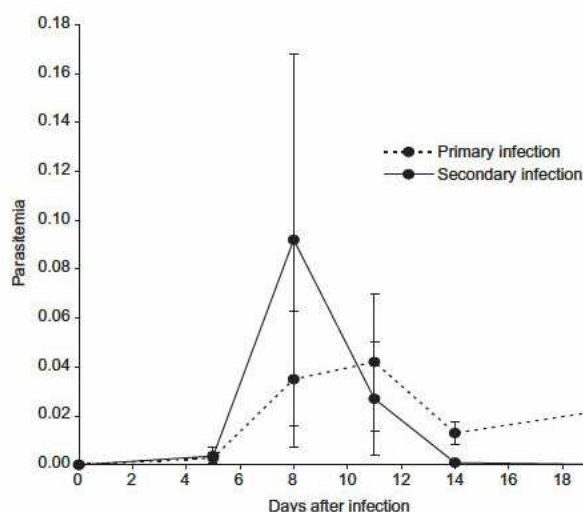


Fig. 7. Dynamics of parasitemia (mean RQ (relative amount of parasite DNA) $\pm$ standard error) of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) in canaries during primary and secondary infection experiments. Only canaries that survived the first infection episode were included.

to keep in mind that the infection can persist even when the parasite has apparently been cleared from the bloodstream. *Plasmodium* can indeed persist in a latent chronic phase in host organs and produce a relapse several months after the first exposure (e.g. [Sergeant and Sergeant, 1952](#)). Our finding of no parasites in the blood should not be considered as evidence that the host completely cleared the infection. Interestingly, the persistence of very light, chronic parasitemia in natural hosts ([Valkiūnas, 2005](#)) might also play a role in the development of protective immunity, even though a stressful environment, as mentioned above, can produce a relapse of the infection ([Gajewski and Tatum, 1944](#); [Cranfield et al., 1994](#)).

Evidence in support of the cost of *P. relictum* infection agrees with previous results showing that *P. gallinaceum* can also produce substantial mortality in chickens, depending on the dose inoculated and the age of the host ([Permin and Juhl, 2002](#); [Williams, 2005](#)). Why then is it so difficult to gather evidence in support of a cost of malaria infection under natural conditions? One likely explanation is provided by the results reported here. During the course of a primary infection, birds may pay a substantial cost. However, if they manage to cope with the parasite and clear the infection, they will pay a much lower cost for subsequent infections.

Avian hosts that have only recently come into contact with malaria parasites have suffered from a very strong reduction in their numbers. The Hawaiian archipelago has been colonised by malaria parasites and their mosquito vectors during the last century, and several species of endemic passerines have been shown to suffer from extremely high mortality upon exposure to the parasite ([Van Riper et al., 1986](#)). The lack of co evolutionary history probably explains this huge cost of infection paid by naïve hosts. Recent work has shown that host populations that were extremely susceptible to malaria infection now tend to acquire a resistance profile, probably due to the strong selection operated by the parasites ([Foster et al., 2007](#)). In our study, we also observed some parasite induced mortality during the primary infection. However, the selection imposed by the parasite does not fully explain the better tolerance of re infected hosts compared with primary infected birds.

Our results strongly suggest that immunologically experienced birds can tolerate parasitemia better than primary infected birds. At a similar parasite intensity, re exposed birds are able to maintain higher haematocrit levels than during a primary infection. The immunological mechanisms underlying this result are not completely clear. [Atkinson et al. \(2001\)](#) assessed the production of antibodies against a suite of malaria antigens in *P. relictum* chronically infected Hawaii Amakihi (*H. virens*). They found that the antibodies were still detectable more than 3 years following the initial exposure, suggesting that the protective effect is long lasting. This result has important implications for the understanding of persistence of avian malaria parasites. Parasites face different selection pressures depending on whether they infect naïve or previously exposed hosts. Naïve hosts are probably infectious for longer times compared with non naïve birds, as suggested by our results. They may, however, suffer more from the infection and any host mortality will obviously end the transmission period for the parasite. On the other hand, previously exposed hosts clear the infection at a faster rate which shortens the period of transmissibility of the parasite, but they do not suffer as much from the infection. Overall, these results suggest that parasites might adopt different strategies depending on the immunological profile of their hosts. For instance, malaria parasites infecting immunologically experienced birds should multiply rapidly (to avoid clearance) and rapidly produce gametocytes (the stage that allows the transmission to insect vectors). If within host multiplication drives parasite virulence, as usually assumed ([Mackinnon and Read,](#)

[2004a](#)), we should expect higher virulence of parasites infecting immunologically experienced hosts. Although to our knowledge this hypothesis has never been tested for avian malaria parasites, rodent malaria has been shown to become more virulent when experimentally passed among immunologically experienced mice ([Mackinnon and Read, 2004b](#)).

Although to our knowledge none of the birds we used for this study were infected with any *Haemosporidia* spp. (at least based on the PCR sensitivity), we cannot completely exclude that they never encountered those pathogens in the past. Nevertheless, the results clearly indicate that short term previous exposure to *Plasmodium* spp. strongly affects both parasite dynamics and cost of infection. This raises the question of the duration of the protective effect of previous exposure. The results of the experimental infections performed by [Sergeant and Sergeant \(1952\)](#) and [Atkinson et al. \(2001\)](#) tend to suggest that this protection could last throughout the lifespan of birds. However, even in the case that this protective effect would vanish when the period between two infections in creases, it is important that malaria transmission in northern temperate regions takes place during spring and summer when the mosquito vectors are most abundant. During this transmission period, therefore, hosts are repeatedly exposed to the pathogen, and the within season dynamics of the infection likely depend on the proportion of naïve versus immunologically experienced hosts.

Acknowledgements

We are very grateful to David Bru for his assistance with the quantitative PCR, and Emilie Arnoux for her help with the haptoglobin assay. We thank also Maryvonne Holzem and Dominique Cellier for their advice and bibliographical help. Financial support was provided by the Région Bourgogne, the ANR IRMAL, and the CNRS program MIE, France. The experiments were performed under the permit number: # 21 CAE 085.

References

- Anderson, R.M., May, R.M., 1991. Infectious Diseases in Humans: Dynamics and Control. Oxford University Press, Oxford.
- Archie, E.A., Luikart, G., Ezenwa, V.O., 2009. Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends Ecol. Evol.* 24, 21–30.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Wood, K.L., Iko, W.M., 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.* 36, 197–204.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Wood, K.L., Lease, J.K., 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.* 37, 20–27.
- Atkinson, C.T., Van Riper, C., 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian hematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loye, J., Zuk, M. (Eds.), *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution, and Behaviour*. Oxford University Press, New York, pp. 19–48.
- Atkinson, C.T., Woods, K.L., Dusek, R.J., Sileo, L.S., Iko, W.M., 1995. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected liwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology* 111, S59–S69.
- Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D., Hasselquist, D., 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J. Anim. Ecol.* 76, 112–122.
- Bull, J.J., 1994. Virulence. *Evolution* 48, 1423–1437.
- Corradetti, A., Cavacchi, L., 1952. Relations between the endohistiocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* and the immunological course of the infection in fowls inoculated with infected brain tissue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1, 761–767.
- Corradetti, A., Garnham, P.C.C., Neri, I., Scanga, M., Cavallini, C., 1970. A redescription of *Plasmodium (Haemamoeba) relictum* (Grassi and Feletti, 1891). *Parassitologia* 12, 1–10.
- Cranfield, M.R., Graczyk, T.K., Beall, F.B., Ialeggio, D.M., Shaw, M.L., Skjoldager, M.L., 1994. Subclinical avian malaria infections in African Black-Footed Penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. *J. Wildl. Dis.* 30, 372–376.
- Delers, F., Strecker, G., Engler, R., 1988. Glycosylation of chicken haptoglobin – isolation and characterization of 3 molecular variants and studies of their distribution in hen plasma before and after turpentine-induced inflammation. *Biochem. Cell Biol.* 66, 208–217.
- Duffy, M.A., Forde, S.E., 2009. Ecological feedbacks and the evolution of resistance. *J. Anim. Ecol.* 78, 1106–1112.

- Ebert, D., 1998. Evolution – experimental evolution of parasites. *Science* 282, 1432–1435.
- Fallis, A.M., Desser, S.S., 1977. On species of *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, pp. 239–266.
- Foster, J.T., Woodworth, B.L., Eggert, L.E., Hart, P.J., Palmer, D., Duffy, D.C., Fleischer, R.C., 2007. Genetic structure and evolved malaria resistance in Hawaiian honeycreepers. *Mol. Ecol.* 16, 4738–4746.
- Frank, S.A., 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* 71, 37–78.
- Gajewski, J.E., Tatum, A.L., 1944. A study of the mechanism of relapse in avian malaria. *J. Inf. Dis.* 74, 85–92.
- Galvani, A.P., 2003. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 18, 132–139.
- Garnham, P.C.C., 1954. Life history of malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 8, 153–166.
- Hayworth, A.M., van Ripper III, C., Weathers, W.W., 1987. Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (*Serinus canarius*). *J. Parasitol.* 73, 850–853.
- Hegner, R., Dobler, M., 1939. Attempts to obtain passive immunity in avian malaria with blood serum and spleen. *Am. J. Hyg.* 30, 81–91.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 1996. *Molecular Systematics*, second ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P., 2006. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3165–3170.
- Lively, C.M., 2006. The ecology of virulence. *Ecol. Lett.* 9, 1089–1095.
- Mackinnon, M.J., Read, A.F., 2004a. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 359, 965–986.
- Mackinnon, M.J., Read, A.F., 2004b. Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLoS Biol.* 2, 1286–1292.
- Manwell, R.D., Goldstein, F., 1940. Passive immunity in avian malaria. *J. Exp. Med.* 71, 409–422.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J.J., Arriero, E., 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. S. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 267, 2507–2510.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C.V., Bensch, S., 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Exp. Parasitol.* 120, 372–380.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Križanauskienė, A., Bensch, S., Bolshakov, C.V., 2009. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone™. *Exp. Parasitol.* 123, 134–139.
- Permin, A., Juhl, J., 2002. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. *Vet. Parasitol.* 105, 1–10.
- Poulin, R., 2006. *Evolutionary Ecology of Parasites*, second ed. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Poulin, R., Combes, C., 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today* 15, 474–475.
- Russel, P.F., Mohan, B.N., 1942. The immunization of fowls against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* by injections of serum and of inactivated homologous sporozoites. *J. Exp. Med.* 76, 477–495.
- Schmid-Hempel, P., 2009. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 364, 85–98.
- Sergent, E., Sergent, E., 1952. Recherches expérimentales sur l'infection latente et la premonition dans le paludisme. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 30, 203–239.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69, 82–90.
- Smith, K.F., Sax, D.F., Lafferty, K.D., 2006. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conserv. Biol.* 20, 1349–1357.
- Spencer, K.A., Buchanan, K.L., Leitner, S., Goldsmith, A.R., Catchpole, C.K., 2005. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proc. R. Soc. B* 272, 2037–2043.
- Thomas, F., Bonsall, M., Dobson, A.P., 2005. Parasitism, biodiversity and conservation. In: Thomas, F., Renaud, F., Guégan, J.F. (Eds.), *Parasitism and Ecosystems*. Oxford University Press, Oxford, pp. 124–139.
- Valkiūnas, G., 2005. *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Valkiūnas, G., Žičkus, T., Shapoval, A.P., Lezhova, T.A., 2006. Effect of *Haemoproteus belopolyskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the Blackcap *Sylvia atricapilla*. *J. Parasitol.* 92, 1123–1125.
- Van Riper, C., Van Riper, S.G., Goff, M.L., Laird, M., 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol. Monogr.* 56, 327–344.
- Van Riper, C., Van Riper, S.G., Hansen, W.R., 2002. Epizootiology and effect of avian pox on Hawaiian forest birds. *Auk* 119, 929–942.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö., 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infection from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 191–194.
- Williams, R.B., 2005. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Avian Pathol.* 34, 29–47.
- Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiūnas, G., Bensch, S., 2008. Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Exp. Parasitol.* 119, 99–110.

Annexe 3

Cellier-Holzem, E., Belvalette, M., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. For a few parasites more: contrasted effects of *Plasmodium relictum* infective dose. *In preparation*.

**For a few parasites more: contrasted effects of *Plasmodium relictum* infective
dose**

Elise CELLIER-HOLZEM*, Marie BELVALETTE*, Rodrigo ESPARZA-SALAS*†, Stéphane
GARNIER* and Gabriele SORCI*

* Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel
21000 DIJON

† Present address: Department of Biology, PO Box 3000, 90014 University of Oulu, Finland

Corresponding author:

Elise Cellier-Holzem

Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR 5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel,
21000 Dijon, France. Tel: +33 681175979

Email address: Elise.Cellier-Holzem@u-bourgogne.fr

Abstract

Several factors can account for the outcome of a host-parasite association, some of them linked to host attributes and others associated with parasite traits. Here, we focused on the relationship between the parasite dose and the severity of disease. We used an experimental approach to assess the cost paid by domestic canaries infected with increasing doses of the avian malaria parasite *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). We inoculated 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 parasites and measured the effect of varying doses on the health status of host and parasite multiplication. Inoculating 10^6 parasites produced the highest parasitemia levels, however intensity of infection did not differ among the other doses, suggesting a threshold effect. Similarly, severity of disease was not linearly related to the size of the inoculum, with the highest dose inducing the most severe symptoms and the other doses producing similar effects on the host. Overall, these results suggest a threshold effect of parasite dose on cost of infection and question the assumption of a linear relationship between parasite intensity and disease severity.

Keywords: Avian malaria, Domestic canary, Experimental infections, Parasite dose, *Plasmodium relictum* (lineage SGS1), Virulence.

Introduction

The severity of an infectious disease can take different forms, ranging from the absence of clinical symptoms to a rapid death of the host. Human malaria reflects perfectly this range of effects with patients infected with *Plasmodium falciparum* susceptible to develop various types of the disease from “mild” to fatal (Gupta et al. 1994, Mackinnon & Read 2004). Several factors can explain the heterogeneity observed in the outcome of such infections. These factors refer to host attributes (i.e. immunity, age, and history of previous exposure), environmental conditions (i.e. factors favouring or not parasite transmission between hosts) and parasite traits (i.e. infective dose, invasion pathways, multiplication rate).

Classical models of parasite virulence assume that parasite multiplication entails negative effects on hosts, decreasing their fitness and potentially leading to death (Lenski and May, 1994; Frank, 1996). There are many reasons to expect that parasite dose could affect disease severity. A high parasite load is likely to alter the time available for hosts to mount an immune response before the appearance of clinical symptoms (Marsh 1992). Experimental data support this hypothesis, showing in particular that after a small inoculum size, prepatent period and the time to reach a given level of parasitemia could be longer (Boyd, 1925; Hewitt 1942; Jones et al., 1993; Timms et al., 2001; Permin and Juhl, 2002). Moreover lower dose could give host more time to anticipate parasite effects and not just control parasite densities. An idea put forward by Timms et al. (2001), in the case of rodent malaria infection, is that if erythropoiesis is stimulated before too many red cells are destroyed by the pathogen, then hosts could be more able to support parasite assault. Finally a higher dose could provoke stronger competition between parasites and then lead to a selection of the most virulent pathogens.

Alternatively we could also consider that costs for hosts would be independent of parasite number. Inoculum size would determine only the capacity to infect successfully an

individual, but above this threshold, parasite number would not act on the outcome of the disease. Dissociation between the number of parasites and the effects on host could be conceivable particularly in a host-parasite system where symptoms of the disease are not only due to parasite multiplication. For instance, for some infectious diseases, symptoms can be explained not only by parasite multiplication but by an over-expressed immune response with potential damage to host tissues (Graham, 2005a; Sorci and Faivre, 2009). This has been notably shown in some cases of human, rodent and avian malaria (Clark et al. 2004, Graham et al. 2005b, Cellier-Holzem et al. *submitted*) where a discordance between virulence and parasite load have been highlighted. Moreover if high parasite dose affects negatively the outcome of the disease for host, it could also be costly for parasites. Indeed parasite fitness *per capita* could be negatively correlated with the number of parasite infecting the host. Parasites in heavily infected hosts could pay the costs of host mortality (preventing parasite transmission) or of increased competition for resources, and this could lead to a density-dependence regulation of parasite population (Anderson and May, 1978; Ebert et al. 2000).

Several studies have tested the effect of parasite infective dose in different biological systems and the reported results are somehow mixed. Although some studies have reported a positive effect of inoculum size on parasite dynamics, host morbidity and/or mortality (Boyd 1925, Jones et al. 1993, Timms et al. 2001, De Roode et al. 2009), other studies failed to find any such effects (Glynn and Bradley 1995, Glynn et al. 1995, Hewitt 1942, Permin and Juhl 2002).

The aim of this present work was to estimate the effects of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) infective dose, the most common and widely distributed avian malaria parasite, on one of its hosts, the domestic canary (*Serinus canaria*). If the symptoms of the disease are only due to parasite multiplication within the host, we could expect a relationship between *Plasmodium relictum* intensity and the severity of the disease. Nevertheless, the

shape of this relationship could be different depending on the existence or not of a threshold required to initiate the infection and/or a plateau above which the increase of parasite density would not further increase the cost paid by the host (see figure 1).

Materials and methods

1. Parasite collection and identification

Parasites used for the experimental infections were obtained from a natural population of house sparrows (*Passer domesticus*) in Dijon, France. We captured birds using mist nets in January 2008 and collected 20 to 40 µl of blood by brachial vein puncture. Blood was preserved in 500µl of Queen's Lysis Buffer (QLB) (Seutin et al., 1991) for subsequent molecular analyses. Sparrows were kept three days in large outdoor aviaries until obtaining their infectious status.

DNA was extracted using standard phenol/chloroform protocol (modified from Hilis et al., 1996). We used a nested polymerase chain reaction (PCR) method (Waldenström et al., 2004) that amplifies a section of the mitochondrial cytochrome b gene, in order to detect the presence or absence of malaria parasites of the genus *Plasmodium* and *Haemoproteus*. We identified the parasite strain by sequencing PCR products of infected individuals and sequences were compared with those of the GenBank database using the algorithm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). We wanted to use *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) for our subsequent experimental infection.

Approximately 200 µl of blood were collected from 5 house sparrows that were infected with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). The blood was directly transferred

intraperitoneally to 12 domestic canaries, using 0.5 ml insulin syringes, in order to increase parasite intensity.

2. Parasite doses

We use 4 different parasite doses: 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 . These doses are comparable to those a bird can receive after one or several mosquito bites. Indeed a mosquito transmits generally less than 20 sporozoites, each of them producing generally less than 40,000 merozoites (Garnham 1966). Therefore, the bite of an infected mosquito can potentially lead to parasite intensities up to 8×10^5 . This simple computation suggests that our experimental doses are probably comparable with those experienced in natural situations.

Eleven days after the infection of canary “donors”, we measured haematocrit of these 12 birds and prepared blood smears by spreading a drop of blood on a glass slide for microscopic examination, fixed with absolute methanol and coloured with 10% Giemsa solution (Sigma-Aldrich). We counted the number of asexual infectious stages of the parasite observed in a total of 10,000 erythrocytes. Parasite intensities and haematocrit allowed us to evaluate the number of parasites per μl of blood for each bird (a haematocrit of 50% correspond approximately to 5,000,000 erythrocytes per microliter of blood).

We collected blood of donors which was subsequently diluted in 0.9% saline solution as to obtain the required number of parasites per inoculum for subsequent infections (see experimental design).

3. Experimental design

None of the canaries used in the experiments harboured haemosporidians prior to the experimental infection, as confirmed by qPCR (see below). Fifty eight birds were used for this experiment, divided into 5 groups according to the parasite dose they received. At day 0,

all canaries were body weighed ($\pm 0.1\text{g}$), and 20 μl of blood were collected to measure haematocrit. Then each group received intraperitoneally a dose of *Plasmodium relictum* (see above): 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 or 0. In this latter (the control group) parasite infection has been replaced with an injection of 0.9% saline solution.

At days 5, 8, 11, 14 and 17 days after parasite infection, we recorded body mass and haematocrit of each bird. We collected also a drop of blood that we stored in 500 μl of Queen's Lysis Buffer in order to extract parasite DNA and quantify parasite intensities by quantitative PCR.

4. Quantitative PCR

Parasite intensities were obtained using the quantitative PCR assay developed by Esparza-Salas et al. (unpublished). For each individual, we conducted two qPCR reactions in the same run: one targeting the nuclear 18s rDNA gene of *Plasmodium* (Primers 18sPlasm7 5'-AGC CTG AGA AAT AGC TAC CAC ATC TA-3', 18sPlasm8 5'-TGT TAT TTC TTG TCA CTA CCT CTC TTC TTT-3', and fluorescent probe Plasm Hyb2 5'-6FAM-CAG CAG GCG CGT AAA TTA CCC AAT TC-BHQ1-3') and the other targeting the 18s rDNA gene of bird (Primers 18sAv7 5'-GAA ACT CGC AAT GGC TCA TTA AAT C-3', 18sAv8 5'-TAT TAG CTC TAG AAT TAC CAC AGT TAT CCA-3' and fluorescent probe 18sAv Hyb 5'-VIC-TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC-BHQ1-3').

Parasite intensities were calculated as relative quantification values (RQ) as $2^{-(\text{Ct}_{18\text{s}} \text{ Plasmodium} - \text{Ct}_{18\text{s}} \text{ Bird})}$ using the software SDS 2.2 (Applied Biosystem). Ct represents the number of PCR cycles at which fluorescence is first detected as statistically significant above the baseline, which is inversely correlated with the initial amount of DNA in a sample. RQ can be interpreted as the fold-amount of target gene (*Plasmodium* 18s rDNA) with respect to the amount of the reference gene (host 18s rDNA). All qPCR reactions were run on an ABI

7900HT real-time PCR system (Applied Biosystem). With this method we were able to detect a minimum of 6.7 copies of 18s rDNA of *Plasmodium*, minimizing the risk of false negatives.

5. Statistical analysis

For all the statistical analysis, we used the statistical software R (Ihaka & Gentleman 1996, <http://cran.r-project.org>) version 2.10.0 and the p-value threshold has been fixed at $p=0.05$.

Changes in parasite intensity, bird body mass and haematocrit were analyzed using linear mixed effects model (lme4 package). Given the repeated nature of the data, individual identity was considered as a random factor in each model. Body mass and haematocrit variation were analyzed using a normal distribution of errors whereas for parasite intensity we used a beta distribution. Infective doses and the time after infections were considered as explanatory variables and non-significant interactions have been removed from models.

Results

Effect of infective dose on host fitness

Hematocrit dropped following infection at a faster rate for infected birds compared to non infected hosts. Overall, the rate of decline of hematocrit was more severe for birds infected with the highest doses (10^5 and 10^6), resulting in a statistically significant time x dose interaction (figure 2, table 1).

Birds inoculated with the 10^6 parasite dose also suffered from the largest reduction in body mass, during the course of the experiment (figure 3). Actually, birds in the other

groups tended to gain body mass in the two weeks that followed the infection, resulting in a significant interaction between time and parasite dose (table 2).

Finally, the 10^6 parasite dose also entailed the highest mortality rate with 42% of the birds that died during the experiment. The mortality rate of birds in the other groups was minimal ($0 = 11\%$, $10^3 = 9\%$, $10^4 = 18\%$, $10^5 = 7\%$; $\chi^2 = 5.17$, $p = 0.023$).

Effect of infective dose and parasite multiplication rate

As for disease severity, the highest infective dose produced the highest parasite intensity, whereas the other infective doses resulted in comparable parasite dynamics. Parasite intensity of birds inoculated with the 10^6 dose reached high levels and interestingly did not tend to decrease at the end of the experimental period. (Table3, figure 4).

Parasite multiplication vs disease severity

There was a relationship between parasite multiplication rate and severity of symptoms (haematocrit loss), all doses taken together. Indeed we obtained significant negative effect of parasite number on these two symptoms at the time of peaks of parasitemia (days 11-17 post-infection). haematocrit was negatively influenced by parasite number 11 and 17 days after inoculation (day 11: $F_{1,42}=4.426$, $p=0.042$; day17: $F_{1,40}=6.045$, $p=0.018$). However such costs were not modulated by parasite dose injected, at none of days post-infection.

Discussion

The aim of the present study was to estimate if parasite infective dose affected the severity of avian malaria. Using the same parasite lineage, we test if increasing inoculum of *Plasmodium relictum* would lead to increasing i) parasite multiplication rates and ii) fitness cost for the host. We found that indeed parasite dose did increase parasite intensity

and disease severity, but these effects were not linear and mostly due to the highest dose inoculated.

For some host-parasite associations, a minimal parasite load is required to allow parasite establishment (Boyd, 1925; Chu and Velety, 1997; De Roode et al., 2009). In the case of *Plasmodium relictum*, an infective dose of 1000 parasite was sufficient to initiate the disease in domestic canaries. Nevertheless the absence of a linear relationship between dose and fitness costs militates for a threshold effect where low doses have similar consequences in terms of parasite dynamics and virulence and once the threshold has been reached the infection gets out of control of the host. Our results are reminiscent of previous work where infective dose and parasite dynamics were not linearly correlated (Boyd, 1925; Hewitt, 1942; Glynn and Bradley, 1995; Glynn et al., 1995; Permin and Juhl, 2002).

Among all the traits we measured, the only one that approached a linear relationship with parasite dose was decrease in hematocrit. This result also suggest that parasite intensity and disease severity might not be thightly correlated, as generally assumed. Indeed other factors such as organ-specific accumulation of parasites, release of parasite toxins, or energetic and immunopathological costs of mounting an immune response against pathogens could all determine the outcome of the interaction. In agreement with this, we showed in a previous study that an over-reacting immune response against *P. relictum* can bear a cost for infected canaries (Cellier-Holzem et al., submitted). Similar results have also been reported in human and rodent malaria (Clark et al. 2004, Graham et al. 2005).

Within host competition has been suggested to be an important factor driving virulence evolution (De Roode et al., 2005). We expected create more competition by increasing infective dose and like this selected more virulence parasites. Competition could partly explain our results, in particular those obtained after the injection of one million parasites. These latter were susceptible, seeing their number, to be in competition for the same

limited resources. In this context, parasites with the highest multiplication rate and the most efficient strategy of host exploitation would be advantaged. Our contrasted results didn't permit us to generalize this idea to all parasite infective doses.

Rather focus only on the number of parasite infecting hosts, it could be interesting to estimate the genetic diversity of parasite genotypes presents in the infective dose. This diversity would be susceptible to influence the outcome of the host-parasite interaction (Vizoso and Ebert, 2005). High diversity of parasite strains could increase the diversity of host exploitation strategies. For instance, models developed by McQueen and McKenzie (2004, 2006) showed that parasites infecting reticulocytes (young red-cells) could cause the severest anaemia. Parasite diversity could be an important factor to take in count to explain damages caused to hosts.

Finally what could be the link between infective dose and probability of transmission? Dawes et al. (2009) showed, in case of *Plasmodium berghei* infections, that mosquito mortality was Plasmodium-density dependent. Seeing vector's life-span and the time necessary for the parasite to reach its infective stage, a small reduction of mosquito life-span could entail important changes of parasite transmission rates to vertebrate hosts. So, parasites having important multiplication rates could be advantaged in term of transmission probability to vectors but disadvantaged by host and vector mortality, and a regulation could occur in favour of intermediate parasite virulence. If we obtained contrasted results on *Plasmodium relictum* dose effects, we could envisage going further by analysing in detail influence of the infective dose on the evolution of host-parasite interaction, in particular on virulence evolution. This could be conceivable by serial passages experiments of parasites at different doses, and the study of virulence changes caused.

Acknowledgements

We are very grateful to David Bru for his assistance with the quantitative PCR. Financial support was provided by the Région Bourgogne, the ANR IRMAL, and the CNRS program MIE. The experiments were performed under the DSV permit # 21-CAE-085.

References

- Anderson, R.M., May, R.M., 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes. *J. Anim. Ecol.* 47, 219–247.
- Boyd, G.H., 1925. The influence of certain experimental factors upon the course of infections with *Plasmodium praecox*. *Am. J. Hyg.* 5, 818-837.
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S., Sorci, G., *in press*. Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *Int. J. Parasitol.*
- Chu, F.L.E., Volety, A.K., 1997. Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in eastern oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Dis. Aquat. Org.* 28, 61-68.
- Clark, I.A., Alleva, L.M., Mills, A.C., Cowden, W.B., 2004. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 509-539.
- Crawley, M.J., 2007. *The R book*. Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 942p.
- Dawes, E.J., Churcher, T.S., Zhuang, S., Sinden, R.E., Basáñez, M.G., 2009. *Anopheles* mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malaria J.* 8, 228.
- De Roode, J.C., Chi, J., Rarick, R.M., Altizer, S., 2009. Strength in numbers: high parasite burdens increase transmission of a protozoan parasite of monarch butterflies (*Danaus plexippus*). *Oecologia* 161, 67-75.

- De Roode, J.C., Pansini, R., Cheesman, S.J., Helinski, M.E.H., Huijben, S., Wargo, A., Bell, A.S., Chan, B.H.K., Walliker, D., Read, A.F., 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *PNAS* 102, 7624-7628.
- Ebert, D., Zschokke-Rohringer, C.D., Carius, H.J., 2000. Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia* 122, 200-209.
- Frank, S.A., 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* 71, 37-78.
- Garnham, P.C.C., 1966. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Glynn, J.R., Bradley, D.J., 1995. Inoculum size and severity of malaria induced with *Plasmodium ovale*. *Acta Trop.* 59, 65-70.
- Glynn, J.R., Collins, W.E., Jeffery, G.M., Bradley, D.J., 1995. Infecting dose and severity of falciparum malaria. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 89, 281-283.
- Graham, A.L., Allen, J.E., Read, A.F., 2005a. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 373-397.
- Graham, A.L., Lamb, T.J., Read, A.F., Allen, J.E., 2005b. Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *J. Infect. Dis.* 191, 410-421.
- Gupta, S., Hill, A.V.S., Kwiatkowski, D., Greenwood, A.M., Greenwood, B.M., Day, K.P., 1994. Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3715-3719.
- Hewitt, R., 1942. Studies on the host-parasite relationships of untreated infections with *Plasmodium lophurae* in ducks. *Am. J. Hyg.* 36, 6-42.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 1996. *Molecular Systematics*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: A language for data analysis and graphics. J. Comput. Graph. Stat. 5, 299–314.
- Jones, S.R.M., Palmen, M., van Muiswinkel, W.B., 1993. Effects of inoculum route and dose on the immune response of common carp, *Cyprinus carpio* to the blood parasite, *Trypanoplasma borreli*. Vet. Immunol. Immunop. 36, 369-378.
- Lenski, R.E., May, R.M., 1994. The evolution of virulence in parasites and pathogens: reconciliation between two competing hypotheses. J. theor. Biol. 169, 253-265.
- Mackinnon, M.J., Read, A.F., 2004. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci. 359, 965-986.
- Marsh, K., 1992. Malaria – a neglected disease. Parasitology 104, S53-S69.
- McQueen, P.G., McKenzie, F.E., 2004. Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. PNAS 101, 9161-9166.
- McQueen, P.G., McKenzie, F.E., 2006. Competition for red blood cells can enhance *Plasmodium vivax* parasitemia in mixed-species malaria infections. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 112-125.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C.V., Bensch, S., 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. Exp. Parasitol. 120, 372-380.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Križanauskiene, A., Bensch, S., Bolshakov, C.V., 2009. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with MalaroneTM. Exp. Parasitol. 123, 134-139.
- Permin, A., Juhl, J., 2002. The development of *Plasmodium gallinaceum* infections in chickens following single infections with three different dose levels. Vet. Parasitol. 105, 1-10.

- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer Verlag New York, LLC, 528p.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69, 82-90.
- Sorci, G., Faivre, B., 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 71-83.
- Timms, R., Colegrave, N., Chan, B.H.K., Read, A.F., 2001. The effect of parasite dose on severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* 123, 1-11.
- Vizoso, D.B., Ebert, D., 2005. Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia* 143, 157-166.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö., 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infection from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 191-194.
- Wolfson, F., 1945. Virulence of the IG strain of *Plasmodium relictum* for the duck. *Am. J. Hyg.* 42, 111-118.

Table 1. Mixed-effects model reporting the effect of parasite dose on haematocrit variation of domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Parasite dose	1,134.1	0.01	0.936
Time	1,262.5	35.58	<0.0001
Squared time	1, 262.5	16.47	<0.0001
Time x Parasite dose	1,268.5	4.72	0.031

Table 2. Mixed-effects model reporting the effect of parasite dose on body mass variation of domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Parasite dose	1,9.306	0.00	0.958
Time	1,268.3	23.81	<0.0001
Squared time	1,268.3	12.5	0.0005
Time x Parasite dose	1,269.6	28.69	<0.0001

Table 3. Mixed-effects model reporting the effect of parasite dose on parasite intensity variation in blood of domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Time	1,136	12.3	0.0006
Squared time	1,136.8	5.69	0.0184
Log(Parasite dose)	1,36.13	13.94	0.0006

Legend to Figures

Figure 1: theoretical representations of possible relationships between parasite dose inoculated to a host and disease severity.

Figure 2: Variation of haematocrit (mean percentage) of canaries having received different *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) infective doses.

Figure 3: Variation of body mass (mean g) of canaries having received different *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) infective doses.

Figure 4: Dynamics of parasitemia [mean RQ (relative amount of parasite DNA) $\pm$ SE] of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) injected at different infective doses to domestic canaries.

Figure 1

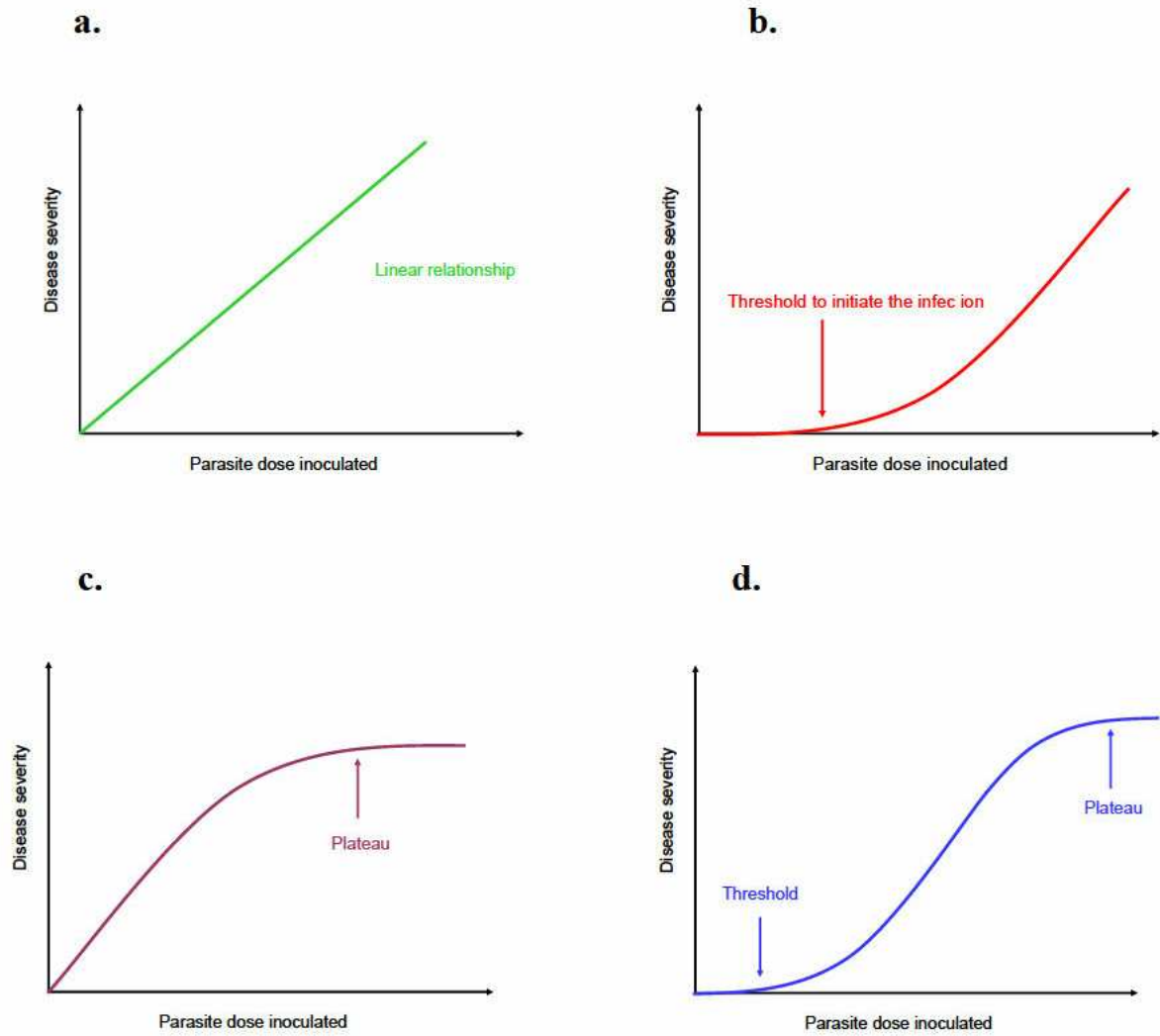


Figure 2

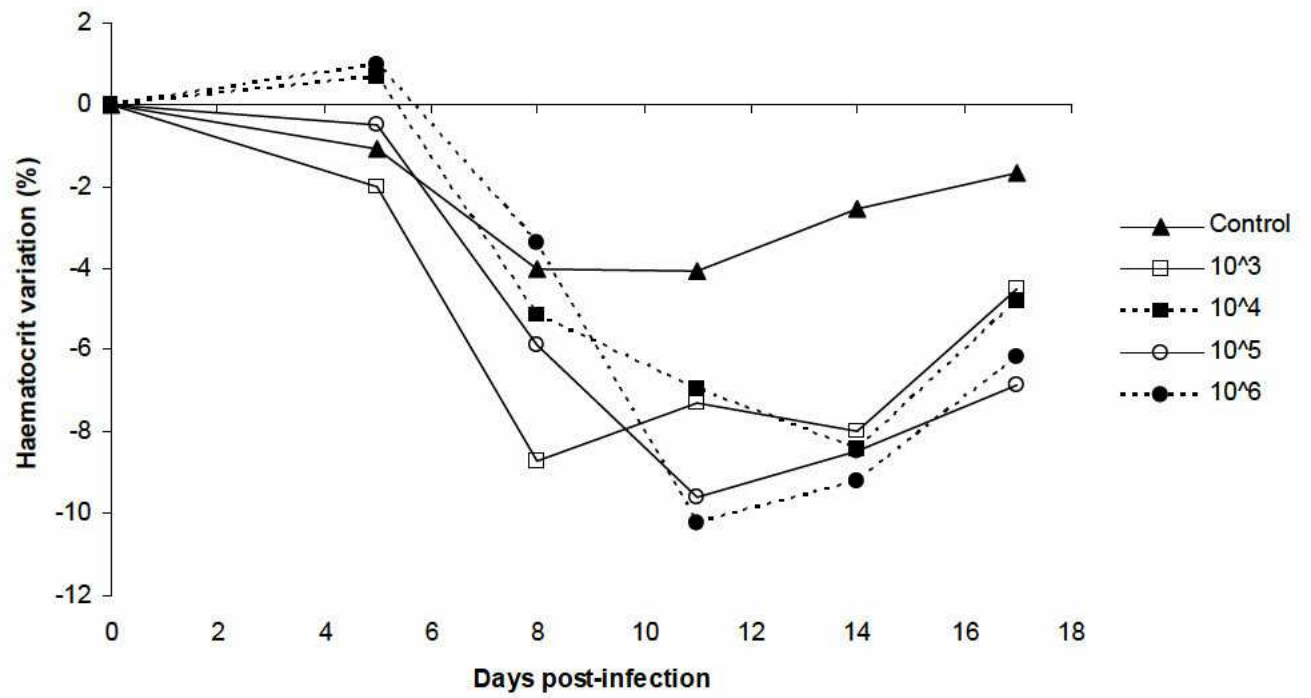


Figure 3

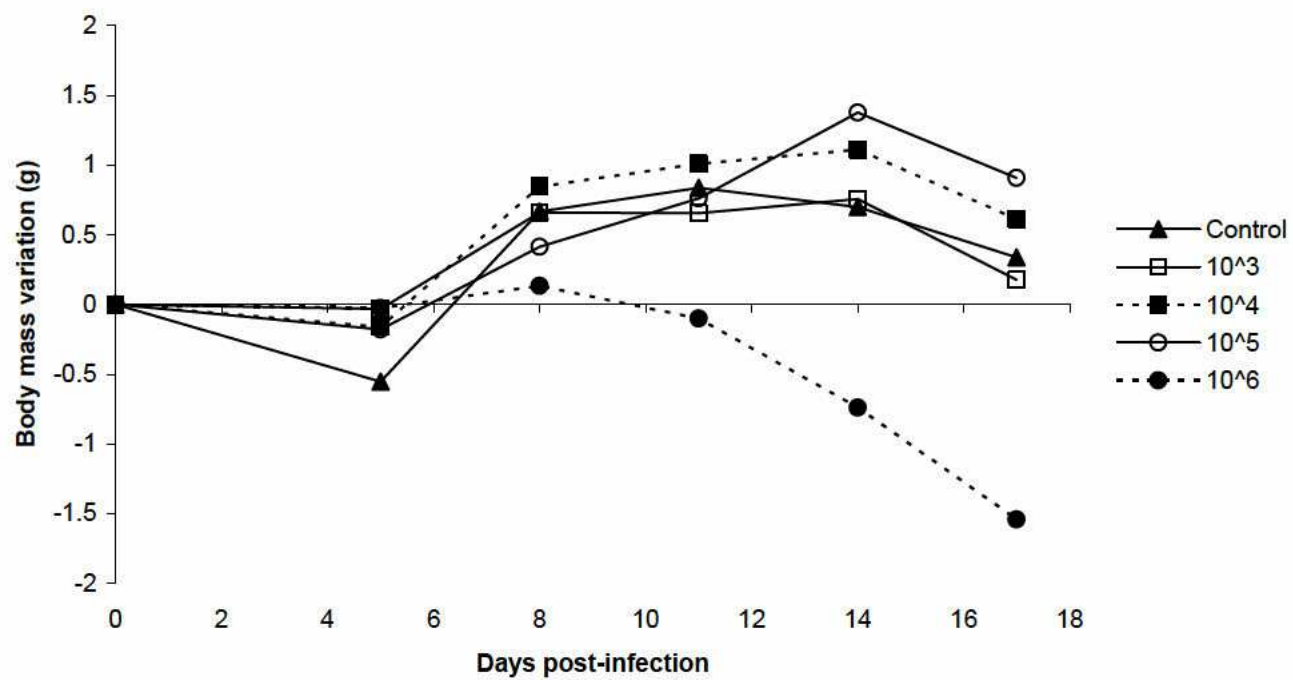
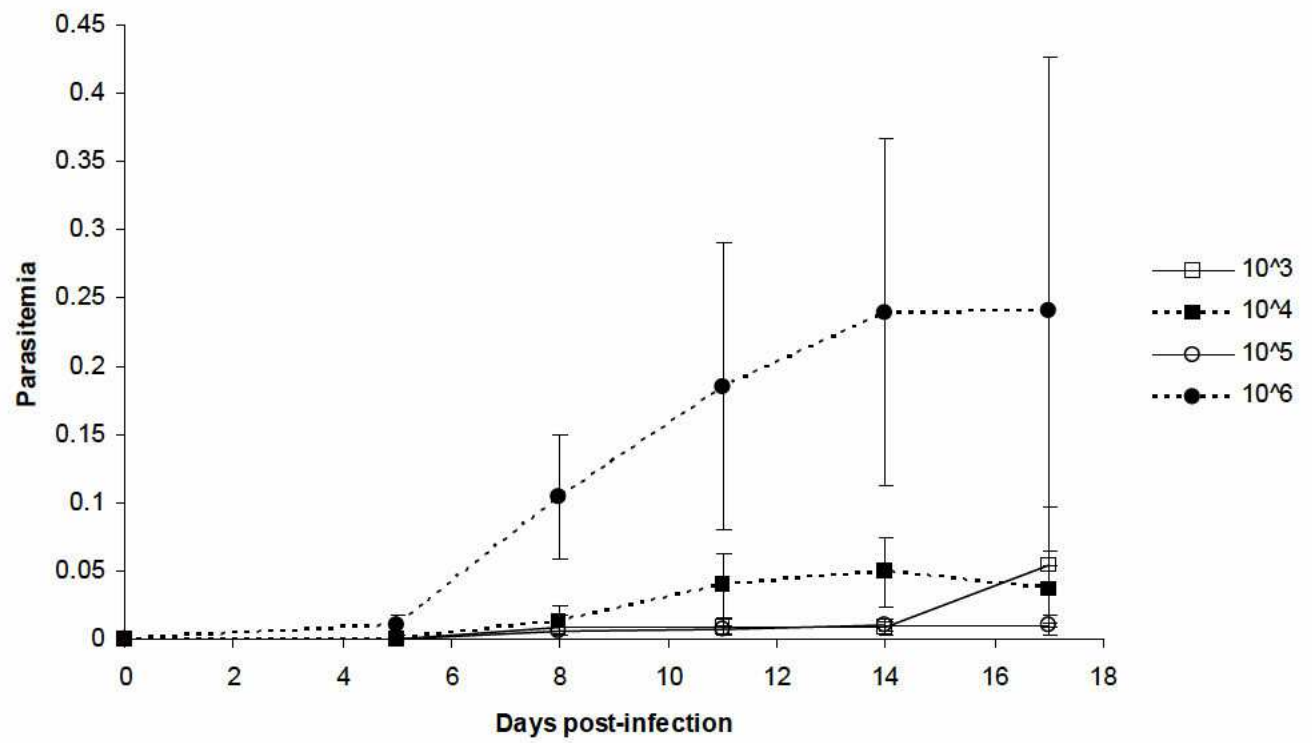


Figure 4



Annexe 4

Larcombe, S., Cellier-Holzem, E., Bedhomme, S., Garnier, S., Faivre, B. and Sorci, G. Social interactions modulate the cost of avian malaria infection. *Submitted to International Journal for Parasitology*.

Social interactions modulate the cost of avian malaria infection

Stephen Larcombe^{1*}, Elise Cellier-Holzem¹, Stéphanie Bedhomme², Stéphane Garnier¹,
Bruno Faivre¹, Gabriele Sorci¹

1. BioGéoSciences, CNRS UMR 5561

Université de Bourgogne,

6 Boulevard Gabriel,

Dijon,

21000, France.

2 Evolutionary Systems Virology Group

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV)

Campus UPV, CPI 8E, lab. 3.0.4

Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 València, Spain

Keywords:

Avian malaria, competition, group living, social rank, cost infection, social stress

* Corresponding author

Email:

Stephen.larcombe@u-bourgogne.fr*

Elise.cellier-holzem@u-bourgogne.fr

Stephane.garnier@u-bourgogne.fr

Gabriele.sorci@u-bourgogne.fr

Bruno.faivre@u-bourgogne.fr

stebed@upvnet.upv.es

Abstract

Recently, a new source of variation in parasitic virulence has been identified: additive costs of parasitism through modification of host competitive ability. In vertebrates with social hierarchies, we propose that these prevalence-dependent costs may vary with social status. Dominant individuals have greater competitive ability and food access than competing subordinates, and consequently may pay a lower prevalence-mediated cost of infection. In this study we investigated whether costs of malarial infection were affected by parasite prevalence and social status in domestic canaries (*Serinus canaria*). We predicted that infected birds competing with non-infected birds would pay higher costs than infected birds competing with infected birds, and that the prevalence-mediated cost of infection should be particularly strong for subordinates. We found that the cost of infection was mediated by the social status of the hosts. However, subordinate birds appeared to pay lower costs of parasitism and competition than dominants. We also found dominant birds had higher mortality than subordinates for a given intensity of infection, suggesting differential “tolerance” to the infection. Ultimately, we provide evidence for prevalence-dependent costs of parasitism, mediated by social rank, in a vertebrate species. This has important implications for our understanding of the evolutionary processes that shape parasite virulence and group living.

Introduction

The ubiquity of parasites ensures that the ability to resist the costs of infection is one of the major factors affecting an organism's fitness. Hosts vary in the degree of damage suffered when exposed to a similar parasitic challenge, and assessing the factors which determine these differences in parasite-mediated morbidity and mortality (generally called parasite virulence) is of fundamental interest to evolutionary biologists (Alizon et al. 2009). Parasite virulence is affected both by host genotype, parasite genotype and their interaction (Grech et al. 2006; Lefevre et al. 2007). As well as genetic differences, environmental conditions can alter parasite virulence (e.g. Jokela et al. 1999; Ferguson and Read 2002; Bedhomme et al. 2004; Tseng 2006), and individual differences in physiological conditions (e.g. levels of host physiological stress) can alter the magnitude of the cost of infection (Brown et al. 2000).

One factor influencing parasite virulence, which has only recently been experimentally demonstrated, is additive costs of parasitism through modification of host competitive ability (Hochberg 1998). Here, the effects of a parasitic infection are not solely determined by parasitism of the focal host, but also by the parasitism status of conspecific competitors. Bedhomme et al. (2005) showed that when larvae of the mosquito *Aedes aegypti* were infected with the microsporidian parasite *Vavraia culicis* they had a longer developmental time, a demonstrable fitness cost in this species. However, this cost of parasitism was also dependent on the infection status of conspecifics: the developmental time was always longer for infected larvae competing with non-infected larvae, than for infected larvae competing with other infected individuals. This suggests that although competition between individuals usually induces a cost, the strength of this cost is determined by both individual parasitic intensity, and the prevalence of parasitism in conspecific competitors. This idea has been

confirmed in just a few plant (Pagan et al. 2009) and animal species (Bedhomme et al. 2005; Koprivnikar et al. 2008), however, the hypothesis is also likely to apply to many group living organisms.

Unlike plants or mosquito larvae, many vertebrates including birds, live in social groups, and have a large behavioral repertoire. As such, interactions between individuals are likely to be more complex, than in lower, behaviorally limited organisms. In many group living birds, social hierarchies are established between dominant and subordinate individuals. In these cases, competition between individuals is often mediated by social rank. For example, in canaries it was previously shown that dominant birds have a greater access to food than subordinates, and subordinate birds avoid interactions with dominants at food sites (Parisot et al. 2004). For such social animal, not only may the cost of an infection depend on the infectious status of competitors, but also on their level of competitive ability determined by social rank. Thus, we predict the competition-mediated increase in costs of infection to be more severe for subordinate than for dominant birds.

The goal of this study was to assess the interactive effects between parasitic prevalence, host competition and social status, on the costs of infection, using domestic canaries as hosts and the avian malarial parasite *Plasmodium relictum* as a parasite. By keeping canaries in flocks of 6 birds, and scoring for consistent dominant and subordinate behaviors, we divided birds into 3 dominant (D) and 3 subordinate (S) birds per flock. Birds were provided with a limited though adequate diet to encourage competition for food within the flocks. We then followed a similar experimental design to that outlined in Bedhomme et al. (2005), though here we included social status as a factor within the design. We had four treatment groups in flocks with birds either infected (+), or non-infected (-), with the *Plasmodium* parasite. These groups were: D+ S+ ; D+ S- ; D- S+ ; and D- S-. Following

infection, we measured several attributes of costs of infection and parasite intensity. We predicted significant three-way interactions between social status, parasite prevalence, and infection status on mortality rate, and physiological changes thought to reflect the costs of infection. Figure 1 shows a schematic representation of our predictions:

1. Overall, infected birds competing with non-infected birds would pay higher physiological costs than infected birds competing with infected birds.
2. Subordinate infected birds should pay a greater physiological cost of infection than dominants, since dominant birds should have higher competitive ability.
3. The difference in costs between infected dominant and infected subordinate birds should be greatest when they were kept with non-infected competitors.

Materials and methods

We used 96 adult male canaries during the experiment, and prior to commencement each bird was molecularly sexed following a standard PCR technique (Fridolffson and Ellegren 1999). We only used male canaries in the experiment as we did not wish to confound the experiment with differences between sexes, or by interactions in- and between pairs of birds. After confirming the sex of each bird, we divided the birds between 16 aviaries (2.5 * 1.5 * 2.2 m), 6 birds per aviary. Each bird was weighed, and had its tarsus length measured prior to re-housing in a new flock.

Husbandry and Competition

Before commencing the manipulation of competition, all cages were provided with ad libitum food (a commercial seed mix, lettuce and apple) for 7 days. Since we were interested in competition between birds, and previous studies have shown that limited food provision results in an increase in competition (Bedhomme et al. 2005; Hawley et al. 2006), following the 7 days of acclimation, the birds were provided each day with 12g of seeds per bird per day, provided in one circular feeding dish per cage. We had previously found that 12g of seeds is the maximum amount a single bird would eat per day (Larcombe et al. unpublished data). This amount of seed was thus sufficient to nourish each bird, though encourage competition between birds (pers obs). During the course of the experiment, the cages were monitored daily, and if a bird died the amount of seed was reduced accordingly.

Behavioral observation

We performed behavioral observations to assess the social status of each bird before the experimental infection, and to monitor any changes in social status related to the treatments. The first phase of observations was carried out 4 days after the start of the limited

seed provision and 11 days after being placed in their flocks, by which time birds had established dominant and subordinate roles. We performed behavioral observations for 3 consecutive days. Each morning at 09.00 we removed the remaining seed from the day before, and left cages for 30 minutes without seeds. Following the 30 minute food deprivation, we placed a seed feeder in each cage that allowed only a single bird to feed at a time. We also placed a video camera in each cage and filmed the interactions between birds at the feeder for 20 minutes, starting when the feeder was first entered. Birds were marked with non-toxic colored pen on the back of the head or wings for identification on the video tapes.

In order to score the bird's behavior, when the video was re-watched the 20 minute time period was divided into 10 two minute blocks. Birds were scored for the presence or absence of certain behaviors in each block: Primary Access (PA) to the feeder, where a bird successfully fed directly from the hole in the feeder. Aggression (AGG), where a bird aggressively postured towards another, typically by lowering its head and fanning and trembling its wings, or by pecking out at the other bird, sometimes escalating into a physical fight.

We classified birds within a flock into two categories, based on social status: 3 dominant birds, and 3 subordinate birds. Classification was based on the mean number of primary accesses to the seeds across the first three days of behavioral observations, though where the number of primary access was very similar or tied, birds were divided according to their number of aggressive encounters. We based our social status classification on primary access as we felt this best reflected "dominance" *per se*, that is the ability to monopolise the food resource. However, it is important to note that daily primary access was highly positively correlated with daily aggression (spearman's ρ max = 0.787, min = 0.716, $p < 0.0001$ in all cases). Additionally, our behavioral scores were repeatable across the consecutive days

measured (PA: spearman's ρ max = 0.713, min = 0.582, $p < 0.0001$ in all cases. AGG: spearman's ρ max = 0.622, min = 0.457 $p < 0.0001$ in all cases). Thus we feel we have accurately described each bird as having a distinct, repeatable behavioral pattern. This was further confirmed by the internal consistency statistic Cronbach's Alpha, which was high (PA = 0.823, AGG = 0.790) across all three days of observation, permitting the use of mean incidence of PA and AGG before and after infection as a measure of behavioral change.

In order to assess any change in behavior attributable to experimental infection we performed an identical phase of observations starting 9 days post infection, in order to coincide around the peak of infection intensity. Again, we observed PA and AGG for every bird and computed a mean incidence from pre- and post-infection to assess behavioral change. Due to some mortality at this stage we used only data from cages with at least 5 birds.

Experimental Infection

Canaries were intraperitoneally inoculated with 1×10^6 *Plasmodium relictum* parasites. Parasites were initially obtained from a natural population of house sparrows (*Passer domesticus*), and transferred to domestic canaries. Parasites were subsequently maintained as a cryopreserved stock.

On the day of infection, we captured all birds within a flock. Each bird was weighed, and a small volume of blood was taken in a capillary tube for subsequent haematocrit assessment. Finally, the bird was either injected with *Plasmodium* infected canary blood, or with control uninfected canary blood, according to their dominance status as outlined below. We had four treatment schemes which were divided randomly within the aviary: Dominant infected with Subordinate infected (D+ S+); Dominant infected with Subordinate non-infected (D+ S-); Dominant non-infected with Subordinate infected (D- S+); and Dominant non-

infected with Subordinate non-infected (D- S-). Since we had 16 flocks, we had 4 replicates of each infection scheme, each containing 3 dominant and 3 subordinate birds.

Post-infection monitoring

Following the experimental infection (day 0), birds were left in their flocks, and were monitored at regular intervals. We re-caught all birds on days 5, 8, 11, 14 and 17 post-infection. On each of these sampling days, we took a small blood sample for haematocrit measurement and qPCR, and weighed each bird. The measurement of haematocrit offered a good indication of the specific cost of infection, since a negative change in haematocrit (the proportion of red cells in a given sample of blood) can be directly representative of damage caused by malarial parasites in canaries (Spencer et al. 2005).

Assessing parasite intensity

Parasite intensity was assessed using the quantitative PCR assay developed by Esparza-Salas *et al.* (submitted). For each individual we conducted two qPCR reactions in the same run: one targeting the nuclear 18s rDNA gene of *Plasmodium* (Primers 18sPlasm7 (5'-AGC CTG AGA AAT AGC TAC CAC ATC TA-3'), 18sPlasm8 (5'-TGT TAT TTC TTG TCA CTA CCT CTC TTC TTT-3'), and fluorescent probe Plasm Hyb2 (5'-6FAM-CAG CAG GCG CGT AAA TTA CCC AAT TC-BHQ1-3')) and the other targeting the 18s rDNA gene of bird (Primers 18sAv7 (5'-GAA ACT CGC AAT GGC TCA TTA AAT C-3'), 18sAv8 (5'-TAT TAG CTC TAG AAT TAC CAC AGT TAT CCA-3') and fluorescent probe 18sAv Hyb (5'-VIC-TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC-BHQ1-3')).

Parasite intensities were calculated as relative quantification values (RQ) as $2^{-(Ct_{18s} \text{ Plasmodium} - Ct_{18s} \text{ Bird})}$ using the software SDS 2.2 (Applied Biosystem). Ct represents the number of PCR cycles at which fluorescence is first detected as statistically significant above the

baseline and RQ can be interpreted as the fold-amount of target gene (*Plasmodium* 18s rDNA) with respect to the amount of the reference gene (host 18s rDNA). All qPCR reactions were carried out in an ABI Prism 7900 cyclor (Applied Biosystem).

Statistic

For every measured variable we constructed identical full factorial models including dominance status (dominant/subordinate), infection status (infected/non-infected) and parasite prevalence (whole flock infected or non-infected /half flock infected, half flock non-infected) and all possible two- and three-way interactions. The three way interaction should reveal whether costs of infection were dependent on social rank and parasitism of competitors as predicted. We analyzed the change in mass and haematocrit, and the maximal value of infection intensity, in addition to mortality data as physiological costs of infection. For changes in mass and haematocrit we used the absolute maximal change, i.e. initial value minus minimal value (though analyzing the data using a repeated measures GLM with individual identity as a random factor did not yield different results). Models explaining the maximum intensity of infection concern only infected birds, and we used maximum intensity only for birds where we had at least two values of intensity. Initially, we constructed General Linear Mixed Models (GLMMs) using SAS v 9 with cage identity as a random factor to account for non-independence of birds within the same cage. However, the random factor, cage identity, never significantly contributed to any model (best value: Haematocrit, Cage ID, Wald's $Z = -1.3$, $p = 0.193$). Thus we constructed GLM models without the random factor to simplify the analyses. Owing to their non-normal distributions, change in haematocrit was modelled with a poisson error distribution, and mortality data was analyzed using a binomial error distribution. Three birds were excluded from our results as they died early in the

experimental phase, as a result of known causes (haemorrhage) non-attributable to our experimental treatments.

Results:

Mortality

Figure 2 shows the cumulative mortality per infection treatment, parasite prevalence and dominance status, at day 17 post infection. The three-way interaction was statistically significant (see Table 1). Figure 2 shows that, overall, more birds died when infected, and this did not differ between dominant and subordinate birds. Mortality was also affected by dominance status and parasite prevalence: within any given cage composition subordinate birds had better survival than competing dominants in the flock, except when they were infected and caged with uninfected dominants. Initially, we predicted that if there was an additive cost of infection depending on social context, the difference in costs between infected dominant and infected subordinate birds should be greatest when they were kept with non-infected competitors. (see Introduction, Fig 1). In fact, we found that in our mixed cages, infected subordinate and dominant birds had identical mortality, when competing with uninfected competitors.

Haematocrit and Mass Change

Prior to the experiment there were no differences in mass ($\chi^2 = 0.34$, $p = 0.56$) haematocrit, ($\chi^2 = 1.3$, $p = 0.25$) nor tarsus length ($\chi^2 = 1.1$, $p = 0.19$) between subordinate and dominant birds, suggesting that aggressive and dominant behaviors were not simply determined by size or condition.

In order to search for differences in physiological costs of infection, we first analyzed the change in haematocrit and mass. We found a significant three-way interaction between dominance status, infection and parasite prevalence on the change in haematocrit (Table 2). Figure 3 shows the change in haematocrit for each treatment group, where a larger positive change indicates a bigger drop in haematocrit. A change in haematocrit is a good measure of the cost of infection, since it represents the destruction of red blood cells by the malarial parasites. Comparing the changes in haematocrit (Figure 3) to our predicted results (Figure 1) shows that for most groups the cost of infection was close to our predicted trend, with one notable exception: Contrary to our prediction, infected subordinate birds competing with non-infected dominant birds actually paid a smaller cost than infected subordinates competing with infected dominants. The opposite trend was true for infected dominant birds, where competition with non-infected subordinates evoked a higher cost of infection (bigger change in haematocrit) than competition with infected subordinates.

Only infection significantly altered the change in mass (GLM: infection $\chi^2 = 5.3$, $p = 0.0213$). Neither parasite prevalence, dominance nor any interactions significantly affected mass change (all others, GLM $\chi^2 < 0.16$, $p > 0.6$).

Intensity of infection

We calculated the maximum intensity of infection for all infected birds. Neither dominance status, nor parasite prevalence significantly affected the intensity of infection (GLM $\chi^2 < 1.93$, $p > 0.16$). However, we found that in models without our experimental treatments, the best predictor of mortality was maximum intensity of infection (GLM: maximum intensity $\chi^2 = 6.43$, $p = 0.0112$). Thus we wished to assess whether the pattern of mortality as a function of intensity of infection differed according to parasite prevalence or dominance. We constructed a fully factorial model including all two and three way

interactions with maximal intensity, dominance, and prevalence, using mortality as a binomially distributed response variable. We found a significant interaction between dominance and maximal intensity on mortality (GLM dominance*intensity $\chi^2 = 4.01$, $p = 0.0451$), though no effect of parasite prevalence. Figure 4 shows the predicted mortality probability for dominant and subordinate birds as a function of intensity of infection. This shows that although the mean maximal intensity does not differ between dominant and subordinate birds, for a given intensity there is a higher chance of a dominant dying. Indeed, above a threshold value of infection intensity, dominant birds never survived, whereas subordinates appeared to be able to survive the infection, even with very high intensities of infection.

Behavior

We found a statistically significant three-way interaction between dominance, parasite prevalence, and infection upon the change in aggressive behavior (see Table 3). Figure 5 shows this interaction. Birds tended not to alter behavior dramatically, with a maximum mean change of ~ 1 incidence of behavior, such that dominant birds did not become subordinates in terms of behavior (prior to treatment, mean number of aggressive interactions per day: dominants 3.79 ± 0.29 , subordinates 1.54 ± 0.18 . Mean number of primary accesses per day: dominants 4.51 ± 0.31 , subordinates 1.64 ± 0.19). Although the pattern is far from clear, in general dominant birds that did change behavior tended to decrease aggression, whereas those subordinates that changed aggression tended to increase. The most noteworthy difference occurs in D+ S+ flocks. In these cages, the decrease in aggression of dominants is mirrored by a concomitant increase in aggression of subordinates. There was no significant effect of any variable on the change in primary access to the feeder, which may suggest that changes in

aggression were not actually mirrored by a change in the ability to access the feeder (GLM dominance*prevalence*infection $\chi^2 = 2.65$, $p = 0.103$).

Discussion:

A recent experiment by Bedhomme et al. (2005) showed that a possibly overlooked source of variation in parasite virulence was that costs of infection could depend not just on an individual's own infection, but also on the infection status of competing conspecifics. Our aim in this experiment was to assess whether or not the cost of infection in adult canaries was dependent on the combined infection status of the social group, when individuals were forced to compete for a limited food resource. Moreover, canary social groups are characterised by the establishment of dominance relationships among the members. We added social status to this theoretical framework and predicted that a bird's dominance and infection status would interact with the social and infection status of competitors to differentially affect the costs of infection (see Figure 1 for full predictions). Indeed, we found that while infection, dominance status, and the parasite prevalence did significantly interact to produce different costs of infection for birds, the patterns were not always as predicted.

Firstly, in agreement with our prediction, we found a significant three-way interaction between parasite prevalence, dominance status and infection status on mortality. However, this result did not reflect a difference in parasite-mediated mortality since both subordinates and dominants died in similar numbers when infected, regardless of the infection status of others in the flock. In our all uninfected control cages, we found that dominant birds were more likely to die than subordinate birds. Interestingly, the only conditions under which we found that dominants would have better survival than subordinates in the same flock was in dominant uninfected / subordinate infected cages. That dominant birds fared worse, even in

our control cages, suggests that dominants paid a higher cost of the food restriction than subordinates.

Mortality rate of infected birds was high in this study. Previous work on *Plasmodium relictum* infected canaries has revealed a mortality rate as high as 48% (McCutchan et al. 2004). Using the same parasite population inoculated at the same dose (1×10^6) in ad libitum fed canaries, we have found a 28% mortality rate (Cellier-Holzem et al. submitted). The substantially higher mortality rate observed in this study is therefore the result of the additive effect of infection and food restriction. To corroborate the idea that the food restriction contributed to generate some mortality, about 25% of birds died in the non-infected groups. It is important to note we are confident that we provided a sufficient amount of food for each cage, and that dominant birds did not simply starve to death. There was always some spare seed when food was replaced (pers obs), dominant birds were better able to monopolise the food resource than were subordinates even after the infection, and we found no differences in loss of body mass between subordinates and dominants. We are also confident that this mortality does not reflect generally poor housing conditions since we had several other cages in the same aviary where non-infected canaries received ad libitum seed access, and observed no mortality. As such our high rates of mortality, even in uninfected birds probably reflect the cost of competition for the reduced seed quantity. It is interesting that in spite of this apparent cost of dominance with experimentally increased competition (and others discussed below) that dominant birds did not change their social position throughout the experiment, since changes in social status in relation to infection status have been reported in previous studies (Lindstrom, 2004). If the birds were unable to change, it is possible that the behaviors measured in this study represent “behavioral syndromes”: behavioral patterns consistent across a range of contexts, even in situations where such a behavioral strategy is maladaptive (Sih and Bell 2008). It is important to note that in this study we observed male canaries only,

an unlikely natural situation, in order to avoid complicated pair-bonds and inter-gender competition. However, this may have resulted in the observation of apparently maladaptive behavioral strategies, which could be adaptive in other social contexts (e.g. access to reproduction, differential costs of competition between males and females).

Although assessing differences in mortality offers the ultimate costs incurred by each bird, it does not reveal the proximate causes of death that may still differ between individuals. In our study, we used *Plasmodium* parasites to infect birds, and one readily identifiable consequence of malarial infection is the destruction of red blood cells. Comparing patterns of change in haematocrit, the proportion of red blood cells in a given quantity of blood, thus offers a good approximation of specific costs of infection in canaries (Spencer et al. 2005). As predicted, again we found that social status, parasite prevalence, and infection status interacted to significantly affect changes in haematocrit. In this case, our results were close to our initial predictions (Figure 1): infected dominant birds had a greater cost of infection (further reduced haematocrit) when competing with uninfected subordinates, than with infected subordinates. This makes sense, since the competitive ability of subordinates is also impaired by infection, lessening the impacts of a reduction in competitive ability for infected dominant birds. However, in subordinate birds, the opposite was true: we found a reduced change in haematocrit for infected subordinate birds competing with non-infected dominants, than for those competing with infected dominants. That is, infected subordinates paid a higher cost when competing with infected dominants.

It is unclear exactly why this should be, certainly, we did not find that infected dominant birds became more aggressive towards subordinate birds. On the contrary, there was actually a small decrease in aggression in infected dominant birds competing with infected subordinates, and there was no difference in primary access to feeders during our observation

periods between birds. However, it is possible that overall seed consumption may have been higher in +/+ cages if the infection modified food requirements. Whatever the reason for this difference, we demonstrate here for the first time in a vertebrate species that parasite virulence is dependent on both social status and parasite prevalence.

It is interesting to speculate as to why some of our predictions were not upheld in our results. Our pre-experimental predictions were largely based on assumptions about differences in competitive ability between dominant and subordinate birds, and the effects these would have on prevalence-dependent costs of parasite virulence (Bedhomme et al. 2005). However, there are other differences between dominant and subordinate birds, which may function to affect parasite virulence in addition to, or instead of the ability to access food resources. Although subordinate and dominant birds differ in behavior, there is mounting evidence that they can also differ in their physiology. For example, it is known that differences in social rank may be associated with differences in endocrinology (Goymann and Wingfield 2004). In birds for example, dominant and subordinate birds are known to have differences in circulating levels of androgens, or glucocorticoid stress hormones, often with higher levels of hormones with apparently harmful secondary effects in dominant birds than subordinates (e.g. Goymann et al. 2004; Goymann and Wingfield 2004). This “social stress”, the physiological cost to apparently beneficial social ranking, may actually result in dominant birds paying higher costs of infection, than subordinates. This is balanced against their increased ability to obtain resources such as mating, or food when achieving a dominant rank. Intriguingly, immune-responsiveness may also depend on social status, with some studies reporting dominant individuals as having a better immune response than subordinates (e.g. in goats, Ungerfeld and Correa 2007), and others reporting subordinates as having a higher investment in immune responsiveness than dominants (e.g. in voles, Li et al. 2007). In house finches, Hawley et al. (2007), demonstrated that dominant and subordinate house finches

(*Carpodacus mexicanus*) differ in their responsiveness to various immune challenges, though dominant males were better able to resist an experimental infection with *Mycoplasma* than subordinates. We found no difference in maximal intensity of infection, or in mortality rate, between infected subordinates and dominants. However, we did find there was a significant interaction between the maximum intensity of infection and dominance status on mortality. This appears to show that for a given intensity of infection, dominant birds were always more likely to die than subordinates, except at very low intensities. Above a threshold value of intensity no dominant birds survived, whereas some subordinate birds survived even with extremely high intensity of infection. We suggest this might provide evidence of a cost of dominance in canaries, possibly mediated by a differential tolerance to the infection (Schneider and Ayres 2008; Reid et al. 2008). Elucidating the mechanism for this differential tolerance will represent an interesting challenge for the future.

It is clear from our results that for organisms with complex social hierarchies the interactions infection, social status and the prevalence of infection in the flock are likely to be multifaceted. We found strong evidence that a specific cost of infection, change in haematocrit, was modified by a bird's social status, and the infection status of competitors. This represents the first test of the interaction between social rank and parasite-prevalence dependent costs of infection. Additionally, we demonstrated that social rank can also affect infection tolerance, with subordinate individuals appearing more tolerant of *Plasmodium* infection than dominants. This has important implications for our future understanding of the evolutionary processes that shape both parasite virulence, and group living.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Région Bourgogne, the CNRS (Programme MIE) and the ANR (IRMAL).

References

- Alizon, S., A. Hurford, N. Mideo, and M. Van Baalen. 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* 22:245-259.
- Bedhomme, S., P. Agnew, C. Sidobre, and Y. Michalakis. 2004. Virulence reaction norms across a food gradient. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:739-744.
- Bedhomme, S., P. Agnew, Y. Vital, C. Sidobre, and Y. Michalakis. 2005. Prevalence-dependent costs of parasite virulence. *Plos Biology* 3:1403-1408.
- Brown, M. J. F., R. Loosli, and P. Schmid-Hempel. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91:421-427.
- Hawley, D. M., C. S. Jennelle, K. V. Sydenstricker, and A. A. Dhondt. 2007. Pathogen resistance and immunocompetence covary with social status in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Functional Ecology* 21:520-527.
- Ferguson, H. M., and A. F. Read. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1217-1224.
- Fridolfsson, A. K., and H. Ellegren. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30:116-121.
- Goymann, W., and J. C. Wingfield. 2004. Allostatic load, social status, and stress hormones - The costs of social status matter. *Hormones and Behavior* 46:130-130.

- Grech, K., K. Watt, and A. F. Read. 2006. Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1620-1630.
- Hawley, D. M. 2006. Asymmetric effects of experimental manipulations of social status on individual immune response. *Animal Behavior* 71:1431-1438.
- Hawley, D. M., K. Lindstrom, and M. Wikelski. 2006. Experimentally increased social competition compromises humoral immune responses in house finches. *Hormones and Behavior* 49:417-424.
- Hochberg, M. E. 1998. Establishing genetic correlations involving parasite virulence. *Evolution* 52:1865-1868.
- Jokela, J., C. M. Lively, J. Taskinen, and A. D. Peters. 1999. Effect of starvation on parasite-induced mortality in a freshwater snail (*Potamopyrgus antipodarum*). *Oecologia* 119:320-325.
- Koprivnikar, J., M. R. Forbes, and R. L. Baker. 2008. Larval amphibian growth and development under varying density: are parasitized individuals poor competitors? *Oecologia* 155:641-649.
- Lefevre, T., M. Sanchez, F. Ponton, D. Hughes, and F. Thomas. 2007. Virulence and resistance in malaria: who drives the outcome of the infection? *Trends in Parasitology* 23:299-302.
- Li, F. H., W. Q. Zhong, Z. X. Wang, and D. H. Wang. 2007. Rank in a food competition test and humoral immune functions in male Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Physiology & Behavior* 90:490-495.

- Lindstrom, K. M. 2004. Social status in relation to Sindbis virus infection clearance in greenfinches. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:236-241.
- McCutchan, T. F., K. C. Grim, J. Li, W. Weiss, D. Rathore, M. Sullivan, T. K. Graczyk et al. 2004. Measuring the effects of an ever-changing environment on malaria control. *Infection and Immunity* 72:2248-2253.
- Pagan, I., C. Alonso-Blanco, and F. Garcia-Arenal. 2009. Differential Tolerance to Direct and Indirect Density-Dependent Costs of Viral Infection in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Pathogens* 5.
- Parisot, M., L. Nagle, E. Vallet, and M. Kreutzer. 2004. Dominance-related foraging in female domesticated canaries under laboratory conditions. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 82:1246-1250.
- Read, A. F., A. L. Graham, and L. Raberg. 2008. Animal Defenses against Infectious Agents: Is Damage Control More Important Than Pathogen Control? *Plos Biology* 6:2638-2641.
- Schneider, D. S., and J. S. Ayres. 2008. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature Reviews Immunology* 8:889-895.
- Schwabl, H. 1996. Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 114:271-276.
- Sih, A., and A. M. Bell. 2008. Insights for behavioral ecology from behavioral syndromes. *Advances in the Study of Behavior*, Vol 38 38:227-281.

Spencer, K. A., K. L. Buchanan, S. Leitner, A. R. Goldsmith, and C. K. Catchpole. 2005.

Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272:2037-2043.

Tseng, M. 2006. Interactions between the parasite's previous and current environment mediate the outcome of parasite infection. *American Naturalist* 168:565-571.

Ungerfeld, R., and O. Correa. 2007. Social dominance of female dairy goats influences the dynamics of gastrointestinal parasite eggs. *Applied Animal Behavior Science* 105:249-253.

Figures and Tables

Table 1 Output from GLM testing effects of infection treatment, dominance status, parasite prevalence and their interactions on mortality.

<i>Sources of Variation</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>
Dominance	4.10	0.0429
Infection	10.29	0.0013
Parasite prevalence	0.46	0.4960
Dominance * Infection	0.05	0.8190
Dominance *Parasite prevalence	1.23	0.2677
Infection *Parasite prevalence	0.0	0.9623
Dominance*Infection*Parasite prevalence	4.90	0.0269

Table 2 Output from GLM testing effects of infection treatment, dominance status, parasite prevalence and their interactions on the change in haematocrit.

<i>Sources of Variation</i>	<i>X²</i>	<i>P</i>
Dominance	0.08	0.77
Infection	142.86	< 0.0001
Parasite prevalence	1.36	0.0003
Dominance * Infection	5.69	0.017
Dominance *Parasite prevalence	1.36	0.24
Infection *Parasite prevalence	6.49	0.011
Dominance*Infection*Parasite prevalence	4.64	0.0312

Table 3 Output from GLM testing effects of infection treatment, dominance status, parasite prevalence and their interactions on the change in aggressive behavior.

<i>Sources of Variation</i>	X^2	<i>P</i>
Dominance	2.71	0.0995
Infection	0.01	0.9242
Parasite prevalence	0.51	0.4749
Dominance * Infection	0.05	0.8176
Dominance *Parasite prevalence	0.05	0.8173
Infection *Parasite prevalence	0.16	0.6876
Dominance*Infection*Parasite prevalence	7.22	0.0072

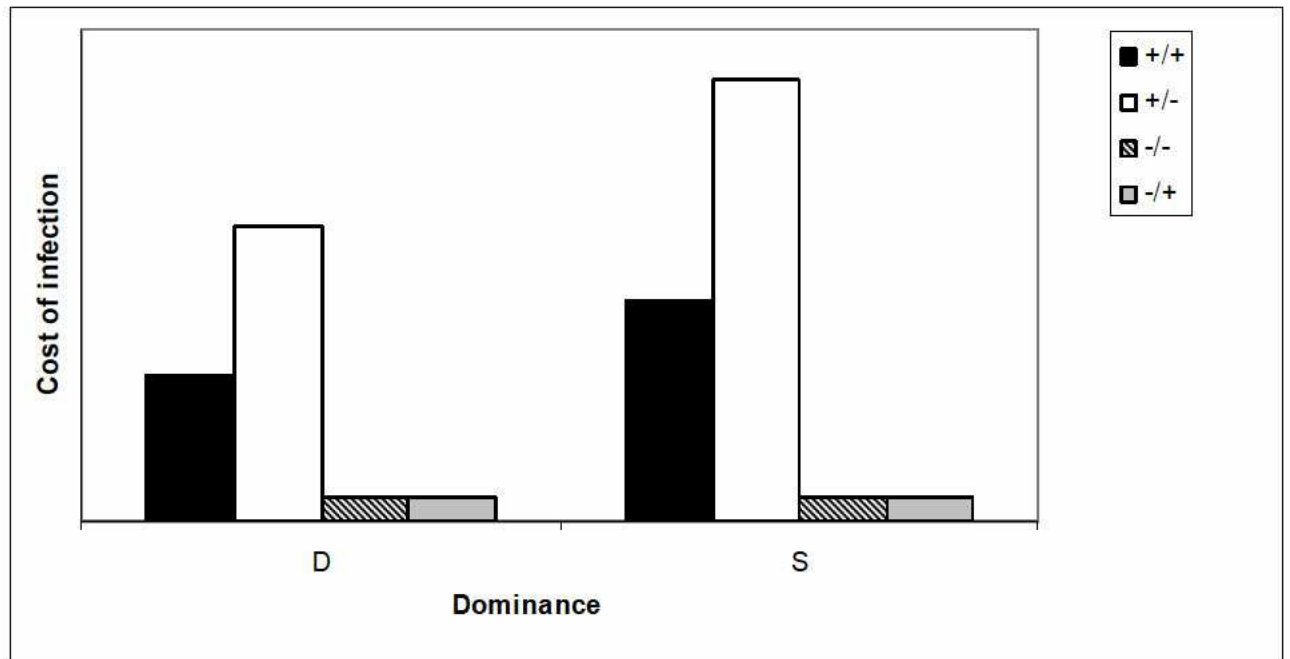


Fig. 1: Predicted cost of infection. Bars are divided between dominants (D) and subordinates (S). The legend describes the infection treatment of both the focal bird (first), and the infection treatment of birds of the opposite dominance status (second) within the cage e.g. D +/-: Dominant infected birds, caged with Subordinate non-infected birds, S +/-: Subordinate infected birds caged with Dominant non-infected birds. Shared color of the bars does not indicate birds housed together. Black bars represent all infected birds (+/+); Hatched bars represent all non-infected birds (-/-); White bars represent the infected birds in cages with mixed infection prevalence flocks (+/-); Grey bars represent the non-infected birds in mixed infection prevalence flocks (-/+).

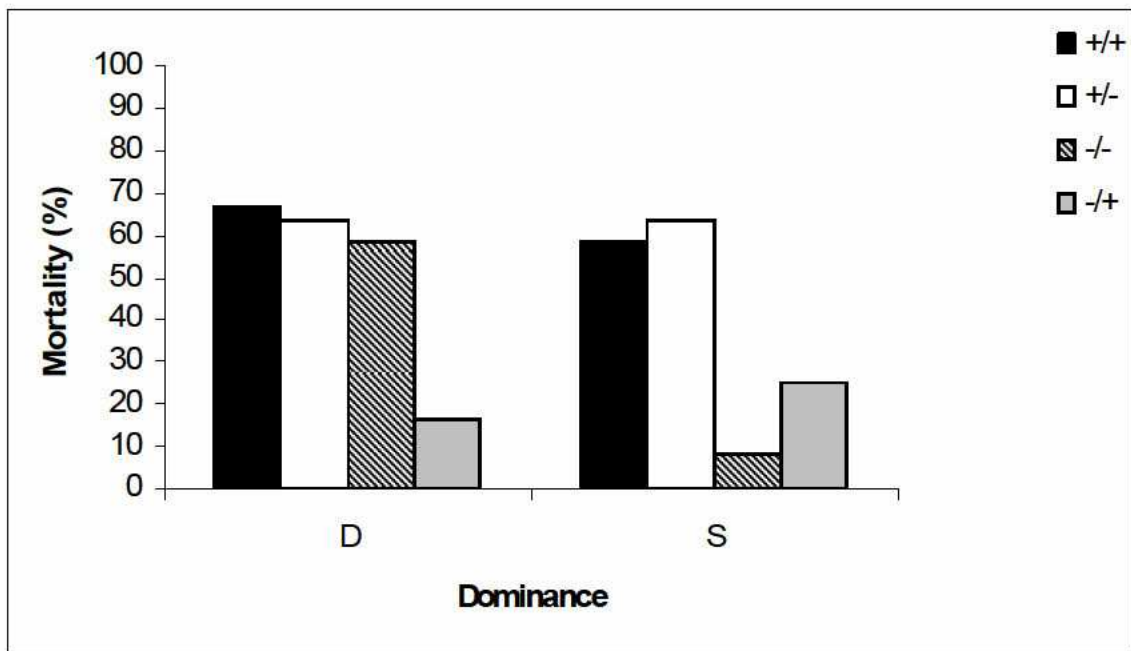


Fig. 2: Mortality (expressed as percentage) for all birds. Bars are divided between dominants (D) and subordinates (S). The legend describes the infection treatment of both the focal bird (first), and the infection treatment of birds of the opposite dominance status (second) within the cage e.g. D +/-: Dominant infected birds, caged with Subordinate non-infected birds.

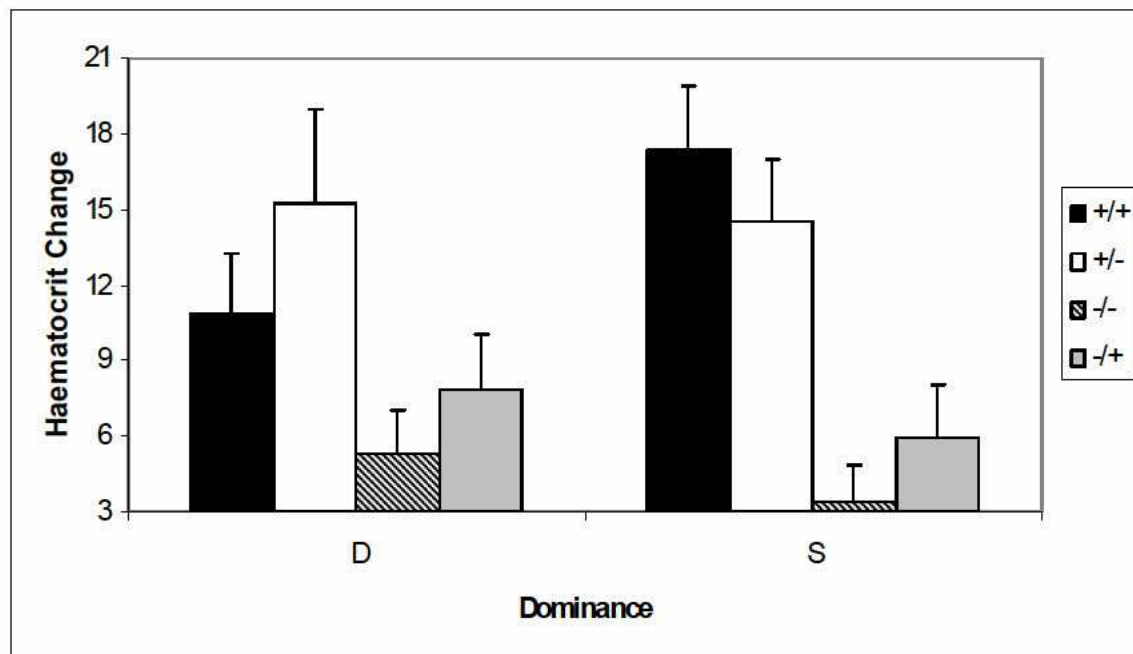


Fig. 3: The maximal change in haematocrit for all birds, across the course of the experiment. Bars are divided between dominants (D) and subordinates (S). The legend describes the infection treatment of both the focal bird (first), and the infection treatment of birds of the opposite dominance status (second) within the cage e.g. D +/-: Dominant infected birds, caged with Subordinate non-infected birds.

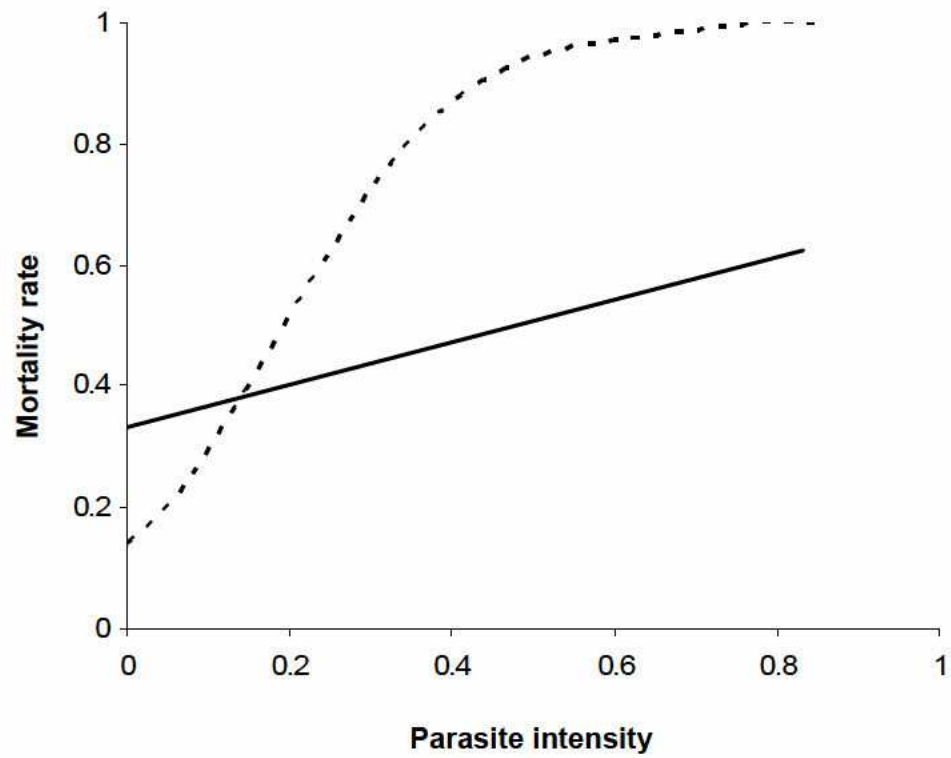


Fig. 4: Predicted probability of mortality of infected dominant and subordinate birds across a range of maximal intensities of infection. The dashed line represents dominant birds, and the solid line represents subordinate birds.

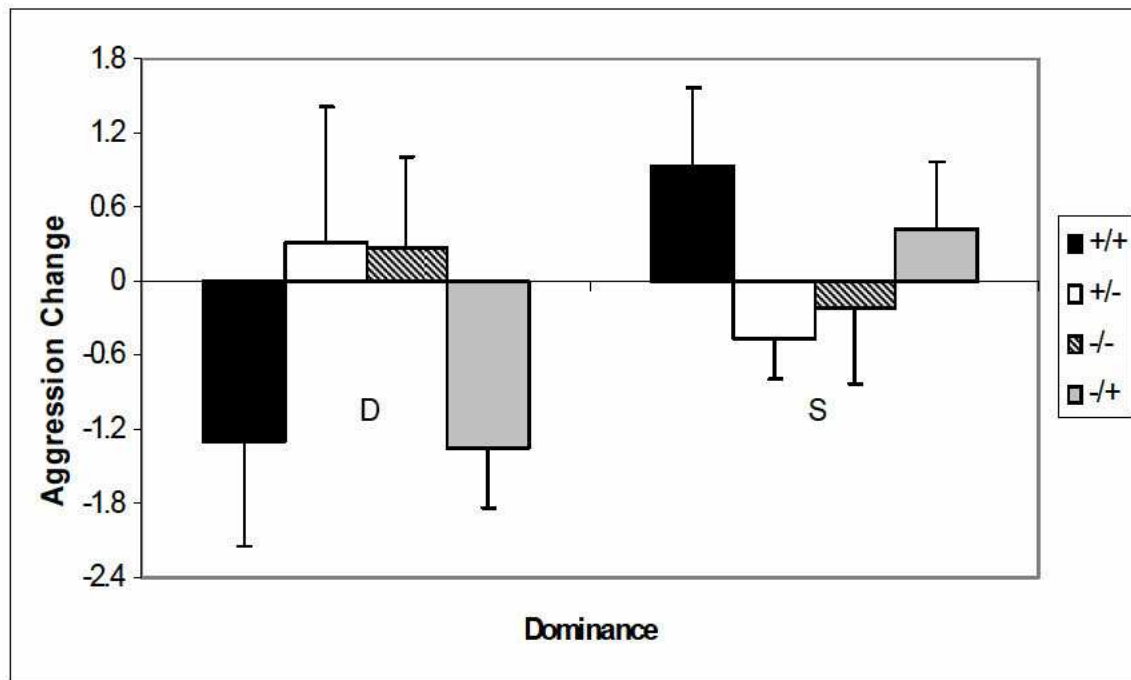


Fig. 5: The change in aggressive behavior for all birds, across the course of the experiment.

Bars are divided between dominants (D) and subordinates (S). The legend describes the infection treatment of both the focal bird (first), and the infection treatment of birds of the opposite dominance status (second) within the cage e.g. D +/-: Dominant infected birds, caged with Subordinate non-infected birds.

Annexe 5

Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Le Hô, M., Brenier, M., Garnier, S. and Sorci, G.
Immunopathology and the virulence of avian malaria. *Submitted to Proceeding of the Royal Society of London-B.*

Immunopathology and the virulence of avian malaria

Elise Cellier-Holzem, Rodrigo Esparza-Salas, Mewen Le Ho, Marie Brenier, Stéphane Garnier and Gabriele Sorci

Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel 21000 DIJON

Corresponding author:

Elise Cellier-Holzem

Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR 5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France. Tel: +33 681175979

Email address: Elise.Cellier-Holzem@u-bourgogne.fr

Abstract

Parasites are known to exert strong selection pressures on their hosts and, as such, favour the evolution of defence mechanisms, such as the immune system. However, immune responsiveness can also generate costs that can add up to the direct effect of host exploitation to determine parasite virulence. Disentangling the immunopathology cost from the direct exploitation cost has important consequences for our understanding of the evolution of parasite virulence and host defences. Here, we used an experimental approach to assess the immunopathology cost paid by domestic canaries infected with the avian malaria parasite *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). We compared the infection-induced cost in canaries that were experimentally immunosuppressed [by injecting them with the immunosuppressive drug Cyclophosphamide (Cy)] or kept as control. Cost of infection in immunocompetent hosts results from the combined effect of immunopathology and host exploitation; whereas immunosuppressed canaries should mostly pay the direct exploitation cost. Confirming that our immunosuppression treatment was effective, we found that parasite intensity was higher in Cy hosts compared to controls. However, when controlling for parasite intensity, we found that control hosts paid a substantially higher cost both in terms of reduction in haematocrit and mortality. These results show that immunopathology is an important component of avian malaria virulence. Environmentally-driven changes in host immunocompetence can, therefore, directly affect the expression of parasite virulence and possibly its evolution.

Keywords: cost of infection, immunopathology, immunosuppression, *Plasmodium relictum*, virulence.

Introduction

Parasite virulence is usually defined as the fitness cost paid by infected hosts (Frank 1996; Poulin & Combes 1999). Parasite multiplication within the host requires energetic resources that are no longer available for the vital functions of the host. It is often assumed, therefore, that parasite virulence is a direct consequence of parasite multiplication (Lenski & May 1994); parasite strains with the highest replicative potential being the most virulent (Timms *et al.* 2001; Ferguson *et al.* 2003; Mackinnon & Read 2004). In many cases, however, cost of infection is not a simple function of parasite density. Indeed, parasites can interfere with many aspects of host physiology. They may for instance release toxin that improve the likelihood of successful establishment of the infection, and such toxin may act as major determinants of cost of infection (McKerrow *et al.* 1993; Salcedo & Holden 2005; Belyi *et al.* 2006).

Upon entering the host, parasites also elicit a range of defences, including the immune response. Immune defences are, of course, essential for host resistance to infection. Permanently immunosuppressed organisms suffer from high risk of infection and mortality (Loa *et al.* 2002; Reisen *et al.* 2003). Despite the benefits of immune protection, there exists a large amount of individual variability in the strength, timing and specificity of the immune response (Schmidt-Hempel 2003). Among individual variation in immune protection can be explained by the fact that immune defences do not come without cost. Mounting the immune response requires metabolic resources and energy that are consequently no longer available for other host functions (e.g. reproduction (Bonneaud *et al.* 2003; French *et al.* 2007) or growth (Soler *et al.* 2003)). In addition to the energetic cost, mis-directed and over reacting immune response can generate substantial immunopathological damage to the host (Sorci & Faivre 2009). Therefore, cost of infection is likely to be the result of the combined effects of direct host exploitation by the parasite and the cost of mounting the immune response.

Decomposing the cost of infection can explain why many parasitic infections do not show a simple relationship between multiplication and virulence (Graham *et al.* 2005a). Moreover, depending on the specific system, immunopathology costs can exceed the direct exploitation costs. In these systems, parasite virulence is therefore essentially driven by an over-reacting immune response (Kobasa *et al.* 2007; Zampieri *et al.* 2007). This sets the scene for a possible coevolutionary scenario where host exploitation evolves in response to the damage induced by the immune response.

In spite of the potential interest of disentangling the different components of cost of infection, to our knowledge this has been achieved in a handful of studies, mostly involving model species in laboratory conditions (Garside *et al.* 2000; Sakaguchi 2000; Graham *et al.* 2005b; Long *et al.* 2008). Here, we aimed to assess both host exploitation and immunopathology costs paid by avian hosts infected by the malaria parasite *Plasmodium relictum*.

Haemosporidia are widespread parasites of vertebrates, and include one of the most deadly human parasites (*Plasmodium falciparum*). Avian malaria occurs in a large range of host species, often at high prevalence (Valkiūnas 2005). Cost of infection has been assessed experimentally for a few host species under controlled laboratory conditions (Spencer *et al.*, 2005; Palinauskas *et al.* 2008; Zehindjiev *et al.* 2008; Cellier-Holzem *et al.* in press) and in the field using medication experiments (Merino *et al.* 2000; Marzal *et al.* 2005). Although such studies have stressed that infection is costly for the host in terms of survival and reproduction, it is still unknown whether these costs are solely the consequence of host exploitation by the parasite. Using an experimental approach that allowed us to reduce the immune responsiveness of canaries experimentally infected with *P. relictum*, we were able to assess the cost of infection in control and immunosuppressed birds. If the cost of infection is merely due to parasite multiplication, we predict that immunosuppressed birds should pay a

higher cost (because they should suffer from exacerbated parasite intensities). When controlling for differences in parasite intensities, we expect no difference between immunosuppressed and control birds. On the contrary, if immunopathology contributes to the cost of infection we expect that, when controlling for parasite intensity, immunosuppressed birds should pay a smaller cost than controls.

Materials and methods

Parasite collection and identification

Parasites used for the experimental infections were obtained from a natural population of house sparrows (*Passer domesticus*) in Dijon, France. We captured birds using mist nets in October 2007 and collected 20 to 40 µl of blood by brachial vein puncture. Blood was preserved in 500µl of Queen's Lysis Buffer (QLB) (Seutin *et al.* 1991) for subsequent molecular analyses. Sparrows were kept three days in large aviaries until obtaining their infectious status.

DNA was extracted using standard phenol/chloroform protocol (modified from Hillis *et al.* 1996). In order to detect the presence of malaria parasites of the genus *Plasmodium* and *Haemoproteus*, we used a nested polymerase chain reaction (PCR) (Waldenström *et al.* 2004) to amplify a fragment of the parasite mitochondrial cytochrome b gene. We identified the parasite strain by sequencing PCR products and blasting these sequences in GenBank using the algorithm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Approximately 200 µl of blood were collected from house sparrows infected with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). The blood was directly transferred intraperitoneally to 8 domestic canaries, using 0.5 ml insulin syringes, in order to increase parasite intensity. Eleven days after infection, we measured haematocrit of these 8 birds and prepared blood smears by spreading a drop of blood of each bird on a glass slide for microscopic

examination. These blood smears were fixed with absolute methanol and coloured with 10% Giemsa solution (Sigma-Aldrich). We counted the number of asexual infectious stages of the parasite observed in a total of 10,000 erythrocytes. Parasite intensities and haematocrit allowed us to evaluate the number of parasites in 1 μ l of blood for each bird (a haematocrit of 50% corresponds approximately to 5,000,000 erythrocytes per microliter of blood).

Among the 8 canaries infected, we chose the four most parasitized as donors. We collected blood of donors and pooled the 4 blood samples which were subsequently diluted in 0.9% NaCl solution as to obtain a parasite dose of one million per inoculum for subsequent infections (see experimental design).

Experimental design

None of the canaries used in the experiments harboured haemosporidians prior to the experimental infection, as confirmed by qPCR (see below). At the start of the experiment, all canaries were body weighed ($\pm$ 0.1g), and 20 μ l of blood were collected to measure haematocrit.

a. Experimental infections

Canaries were experimentally infected with an intraperitoneal injection of 50 μ l of a suspension containing 1×10^6 *P. relictum* parasites. Control, non-infected, canaries received an injection of 50 μ l of 0.9% NaCl solution. Previous work has shown that injecting non infected blood does not affect canary body mass and haematocrit (Cellier-Holzem *et al.* in press); therefore we decided to use a NaCl solution injection as to control for the handling and injection stress.

b. Suppressing the immune response

The immune response of experimental canaries was suppressed by the mean of an injection of cyclophosphamide monohydrate (Cy) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cy is a nitrogen mustard alkylating agent which slows down and stops cellular growth and division. Cy has known immunosuppressive properties both in mammals and birds, depleting B lymphocytes and suppressing humoral immunity (Lerman & Weidanz 1970; Glick 1971; Hiraga *et al.* 1976; Hemendinger & Bloom 1996). We used two Cy doses (50 and 100 mg/kg), based on published work on poultry (Russell *et al.* 1997; Muroga *et al.* 2006). Cy was dissolved in sterile 0.9% NaCl solution, and birds received a single dose of the drug during the experiment. Control birds received an injection of 0.9% NaCl solution.

The injection of Cy occurred at two different time points, with respect to the parasite infection. One group of birds was injected with Cy three days prior the experimental infection; another group was injected with Cy three days after the experimental infection. This design allowed us to explore the effect of the timing of Cy injection on parasite intensities and the cost paid by the host.

Overall, 119 canaries were used in this study, distributed over 9 experimental groups, as summed up in table 1. Three groups of canaries received one million parasites at first and a dose of Cy (100, 50 or 0 mg/kg for each group respectively) 3 days after. Three other groups received a dose of Cy (as above) at first and one million parasites 3 days after. Finally, three control groups received just a dose of Cy while not being exposed to the parasite.

At days 5, 8, 11, 14 and 17 days post-infection (p.i.), we recorded body mass and haematocrit of each bird. Twenty microliters of blood were also collected and stored in QLB for subsequent assessment of parasite intensities.

Assessing parasite intensities

Parasite intensities were obtained using the quantitative PCR assay developed by Esparza-Salas et al. (unpublished). For each individual, we conducted two qPCR reactions in the same run: one targeting the nuclear 18s rDNA gene of *Plasmodium* (Primers 18sPlasm7 5'-AGC CTG AGA AAT AGC TAC CAC ATC TA-3', 18sPlasm8 5'-TGT TAT TTC TTG TCA CTA CCT CTC TTC TTT-3', and fluorescent probe Plasm Hyb2 5'-6FAM-CAG CAG GCG CGT AAA TTA CCC AAT TC-BHQ1-3') and the other targeting the 18s rDNA gene of bird (Primers 18sAv7 5'-GAA ACT CGC AAT GGC TCA TTA AAT C-3', 18sAv8 5'-TAT TAG CTC TAG AAT TAC CAC AGT TAT CCA-3' and fluorescent probe 18sAv Hyb 5'-VIC-TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC-BHQ1-3').

Parasite intensities were calculated as relative quantification values (RQ) as $2^{-(Ct_{18s Plasmodium} - Ct_{18s Bird})}$ using the software SDS 2.2 (Applied Biosystem). Ct represents the number of PCR cycles at which fluorescence is first detected as statistically significant above the baseline, which is inversely correlated with the initial amount of DNA in a sample. RQ can be interpreted as the fold-amount of target gene (*Plasmodium* 18s rDNA) with respect to the amount of the reference gene (host 18s rDNA). All qPCR reactions were run on an ABI 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystem). With this method we were able to detect a minimum of 6.7 copies of 18s rDNA of *Plasmodium*, minimizing the risk of false negatives.

Statistical analyses

Changes in parasite intensity, host body mass, and haematocrit were analyzed using linear mixed models. Given the repeated nature of the data, individual identity was always included as a random factor in each model. Body mass and haematocrit were analyzed using a normal distribution of errors, whereas for parasite intensity we used a beta distribution. Mortality was analysed with a binomial distribution of errors and a logit link. Degrees of freedom were corrected using the Saittherwaite method.

Finally, we focused on the picks of infection, and compared the effect of Cy on haematocrit and mortality while controlling for differences in parasite intensity (see Råberg *et al.* 2007). This was achieved by comparing the slope relating hematocrit and mortality to parasite intensity among the three Cy doses.

All statistical analyses were performed with SAS (1999).

Results

Infected vs. non-infected birds

Infected birds suffered a clear-cut reduction in haematocrit values compared to non-infected canaries, as shown by the significant time x infection status interaction (table 2, fig. 1). Minimum haematocrit was reached at day 11 p.i. and tended to increase afterwards. Cy administration did not affect the change in haematocrit values neither in infected nor in non-infected birds (table 2).

Body mass tended to increase during the first days p.i. and then to decrease (significant squared time effect, table 3). We found a statistically significant three-way interaction between time, infection status, and Cy dose (table 3); the interaction being mostly driven by birds in the highest Cy dose, where infected birds tended to gain body mass and non-infected individuals to loose mass (fig. 2).

Among infected birds

Haematocrit and body mass

Changes in haematocrit depended on the timing of Cy injection as shown by the significant squared time x timing of Cy injection interaction (table 4). Birds that were injected with Cy prior to the experimental infection showed a steeper drop of haematocrit, followed by

a late recover. On the contrary, birds that were injected with Cy after the experimental infection suffered a less dramatic drop in haematocrit during the early phase of the infection, but had not started to recover at day 17 p.i. (fig 3).

Among infected birds Cy had a positive effect on body mass variation (table 5; fig. 4). Whereas control birds (only injected with the saline) tended to decrease in body mass at the end of the experimental infection, birds injected with Cy tended to increase in body mass, especially so for birds which received the highest dose (fig. 4).

Timing of Cy injection also affected body mass variation (table 5), the increase in body mass being mostly due to birds which received the injection prior to the infection (fig. 5).

Parasite intensity

Cyclophosphamide had a strong effect on parasite intensity variation in the course of time post-infection. Control birds which only received a saline injection, showed a typical bell shaped curve relating parasite intensity to time post-infection (table 6, and fig. 6). On the contrary, birds injected with Cy did not show any decrease in parasite intensity in the late phase of the infection. In particular, birds injected with the highest Cy dose showed a linear increase in parasite intensity during the whole experimental period (fig. 6).

Host exploitation vs. immunopathology

The cost paid by infected hosts is supposed to be a function of host exploitation by the parasite, hosts harbouring higher parasite intensity being those with the highest costs. In agreement with this, we found that both haematocrit and the survival were negatively correlated with parasite intensity at days 14 and 17 p.i. (Haematocrit day 14 p.i.: $F_{1,66} = 21.63$, $p < 0.0001$; haematocrit day 17 p.i.: $F_{1,60} = 15.77$, $p = 0.0002$; mortality day 14 p.i.: $\chi^2 = 23.20$, $p < 0.0001$; mortality day 17 p.i.: $\chi^2 = 3.02$, $p = 0.083$). The predictive power of

mortality decreased when taking intensity at day 17 p.i. because a few birds had already died at that time.

However, the magnitude of the cost induced by parasite multiplication was modulated by the Cy treatment. At constant parasite intensity, birds in the control group suffered more from reduced haematocrit (interaction between parasite intensity and Cy dose: $F_{2,56} = 5.03$, $p = 0.0098$; fig. 7) and increased mortality (interaction between parasite intensity and Cy dose: $\chi^2_2 = 7.07$, $p = 0.029$; fig. 8) than infected birds treated with Cy.

Discussion

We report here, to the best of our knowledge for the first time, that the cost of infection with avian malaria is due to the combined effect of host exploitation (assessed as parasite multiplication) and the activation of the immune response. We have used a novel experimental approach jointly with a statistical tool to disentangle these two components of parasite virulence (Råberg *et al.* 2007). By experimentally suppressing the immune response with an immunosuppressive drug and by comparing the cost paid by hosts at constant parasite intensity, we showed that immunosuppressed hosts were protected from the immunopathology cost and tolerated the infection better (better survival rate and haematocrit values).

Cyclophosphamide has known immunosuppressive properties both in mammals and birds (Calabrese *et al.* 1996; Loa *et al.* 2002; Reisen *et al.* 2003; Pantin-Jackwood *et al.* 2004, Muroga *et al.* 2006, Caldas *et al.* 2008; Zimecki *et al.* 2010). For instance, Cy has been widely used in poultry to achieve non surgical suppression of the Bursa of Fabricius (Desmidt *et al.* 1998; Yeh *et al.* 2002), the bird organ where B lymphocytes mature. In addition, chickens as well as other birds species treated with Cy have exacerbated susceptibility to a range of different pathogens (Desmidt *et al.* 1998; Muroga *et al.* 2006). Our results corroborate these previous findings since we found that Cy-treated birds harboured higher *P.*

relictum intensity. Actually, the difference between Cy-treated and control birds emerged at the end of the infection period (at day 14 – 17 p.i.), whereas during the raising phase of the infection there was no difference between groups. Intensity of malaria parasites usually follow a bell-shaped function, with an early phase of increase followed by a decline (the parasite can then persist in a latent phase at very low intensity or be cleared by the host). The decrease in parasite intensity is driven by the host immune response (Kochin *et al.* 2010). Therefore, our finding of no declining parasite intensity during the late stage of the infection confirms that the treatment was effective in suppressing the immune response to *P. relictum*.

The reasons that make a parasite virulent have attracted considerable attention in the last decade. Parasite virulence is usually defined as the fitness reduction of infected hosts (Frank 1996; Poulin & Combes 1999). However, as mentioned above, such fitness reduction can arise because of the additive or interactive effect of parasite multiplication and the host immune response. Mis-directed and over-reactive immune response in infected hosts is a common source of disease in many host-parasite associations (Garside *et al.* 2000; Hussell *et al.* 2001; Clark *et al.* 2004; Graham *et al.* 2005a). In mice infected with *P. chabaudi* it has been estimated that 10% of the infection-induced anaemia is indeed due to an overreacting immune response (Graham *et al.* 2005b). Here we found that, when keeping parasite intensity constant, about 25% of the reduction in haematocrit was due to the host immune response. The difference between control and Cy-injected birds was even greater when looking at the risk of mortality, suggesting that in this particular system the immunopathology cost can be substantial.

Cyclophosphamide administration also tended to have positive effects on body mass when birds faced a *P. relictum* infection. Body mass of infected birds injected with the highest Cy dose increased and this mostly involved birds that were injected with Cy before the experimental infection with *P. relictum*.

The evolution of immunopathology may appear puzzling since a function that is supposed to provide protection turns out to become harmful. Immunopathology can of course arise as an unavoidable consequence of immune protection. In some host-parasite associations, however, parasites can manipulate the host immune response for their own benefit. Immunopathology can for instance favour parasite establishment or transmission directly improving the fitness of the parasite (Brown *et al.* 2008). In other instances, immunopathology and its associated mortality risk may represent a cost both for the host and the parasite. It seems important, therefore, to consider how cost of immune responsiveness can shape the evolution of parasite virulence. Recent theoretical work has shown that immunopathology can drive the evolution of parasite virulence depending on the relationship between immune-mediated self harm and parasite exploitation (Day *et al.* 2007). When immunopathology occurs independently of the level of host exploitation by the parasite, then the overall infection-induced host mortality is predicted to increase (that is virulence is predicted to increase) because prudent parasites (with low multiplication rate) will anyway suffer from the cost of host mortality due to self harm. On the contrary, when immunopathology is a function of host exploitation, selection should favour prudent parasites because the immunopathology costs will be mostly paid by the highly multiplicative strains. Quantitative data on the relationship between parasite multiplication and the extent of immune-drive self harm are lacking for this system, and therefore it may appear difficult to predict how immunopathology will shape the evolution of virulence in avian malaria parasites. Nevertheless, it seems quite plausible to expect that environmentally-driven changes in immune functioning of the host directly affects the expression of malaria virulence and possibly drives its evolution.

Acknowledgements

We are very grateful to David Bru for his assistance with the quantitative PCR. Financial support was provided by the Région Bourgogne, the ANR IRMAL, and the CNRS program MIE. The experiments were performed under the permit # 21-CAE-085.

References

- Belyi, Y., Niggeweg, R., Opitz, B., Vogelsang, M., Hippenstiel, S., Wilm, M. & Aktories, K. 2006. Legionella pneumophila glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16953-16958.
- Brown, S.P., Le Chat, L. & Taddei, F. 2008. Evolution of virulence: triggering host inflammation allows invading pathogens to exclude competitors. *Ecol. Lett.* **11**, 44-51.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. & Sorci, G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* **161**, 367-379.
- Calabrese, K.S., Lagrange, P.H. & Gonçalves da Costa, S.C. 1996. Chagas' disease: enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. *Int. J. Immunopharmac* **18**, 505-514.
- Caldas, S., Santos, F.M., de Lana, M., Diniz, L.F., Machado-Coelho, G.L.L., Veloso, V.M. & Bahia, L.T. 2008. *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. *Exp. Parasitol.* **118**, 315-323.
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. & Sorci, G. in press. Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *Int. J. Parasitol.*
- Clark, I.A., Allewa, L.M., Mills, A.C. & Cowden, W.B. 2004. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 509-539.

- Day, T., Graham, A.L. & Read, A.F. 2007. Evolution of parasite virulence when host responses cause disease. *Proc. R. Soc. B.* **274**, 2685-2692.
- Desmidt, M., Ducatelle, R., Mast, J., Goddeeris, B.M., Kaspers, B. & Haesebrouk, F. 1998. Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. *Vet. Immunol. Immunop.* **63**, 355-367.
- Ferguson, H.M., Mackinnon, M.J., Chan, B.H. & Read, A.F. 2003. Mosquito mortality and the evolution of malaria virulence. *Evolution* **57**, 2792-2804.
- Frank, S.A. 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* **71**, 37-78.
- French, S.S., Johnston, G.I.H. & Moore, M.C. 2007. Immune activity suppresses reproduction in foot-limited female tree lizards *Urosaurus ornatus*. *Funct. Ecol.* **21**, 1115-1122.
- Garside, P., Kennedy, M.W., Wakelin, D. & Lawrence, C.E. 2000. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunol.* **22**, 605-612.
- Glick, B. 1971. Morphological changes and humoral immunity in cyclophosphamide-treated chicks. *Transplantation* **11**, 433-439.
- Graham, A.L., Allen, J.E. & Read, A.F. 2005a. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **36**, 373-397.
- Graham, A.L., Lamb, T.J., Read, A.F. & Allen, J.E. 2005b. Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *J. Infect. Dis.* **191**, 410-421.
- Hemendinger, R.A. & Bloom, S.E. 1996. Selective mitomycin C and cyclophosphamide induction of apoptosis in differentiating B lymphocytes compared to T lymphocytes in vivo. *Immunopharmacology* **35**, 71-82.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. 1996. *Molecular Systematics, 2nd Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Hiraga, T., Sugimura, M. & Kudo, N. 1976. Effect of cyclophosphamide on the thymus and the bursa of Fabricius in chickens. *Jpn. J. Vet. Res.* **24**, 87–98.
- Hussel, T., Pennycook, A. & Openshaw, P.J.M. 2001. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2566-2573.
- Kobasa, D., Jones, S.M., Shinya, K., Kash, J.C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Kim, J.H., Halfmann, P., Hatta, M., Feldmann, F., Alimonti, J.B., Fernando, L., Li, Y., Katze, M.G., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* **445**, 319-323.
- Kochin, B.F., Yates, A.J., de Roode, J.C. & Antia, R. 2010. On the control of acute rodent malaria infections by innate immunity. *PLOS* **5**, 1-5.
- Lenski, R.E. & May, R.M. 1994. The evolution of virulence in parasites and pathogens: reconciliation between two competing hypotheses. *J. theor. Biol.* **169**, 253-265.
- Lerman, S.P. & Weidanz, W.P. 1970. The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens. *J. Immunol.* **105**, 614-619.
- Loa, C.C., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T., Hooper, T. & Schrader, D. 2002. The effect of immunosuppression on protective immunity of turkey poults against infection with turkey coronavirus. *Comp. Immunol. Microb.* **25**, 127-138.
- Long, G.H., Chan, B.H.K., Allen, J.E., Read, A.F. & Graham, A.L. 2008. Experimental manipulation of immune-mediated disease. *Evol. Biol.* **8**, 1-11.
- Mackinnon, M.J. & Read, A.F. 2004. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* **359**, 965-986.
- Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C. & Møller, A.P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142**, 541-545.

- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J. & Bouvier, J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 821-853.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J.J. & Arriero, E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. S. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* **267**, 2507-2510.
- Muroga, N., Taharaguchi, S., Ohta, H., Yamazaki, K. & Takase, K. 2006. Pathogenicity of fowl adenovirus isolated from gizzard erosions to immuno-suppressed chickens. *J. Vet. Med. Sci.* **68**, 289-291.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C.V. & Bensch, S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Exp. Parasitol.* **120**, 372-380.
- Pantin-Jackwood, M.J., Brown, T.P., Kim, Y. & Huff, G.R. 2004. Proventriculitis in broiler chickens: effects of immunosuppression. *Avian Dis.* **48**, 300-316.
- Poulin, R. & Combes, C. 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today* **15**, 474-475.
- Råberg, L., Sim, D. & Read, A.F. 2007. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* **318**, 812-814.
- Reisen, W.K., Chiles, R.E., Green, E.N., Fang, Y., Mahmood, F., Martinez, V.M. & Laver, T. 2003. Effects of immunosuppression on encephalitis virus infection in the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J. Med. Entomol.* **40**, 206-214.
- Russell, P.H., Dwivedi, P.N. & Davison, T.F. 1997. The effects of cyclosporine A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Harderian gland of chickens vaccinated with the Hitchner strain of Newcastle disease virus. *Vet. Immunol. Immunop.* **60**, 171-185.

- Sakaguchi, S. 2000. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 684-690.
- Salcedo, S.P. & Holden, D.W. 2005. Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 92-98.
- Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc. R., Soc. Lond. B* **270**, 357-366.
- Seutin, G., White, B.N. & Boag, P.T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* **69**, 82-90.
- Soler, J.J., De Neve, L., Perez-Contreras, T., Soler, M. & Sorci, G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc. R., Soc. Lond. B* **270**, 241-248.
- Sorci, G. & Faivre, B. 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**, 71-83.
- Spencer, K.A., Buchanan, K.L., Leitner, S., Goldsmith, A.R. & Catchpole, C.K. 2005. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proc. R. Soc. B* **272**, 2037-2043.
- Timms, R., Colegrave, N., Chan, B.H.K. & Read, A.F. 2001. The effect of parasite dose on severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* **123**, 1-11.
- Valkiūnas, G. 2005. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. & Östman, Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infection from avian blood. *J. Parasitol.* **90**, 191-194.

- Yeh, H.Y., Rautenschlein, S. & Sharma, J.M. 2002. Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies. *Vet. Immunol. Immunop.* **89**, 149-158.
- Zampieri, C.A., Sullivan, N.J. & Nabel, G.J. 2007. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat. Immunol.* **8**, 1159-1564.
- Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiūnas, G. & Bensch, S. 2008. Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Exp. Parasitol.* **119**, 99-110.
- Zimecki, M., Artym, J., Kocieba, M., Weber-Dabrowska, B., Borysowski, J. & Gorski, A. 2010. Prophylactic effect of bacteriophages on mice subjected to chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant upon infection with *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immun.* **199**, 71-79.

Table 1: Number of domestic canaries in the different experimental groups.

Cy dose	Infection status		
	Non-infected	Cy prior to infection	Cy after infection
0 mg/kg	13	13	15
50 mg/kg	13	13	13
100 mg/kg	13	13	13

Table 2. Generalized linear model reporting the effect of infection status and Cy dose on the haematocrit of domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Infection status	1,428	0.01	0.918
Cy dose	2,109.3	1.24	0.293
Time	1,527.3	65.27	< 0.0001
Squared time	1,523	37.75	< 0.0001
Time x infection status	1,527.6	16.86	< 0.0001
Squared time x infection status	1,523.3	4.95	0.027

Table 3. Generalized linear model reporting the effect of infection status and Cy dose on body mass of domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Infection status	1,12.87	0.04	0.844
Cy dose	2,12.87	0.26	0.775
Time	1,524	2.95	0.087
Squared time	1,522.9	5.75	0.017
Time x infection status	1,525.6	10.05	0.002
Time x Cy dose	1,525.4	1.9	0.150
Infection status x Cy dose	12.87	2.84	0.095
Time x infection status x Cy dose	1,525.4	4.07	0.018

Table 4. Generalized linear model reporting the effect of Cy dose and timing of Cy injection on the haematocrit of *P. relictum* infected domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Timing of Cy injection	1,297.6	0.04	0.839
Cy dose	2,73.65	0.48	0.620
Time	1,353.3	88.75	< 0.0001
Squared time	1,350.7	41.73	< 0.0001
Time x Timing of Cy injection	1,353.2	3.45	0.064
Squared time x Timing of Cy injection	1,350.7	5.58	0.019

Table 5. Generalized linear model reporting the effect of Cy dose and timing of Cy injection on the body mass of *P. relictum* infected domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Timing of Cy injection	1,80.56	9.26	0.003
Cy dose	2,70.56	3.20	0.046
Time	1,353.2	6.88	0.009
Squared time	1,352.9	5.36	0.021
Time x Timing of Cy injection	1,353.9	24.20	< 0.0001
Time x Cy dose	1,353.9	9.20	0.0001

Table 6. Generalized linear model reporting the effect of Cy dose and timing of Cy injection on parasite intensity of *P. relictum* infected domestic canaries over the experimental period.

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Timing of Cy injection	1,8.36	2.67	0.139
Cy dose	2,34.6	3.24	0.052
Time	1,237.2	31.32	< 0.0001
Squared time	1,236.7	27.37	< 0.0001
Time x Cy dose	1,243.8	7.39	0.0008

Legend to Figures

Figure 1: Changes in haematocrit values for *P. relictum* infected (black dots) and control (empty dots) domestic canaries over the experimental period. Means $\pm$ SE are reported.

Figure 2: Changes in body mass for *P. relictum* infected (black dots) and non-infected (empty dots) domestic canaries over the experimental period. A), B), and C) refer to the three Cy doses (0 mg/kg, 50 mg/kg, and 100 mg/kg respectively). Means $\pm$ SE are reported.

Figure 3: Changes in haematocrit values for *P. relictum* infected domestic canaries injected with Cy prior to the infection (black squares) or after the infection (empty squares) over the experimental period. Means $\pm$ SE are reported.

Figure 4: Changes in body mass for *P. relictum* infected domestic canaries injected with increasing Cy dose (triangles = 0 mg/kg, dots = 50 mg/kg, squares = 100 mg/kg) over the experimental period. Means $\pm$ SE are reported.

Figure 5: Changes in body mass for *P. relictum* infected domestic canaries injected with Cy prior to the infection (black squares) or after the infection (empty squares) over the experimental period. Means $\pm$ SE are reported.

Figure 6: Changes in *P. relictum* intensity (RQ, relative amount of parasite) in domestic canaries injected with increasing Cy dose (triangles = 0 mg/kg, dots = 50 mg/kg, squares = 100 mg/kg) over the experimental period. Means $\pm$ SE are reported.

Figure 7: Haematocrit of *P. relictum* infected domestic canaries as a function of parasite intensity for the three Cy doses (full line = 0 mg/kg, dashed line = 50 mg/kg, dotted line = 100 mg/kg).

Figure 8: Survival probability of *P. relictum* infected domestic canaries as a function of parasite intensity for the three Cy doses (full line = 0 mg/kg, dashed line = 50 mg/kg, dotted line = 100 mg/kg).

Figure 1.

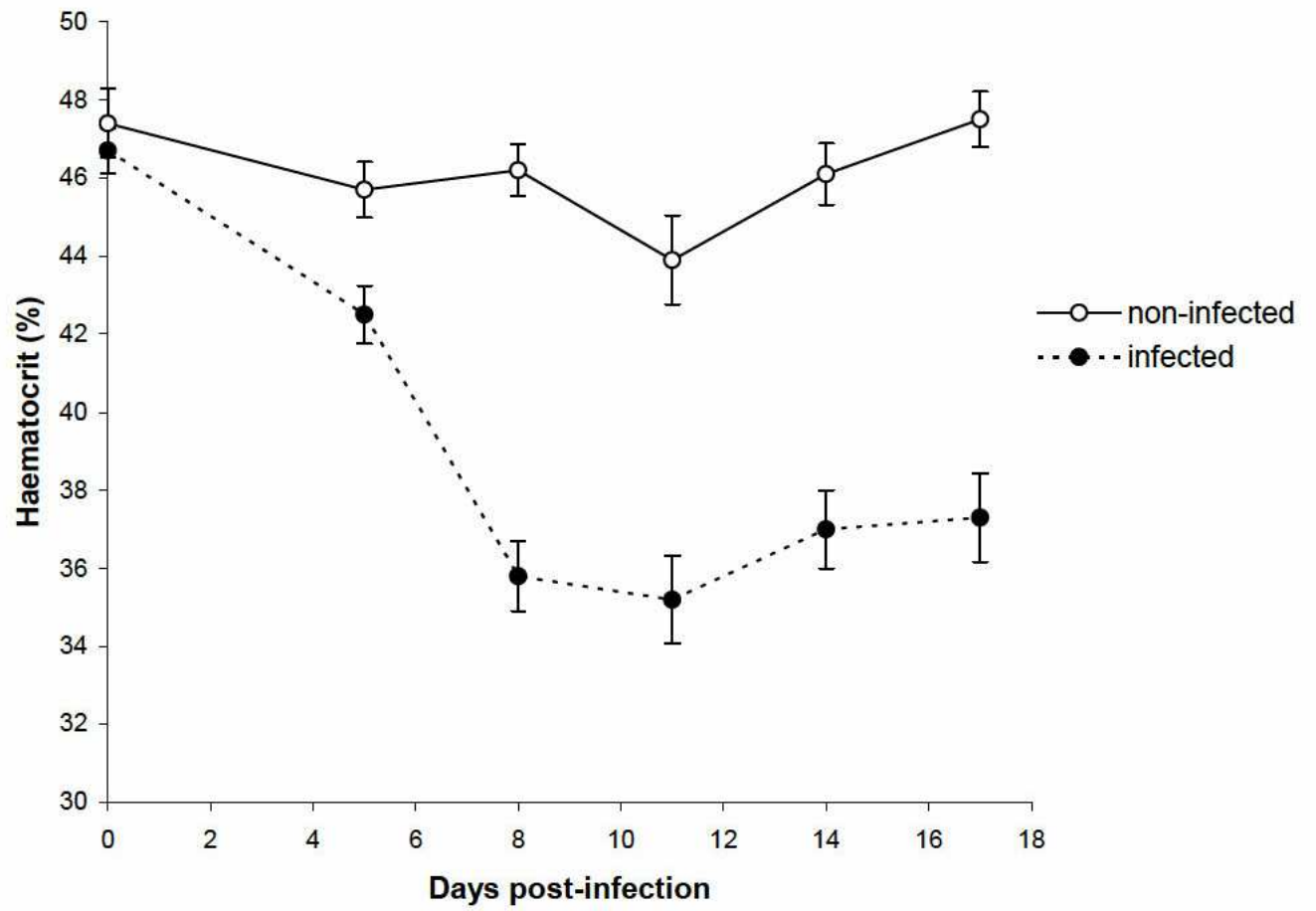
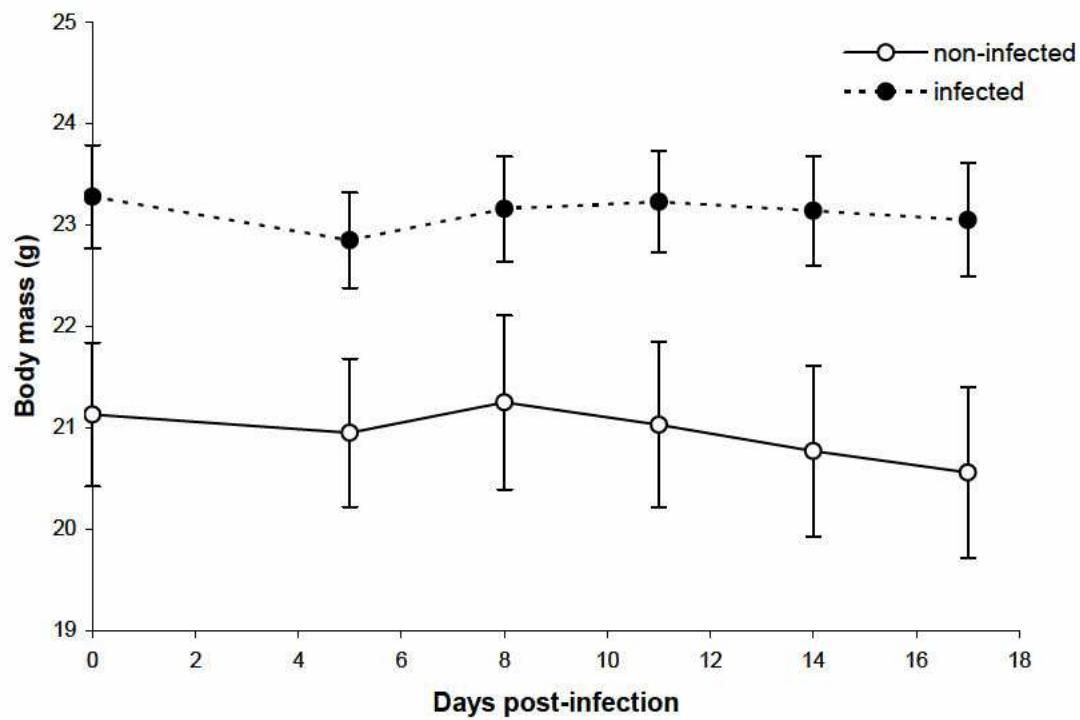
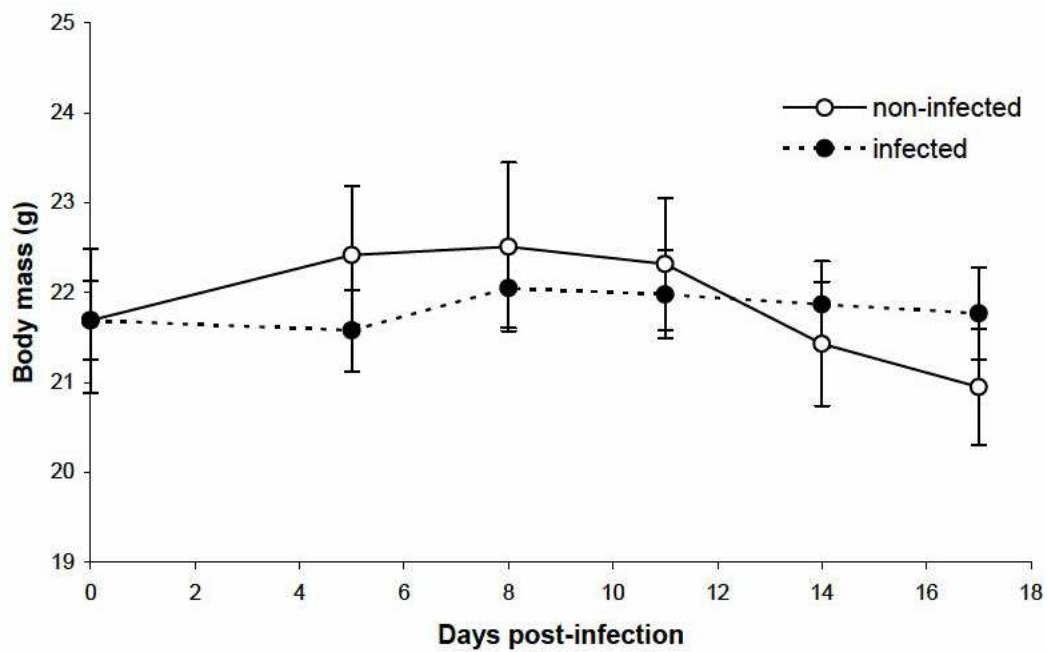


Figure 2.

A) Cy 0 (0mg/kg)



B) Cy 1 (50mg/kg)



C) Cy 2 (100mg/kg)

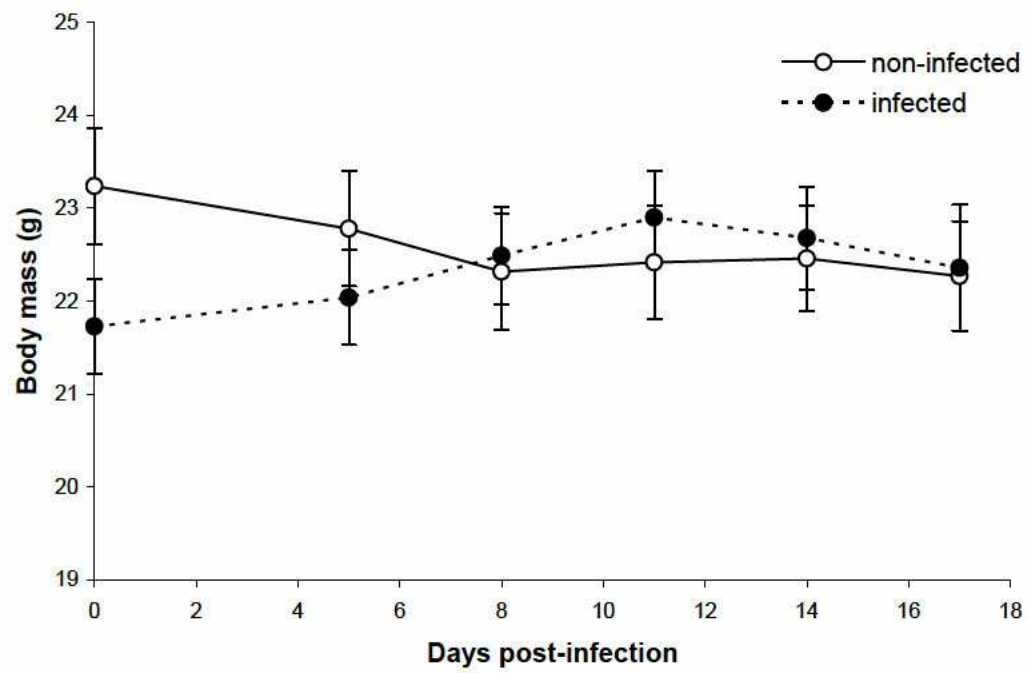


Figure 3.

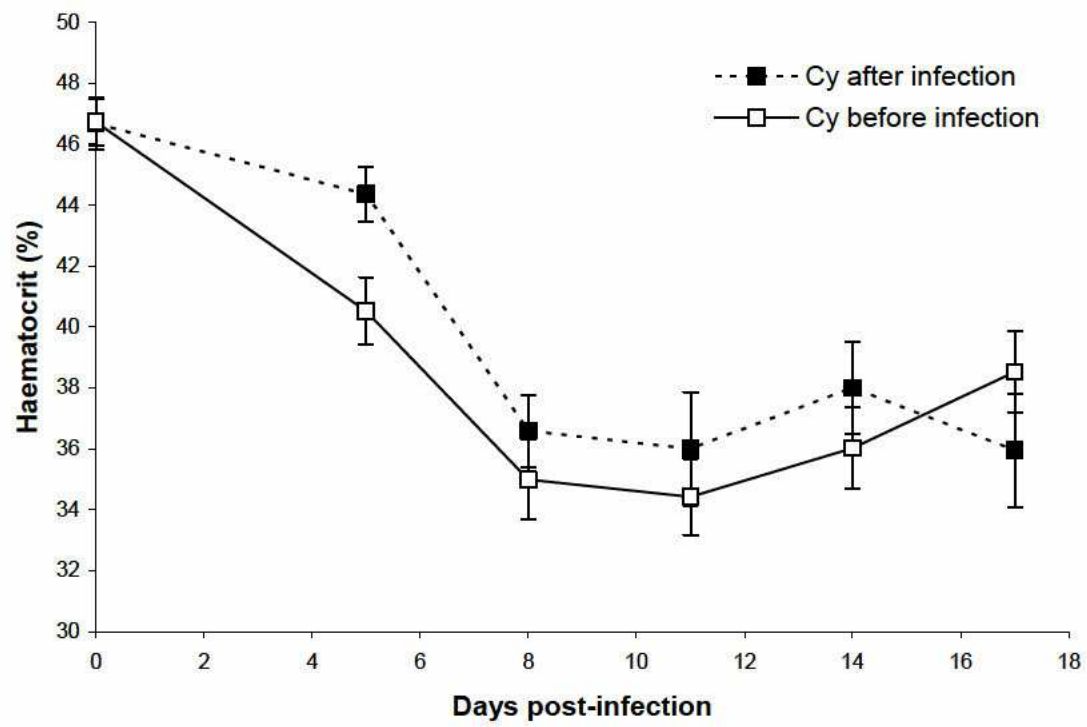


Figure 4.

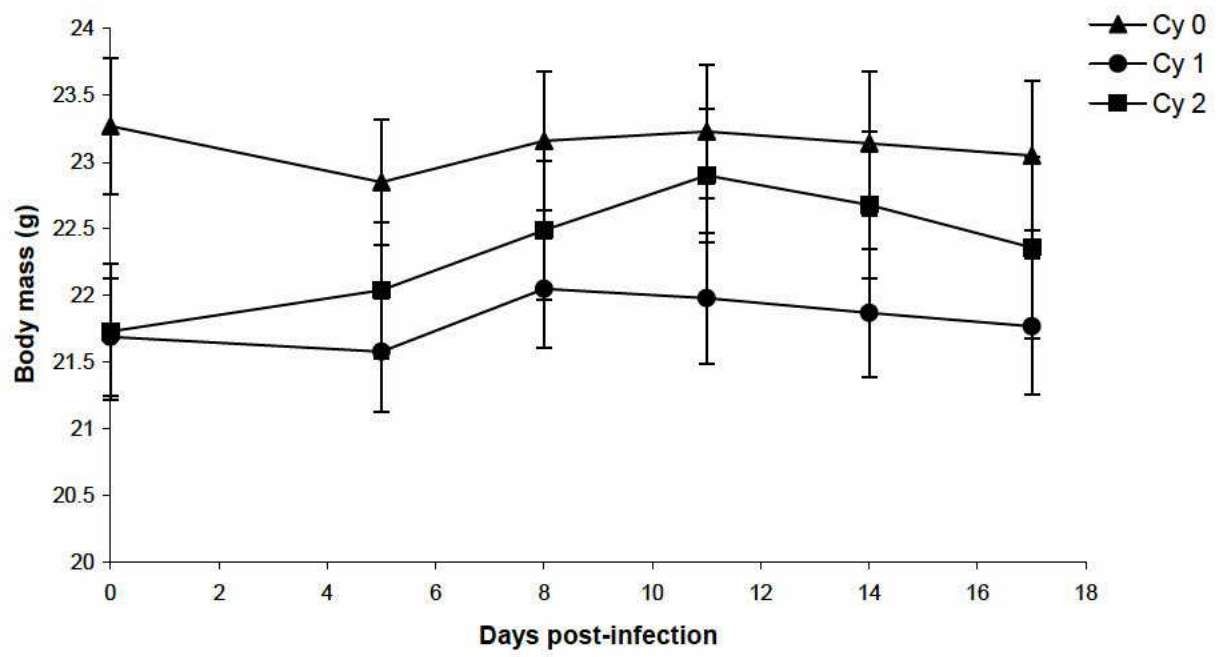


Figure 5.

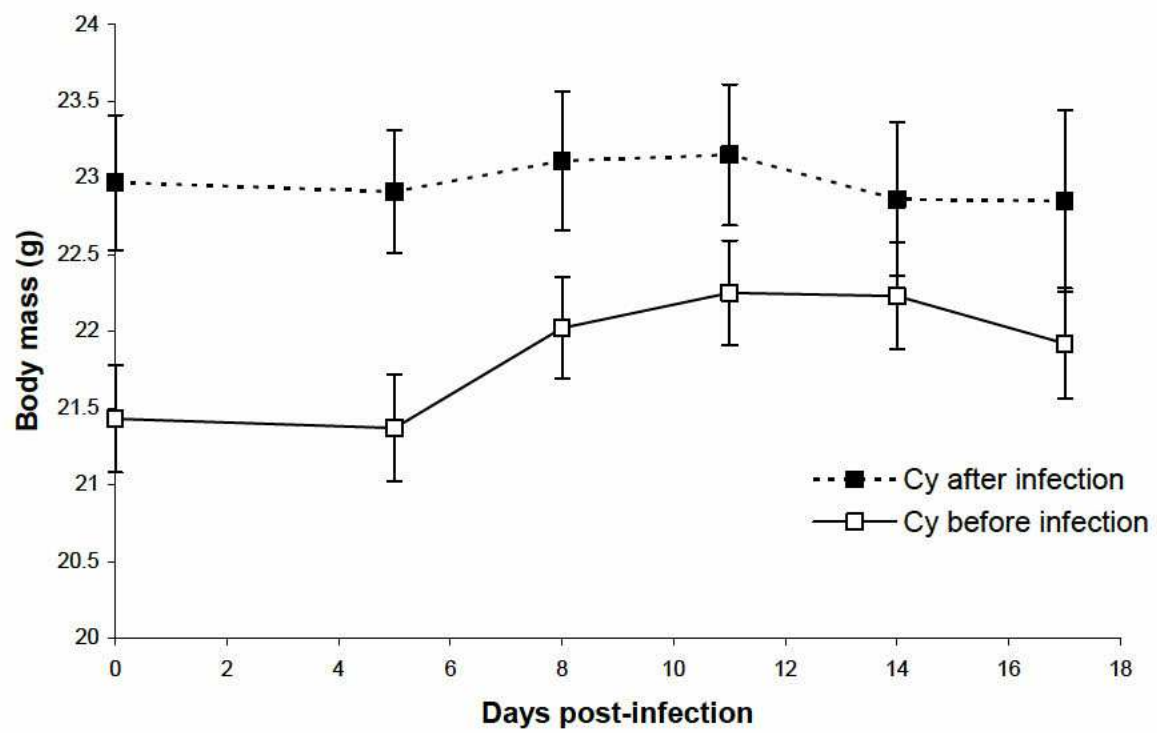


Figure 6.

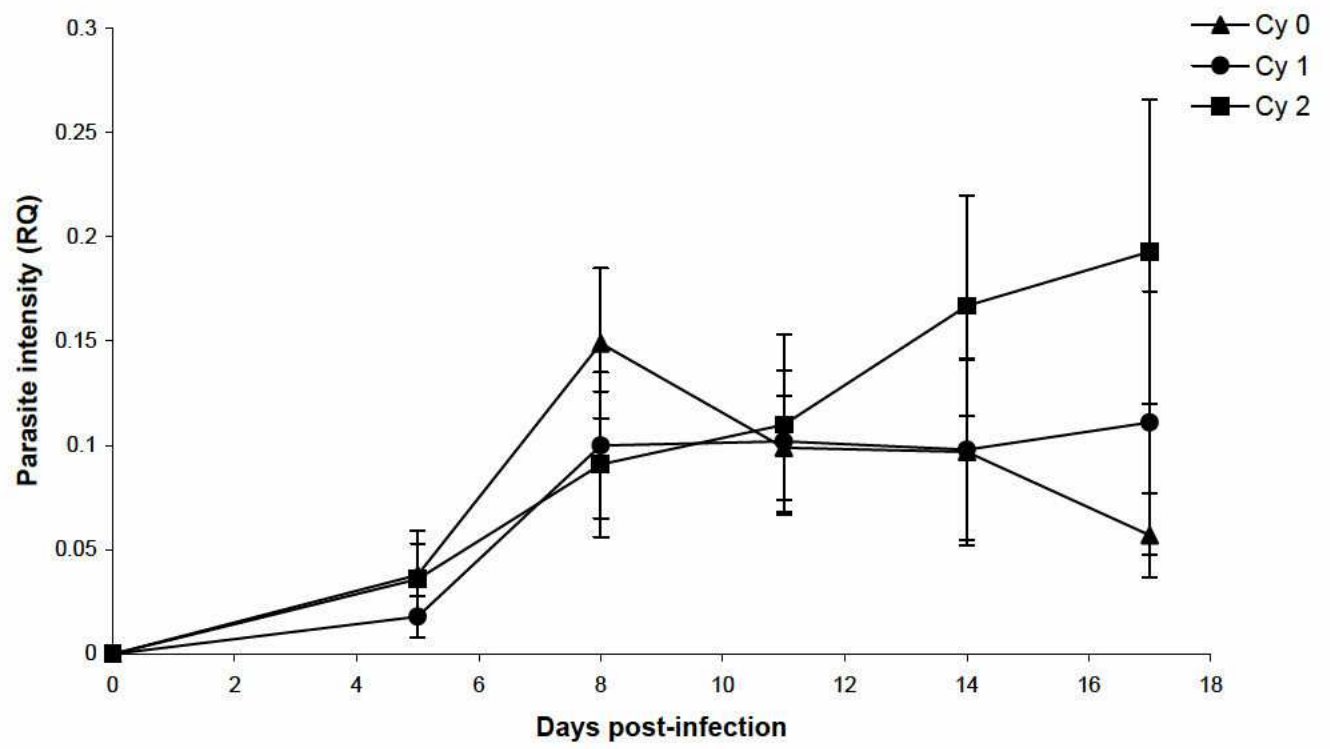


Figure 7.

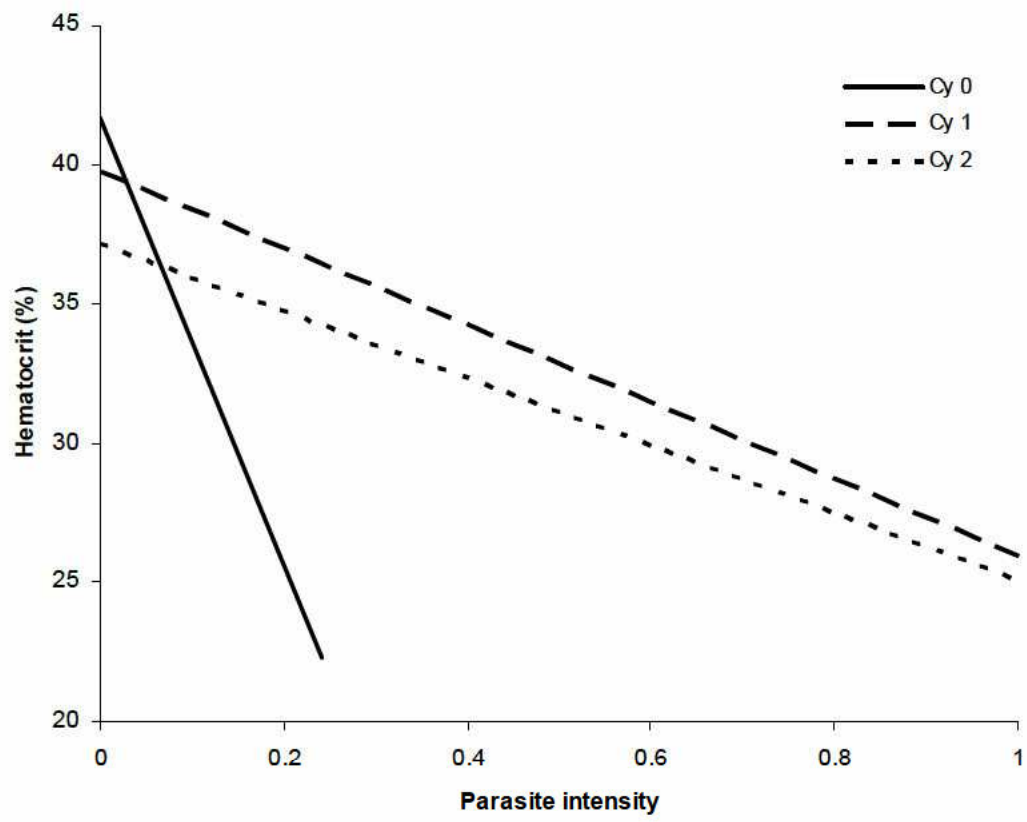
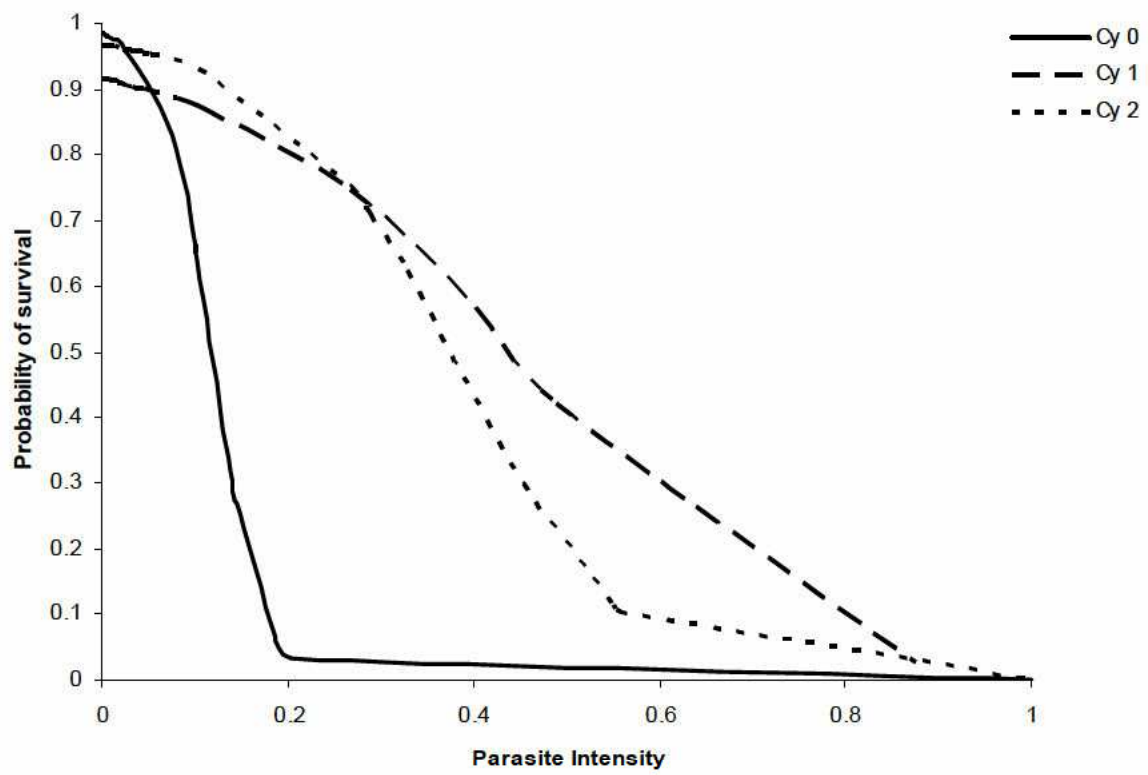


Figure 8.



Annexe 6

Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S. and Sorci, G. Experimental evolution of avian malaria parasites. *In preparation*.

Experimental evolution of avian malaria parasites

Elise CELLIER-HOLZEM*, Rodrigo ESPARZA-SALAS*†, Stéphane GARNIER* and
Gabriele SORCI*

* Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard
Gabriel 21000 DIJON

† Present address: Department of Biology, PO Box 3000, 90014 University of Oulu, Finland

Corresponding author:

Elise Cellier-Holzem

Laboratoire Biogéosciences, CNRS UMR 5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard
Gabriel, 21000 Dijon, France. Tel: +33 681175979

Email address: Elise.Cellier-Holzem@u-bourgogne.fr

Abstract

The study of pathogen virulence evolution represents a fertile field of investigation in evolutionary biology as well as medical sciences, in particular to understand conditions allowing changes of infectious diseases damages. In the present study, we wanted to examine and understand virulence of *Plasmodium relictum*, the most common and widely distributed avian malaria parasite, focusing particularly on the role of the infective dose on virulence evolution. To this purpose, we transferred *P. relictum* (lineage SGS1) at different doses between groups of domestic canaries. We monitored changes of parasite multiplication rates, virulence and transmissibility occurring with passages at new groups of hosts. The more we passed parasites, the higher were the multiplication rates for the two highest doses used. Competition could be in these cases an important factor driving parasite evolution. However, this result was not linked to an escalation of symptoms of the disease. Interestingly, we also found a significant negative effect of passages on the transmissibility of *P. relictum* (assessed as the proportion of sexual stages produced). Relaxing the constraints of host mortality and transmission to the vector, the serial passages selected parasites with the higher multiplication rate and lower investment in the sexual function.

Keywords: Serial passage experiments (SPE), virulence, evolution, *Plasmodium relictum*, dose, transmission.

Introduction

Virulence is usually defined as the degree of damage caused to the host by the infection (Frank 1996, Levin 1996, Poulain & Combes 1999, Sacristan & Garcia-Arenal 2008) and can be seen as an unavoidable consequence of parasite establishment and reproduction (Lenski & May 1994). Studying the evolution of virulence is important to understand the emergence and re-emergence of pathogens or to develop strategies of infectious diseases control.

One of major ideas put forward by models of virulence evolution is that optimal virulence usually lies at intermediate levels because of the trade-off between host exploitation (possibly leading to its death) and parasite transmission to a new host (Anderson & May 1982, Bull 1994, Franck 1996, Alizon *et al.* 2009). In other words, virulence entails both costs and benefits for a pathogen and the balance between them will determine the value that maximizes parasite fitness (Frank 1996).

An approach often used in evolutionary biology to study the evolution of virulence is perform serial passages of the parasite across hosts (SPE). In SPE, parasites are transferred from one host to another (Ebert 1998, 2000) either over passing the vector (e.g. parasite transferred by injection) (Mackinnon & Read 1999(*a and b*), 2003, 2004, Scully & Bidochka 2005) or using natural transmission route under controlled conditions (e.g. using the natural vector) (Hughes *et al.* 2002, Mackinnon & Read 2005, Scully & Bidochka 2005, Carillo *et al.* 2007). SPE can be useful, for example to produce attenuated live vaccines, or to maintain stocks of parasites in laboratory. The result, generally found by these serial passages is an increase of virulence (reviewed in Ebert 1998, 2000). One possible explanation for this evolutionary response is that experimentally transmitted parasites do not pay the cost of hosts mortality, which favors parasite strains with the fastest replication rate. Changes of virulence can occur more or less quickly according to parasite attributes such as its generation time and

mutation rate. For instance, Woolcock and Crichton (1979) have been able to obtain change of duck virus hepatitis virulence after only 3 passages.

Here, we focused on a vector-transmitted parasite, *Plasmodium relictum*, the most common and widely distributed of avian malaria parasites (Valkiūnas 2005), and we aimed to study its virulence evolution through a serial passage experiment. To our knowledge such transfers of avian malaria parasites by SPE have been done just once by an old experimental study conducted by Wolfson in 1945. He passaged *P. relictum* semi-weekly between ducks and found an increasing parasitemia with the number of parasite transfers. We have really more information about *Plasmodium* evolution in rodents, in particular with the studies of Mackinnon and Read who examined transmissibility, virulence and persistence of *Plasmodium chabaudi* serial-passaged between mice (Mackinnon & Read 1999 (*a and b*) and 2003, Mackinnon et al. 2002, and reviewed in Mackinnon et al. 2004b and 2008).

Plasmodium relictum, like all malaria parasites, presents two ways of development in the vertebrate hosts: (1) one for asexual growth producing parasites that replicate rapidly in red blood cells, (2) one for the production of sexual stages (gametocytes), which are up taken by the mosquito vector where sexual reproduction occurs. If Mackinnon and Read (1999 (*a and b*), 2003) and Mackinnon et al. (2002), with their SPE in rodents, did not find a trade-off between these two developmental stages, Dearsly et al. (1990) showed that asexual parasites became dominants with passages. In our study we expected an increase of *Plasmodium relictum* virulence with passages. And because asexual stages of *Plasmodium* produce gametocytes and are responsible for the disease symptoms and persistence of the infection, we expected also that an increase of virulence would lead to a more investment in the asexual stages of *P. relictum*.

Virulence evolution could be influence by several factors linked to host and parasite characteristics as well as environmental conditions. For example, Mackinnon and Read

(2004a) suggested that host immunity could promote malaria virulence evolution. Here, we decided to take into account a factor susceptible to affect virulence evolution: the density of parasites during the serial passages. Test of malaria dose effects gave mixed results in the literature (Boyd, 1925; Glynn et al., 19995; Timms et al., 2001; Permin and Juhl, 2002; Cellier-Holzem et al., *submitted*). Here, we wondered how parasite dose could affect virulence evolution with passages. We expected that a higher dose would increase the genetic variation and therefore the likelihood to have rapidly multiplying clones within the population. Moreover, transferring large populations of parasites might increase the among clones competition which again is supposed to promote the evolution towards higher levels of virulence.

Materials and methods

1. Parasite collection and identification

Parasites used for the experimental infections were obtained from a natural population of house sparrows (*Passer domesticus*) in Dijon, France. We captured birds using mist nets in January 2008 and collected 20 to 40 µl of blood by brachial vein puncture. Blood was preserved in 500µl of Queen's Lysis Buffer (QLB) (Seutin et al., 1991) for subsequent molecular analyses. Sparrows were kept three days in large outdoor aviaries until obtaining their infectious status.

DNA was extracted using standard phenol/chloroform protocol (modified from Hilis et al., 1996). We used a nested polymerase chain reaction (PCR) method (Waldenström et al., 2004) that amplifies a section of the mitochondrial cytochrom b gene, in order to detect the presence or absence of malaria parasites of the genus *Plasmodium* and *Haemoproteus*. We identified the parasite strain by sequencing PCR products of infected individuals and

sequences were compared with those of the GenBank database using the algorithm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Approximately 200 µl of blood were collected from 5 house sparrows that were infected with *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). The blood was directly transferred intraperitoneally to 10 domestic canaries, using 0.5 ml insulin syringes, in order to increase parasite intensity.

2. Parasite doses

We passed parasites at 3 different doses: 10^4 , 10^5 and 10^6 . To obtain these doses, we proceeded as follow. Eight days after infection of “donors” canaries, we measured haematocrit of these 10 birds and prepared blood smears by spreading a drop of blood of each bird on a glass slide for microscopic examination, fixed with absolute methanol and coloured with 10% Giemsa solution (Sigma-Aldrich). We counted the parasite number observed in a total of 10,000 erythrocytes. Parasite intensities and haematocrit allowed us to evaluate the number of parasites in 1 µl of blood for each bird (a haematocrit of 50% corresponds approximately to 5,000,000 erythrocytes per microliter of blood).

We collected blood of donors which was subsequently diluted in 0.9% saline solution as to obtain the required number of parasites per inoculum for subsequent infections (see experimental design). This was repeated for each passage.

3. Experimental design

Birds were divided into two groups:

- “passage groups”: birds were used only to transfer parasites. We infected them, and collected parasites in order to infect another group of birds.

- “virulence test groups”: we infected them with serial-passaged parasites in order to test *Plasmodium relictum* virulence at the end of each passage.

(a) Serial passages

We conducted 3 serial passages of *P. relictum* at 3 different doses: 10^4 , 10^5 and 10^6 parasites. In each group for each passage we proceeded as follow. We injected the corresponding dose of parasites to 5 birds (ip. injection, see section 2 for details). All birds received the same volume of blood. Eight days after parasite inoculation, we collected blood from these birds, mixed the 5 samples, diluted it as to have the required inoculum size and injected 5 other birds. In total we carried out 5 passages at the two highest doses (10^6 and 10^5), but only 4 at the lowest dose (10^4) because the parasites went extinct (figure 1).

(b) Virulence tests

At the end of each passage, for each infective dose used, we tested parasite virulence. For this, we transferred blood from each “passage group” at 8 days post-infection to 5 naïve canaries (figure 1). In order to compare the evolution of parasite virulence between all the parasite doses used, we infected all the “virulence test groups” with an intermediate and common dose of parasites (10^5). We monitored birds before their infection and 8 days after parasite inoculation. This monitoring included an evaluation of bird condition and parasite multiplication (see below).

4. Parasite multiplication and reproductive investment

To evaluate parasite multiplication and parasite investment in the two reproductive stages (asexual and sexual) we collected blood smears 8 days after bird infection. We used a $\times 100$ microscopic objective and counted the number of parasites per 10,000 erythrocytes.

Parasites were recognized using the criteria reported in Campbell (2nd edition 1995) and Valkūnias (2005). Smears were observed in random order without knowing the corresponding dose and the number of passages.

5. Estimation of parasite virulence

To evaluate the damage that parasites caused to canaries, we recorded host body mass (± 0.1 g of precision) and haematocrit (obtained by centrifugation of heparinised capillaries with ca 20 μ l of blood during 15 minutes at 10000 rpm). These two measures, added to the monitoring of bird mortality, should permit to detect parasite impact on birds.

6. Statistical analyses

For all the statistical analysis, we used the statistical software R (Ihaka & Gentlemen 1996, <http://cran.r-project.org>) version 2.10.0 and the p-value threshold has been fixed at $p=0.05$.

Changes of parasitemia, parasite investment and virulence were analyzed using linear models, or generalized linear models if the errors were not normally distributed, considering each time the number of passages and the infective dose used as explanatory variables. Parasite intensities were considered as following a Poisson distribution and proportion of sexual and asexual parasites were analyzed using a binomial distribution of errors. For body mass and haematocrit variation, the variance was constant and the error normally distributed.

Results

Parasite multiplication

We observed changes of parasite intensities with the number of passages and the dose used (passages: $z_{1,72}=51,874$, $p<0.0001$; dose: $z_{2,72}=5,048$, $p<0.0001$; figure 2). For the two highest doses (10^6 and 10^5), we noted an increase of parasitemia with passages, whereas for the lowest dose (10^4) parasite intensities fluctuated between 0.55% and 1.68% without significant increase (we even observed a pattern of decrease at the end of the 4th passage where only two birds presented a detectable parasitemia). This resulted in a interaction between passages and doses, mainly due to the difference between 10^4 and the two other doses ($z_{2,72}= -3.765$, $p=0.0002$).

Parasite investment

We found a significant negative effect of passages on the proportion of gametocytes (sexual parasites) ($z_{1,36}= -23.99$, $p<0.0001$) whereas the total number of parasites increased with transfers. For this analysis, we considered only birds presenting at least 20 parasites (in order to obtain relevant values of proportions). During the first two passages, gametocytes proportion tended to increase. Then, we observed a clear decrease, to reach a proportion of 8.12% of gametocytes at the end of the last passage ($z_{1,36}= -13.01$, $p<0.0001$).

Cost of infection

Neither the number of passages nor parasite affected changes in body mass (Passage: $F_{1,70}=0.254$, $p=0.616$; Dose: $F_{2,70}=1.162$, $p=0.319$; Passage x Dose: $F_{2,70}=0.583$, $p=0.561$). Similarly, changes in hematocrit did not depend on number of passages, parasite dose or the interaction between the two (Passage: $F_{1,65}=0.216$, $p=0.644$; Dose: $F_{2,65}=0.513$, $p=0.601$; Passage x Dose: $F_{2,65}=0.938$, $p=0.396$).

Discussion

Study of virulence evolution represents a field of researches more and more attractive, in particular by its implications in human health or in conservation biology (Lebarbenchon et al. 2008). Parasites can evolve in response to change of components of their environment such as habitat fragmentation, host population changes, variation of their transmission probabilities to new hosts or vaccine development. Identifying and maybe predicting factors that influence change of parasite virulence represent a major challenge for evolutionary biology as much as for medical sciences. Heterogeneity of parasite virulence is real and important in natural populations. Human malaria reflects perfectly this phenomenon with *Plasmodium falciparum* virulence going from “mild” to fatal forms of the disease (Gupta et al. 1994, Mackinnon & Read 2004). Understand this variation and conditions that allow some pathogens to increase and other to decrease in their virulence, seems to be essential.

Focusing on avian malaria parasites, we wanted to provoke an experimental evolution of their virulence through serial passages between groups of canaries. Relaxing some constraints of the infectious process (e.g. host mortality preventing parasite transmission), SPE generally lead to an increase of parasite virulence (Ebert 1998 and 2000, Mackinnon & Read 2004). With passages we expected to select parasites with increased virulence. We observed changes in *P. relictum* characteristics with passages but we did not find any increase of symptoms severity for hosts. More we passed parasites, more their development in avian blood were important. During our SPE we selected, by the fact, parasites multiplying more and faster, and/or more able to get away from host defences. Because they did not pay costs of host mortality in SPE, parasites having such high multiplication capacity presented a selective advantage in this context. Other studies showed that serial passages lead to higher parasite multiplication rate (Ebert 1998 and 2000, Mackinnon & Read 1999b and 2004a) but this result was generally associated with an evolution of virulence that we did not detect here. To

observe an evolution of parasite virulence, we monitored birds on 3 aspects: (1) haematocrit rate that can be considered as an indicator of bird condition (Brown 1996, Potti et al. 1999, Jenni et al. 2006) (2) body mass change that can lead to more or less contrasted results according to the feeding behaviour of infected birds. Contrary to our predictions, we did not detect any impact of passages on these parameters for the 3 doses considered. During a previous experiment, where we tested *P. relictum* dose effects on canaries, we highlighted a possible dissociation between parasite load and disease severity (Cellier-Holzem et al., *submitted*). This could explain the results of the present study. We need however to conduct more parasite passages and monitor birds during more time after their infection to be able to detect change of *P. relictum* virulence with transfers.

Parasites have been passed at 3 different doses. Within-host competition can be an important force driving parasite virulence evolution, leading to selection for the most virulent clones or at least clones with higher multiplication rate (Nowak & May 1994, Herre 1995, Frank 1996, Ebert 1998). In our experiment, competition could be the factor explaining the increasing multiplication rate of parasites passed at the two highest doses (10^6 and 10^5). When we injected a high number of parasites into the host, we increase the probability to have, in the infectious cocktail, parasite clones more competitive, multiplying fast and having the capacity to exploit more hosts resources. On the other hand, we obtained different results for parasites passed at the lowest dose (10^3). In the latter we not observed an increase of parasite intensities with passages, so much so that we were not able to conduct the last passage. After injection of a small dose of parasites, the time to reach a given level of parasitemia is longer allowing time for the immune system to mount a response while the parasitemia is still relatively low (Marsh 1992).

We were also interested in changes of *Plasmodium relictum* investment in its two reproductive ways. Life history theory (Stearns 1992) permitted us to predict a trade-off

between parasite replication in host and transmission to new hosts (parasite reproduction). This trade-off has been approached by studies based on serial passages experiments where the constraint of producing transmission forms is generally absent. Studies of Mackinnon & Read on *Plasmodium chabaudi* virulence evolution in mice showed no apparent trade-off between parasite growth in the vertebrate host and reproduction (Mackinnon & Read 1999 (*a and b*) and 2003, Mackinnon et al. 2002 and 2008). They observed that after passages higher virulent *Plasmodium* clones producing more asexual parasites but also more gametocytes. Conversely, Dearsly et al. (1990) showed that with passages from mouse to mouse, without vectors, asexual growth forms became dominant, while sexual reproduction disappeared progressively. Ebert (2000) advance the idea that host-to-host transmission stages are more costly to produce than growth stages because they have to survive to the external environment (here the vector) and so have to develop protective structures. If some conditions increase production of one parasite stage, this could lead to a decrease of the other. Our study takes place in this framework. Indeed we observed a significant decrease of the proportion of gametocytes with passages whereas the number of parasite increased. Afterward it could be interesting to see if in our system we could achieve a total disappearance of sexual parasites by increasing the number of passages.

At the sight of our results, factors that increase the frequency of multiple infections (i.e. inoculation of a higher number of parasites) could lead to an increase of parasitemia and potentially parasite virulence. In this context, vectors appear as important agents of parasite selection and virulence evolution.

Acknowledgements

We thank Marie Belvalette for her help in the first steps of the experiment. Financial support was provided by the Région Bourgogne, the ANR IRMAL, and the CNRS program MIE. The experiments were performed under the DSV permit # 21-CAE-085.

References

- Alizon S., Hurford A., Mideo N. & Van Baalen M. (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.* **22**, 245-259.
- Anderson R.M. & May R.M. (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411-426.
- Brown M.E. (1996) Assessing body condition in birds. *In: Current ornithology*, vol 13. *Edited by* Nolan V.Jr & Ketterson E.D. Plenum Press, New York, pp 67-136.
- Bull J.J. (1994) Virulence. *Evolution* **48**, 1423-1437.
- Campbell T.W. (1995) Avian hematology and cytology, 2nd edition, Iowa State University Press, Ames, 104p.
- Carillo C., Lu Z., Borca V., Vagnozzi A., Kutish G.F. & Rock D.L. (2007) Genetic and phenotypic variation of Foot-and-Mouth Disease Virus Turing serial passages in a natural host. *Journal of virology* **81**, 11341-11351
- Dearsly A.L., Sinden R.E. & Self I.A. (1990) Sexual development in malarial parasites: gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. *Parasitology* **100**, 359-368.
- Ebert D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* **282**, 1432-1435.
- Ebert D. (2000) Experimental evidence for rapid parasite adaptation and its consequences for the evolution of virulence. *In: Host-parasite evolution* (eds. R. Poulin, S. Morand & A. Skorping) Elsevier pp. 163-184.
- Frank S.A. (1996) Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* **71**, 37-78.
- Gupta S., Hill A.V.S., Kwiatkowski D., Greenwood A.M., Greenwood B.M. & Day K.P. (1994) Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3715-3719.

- Herre E.A. (1995) Factors affecting the evolution of virulence: Nematode parasites of fig wasps as a case study. *Parasitology* **111**, S179-S191.
- Hillis D.M., Moritz C. & Mable B.K. (1996) Molecular Systematics, 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 655p.
- Hughes G.J., Mioulet V., Haydon D.T., Kitching R.P., Donaldson A.I. & Woolhouse M.E.J. (2002) Serial passage of food-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *Journal of General Virology* **83**, 1907-1914.
- Ihaka R. & Gentleman R. (1996) R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299–314.
- Jenni L., Müller S., Spina F., Kvist A. & Lindström A. (2006) Effect of endurance flight on haematocrit in migrating birds. *J. Ornithol* **147**, 531-542.
- Lebarbenchon C., Brown S.P., Poulin R., Gauthier-Clerc M. & Thomas F. (2008) Evolution of pathogens in a man-made world. *Molecular Ecology* **17**, 475-484.
- Lenski R.E. and May R.M. (1994) The evolution of virulence in parasites and pathogens: reconciliation between two competing hypotheses. *J. theor. Biol.* **169**, 253-265.
- Levin B.R. (1996) The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerging infectious diseases* **2**, 93-102.
- Mackinnon M.J. & Read A.F. (1999a) Genetic relationships between parasite virulence and transmission in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* **53**, 689-703.
- Mackinnon M.J. & Read A.F. (1999b) Selection for high and low virulence in the malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 741-748.
- Mackinnon M.J., Gaffney D.J. & Read A.F. (2002) Virulence in rodent malaria: host genotype by parasite genotype interactions. *Infection, Genetics and Evolution* **1**, 287-296.

- Mackinnon M.J. & Read A.F. (2003) The effects of host immunity on virulence-transmissibility relationships in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* **126**, 103-112.
- Mackinnon M.J., Bell A. & Read A.F. (2004) Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 965-986.
- Mackinnon M.J. & Read A.F. (2004) Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLOS Biology* **2**, 1286-1292.
- Mackinnon M.J., Bell A. & Read A.F. (2005) The effects of mosquito transmission and population bottlenecking on virulence, multiplication rate and resetting in rodent malaria. *International Journal for Parasitology* **35**, 145-153.
- Mackinnon M.J., Gandon S. & Read A.F. (2008) Virulence evolution in response to vaccination: The case of malaria. *Vaccine* **265**, C42-C52.
- Marsh K. (1992) Malaria – a neglected disease. *Parasitology* **104**, S53-S69.
- Nowak M.A. & May R.M. (1994) Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proc. R. Soc. Lond. B* **255**, 81-89.
- Potti J., Moreno J., Merino S., Frias O. & Rodriguez R. (1999) Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledgling pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia* **120**, 1-8.
- Poulin R. and Combes C. (1999) The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today* **15**, 474-475.
- Sacristán S. & Garcia-Arenal F. (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular plant pathology* **9**, 369-384.
- Scully L.R. & Bidochka M.J. (2005) Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. *Can. J. Microbiol.* **51**, 185-189.

- Seutin G, White B.N. & Boag P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 82-90.
- Stearns S.C. 1992. The Evolution of Life Histories. Oxford University Press , 264p.
- Timms R., Colegrave N., Chan B.H.K. and Read A.F. (2001) The effect of parasite dose on severity in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology* **123**, 1-11.
- Valkiūnas G. (2005) Avian malaria parasites and other haemosporidia. *Edited by* CRC Press, Boca Raton, Florida, 946p.
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D. & Östman Ö. (2004) A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infection from avian blood. *J. Parasitol* **90**, 191-194.
- Woolcock P.R. & Crichton G.W. (1979) Duck virus hepatitis – serial passage of attenuated virus in ducklings. *Veterinary Record* **105**, 30-32.

Legend to Figures

Figure 1: schematic representation of the experimental design. Five passages have been conducted at 3 different parasite doses. Tests of virulence, just before any transfer and at the end of each passage, have been done at a common dose of 10^5 parasites.

Figure 2: *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) intensities in domestic canaries 8 days post-infection. Parasites came from serial passages at different doses (10^6 , 10^5 and 10^4), and have been injected at a common dose of 10^5 parasites to birds concerned here. Error bars show Mean +/- SE.

Figure 3: Proportion of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) gametocytes in canaries 8 days post-infection according to the number of parasite passages realized. Error bars show Mean +/- SE.

Figure 1

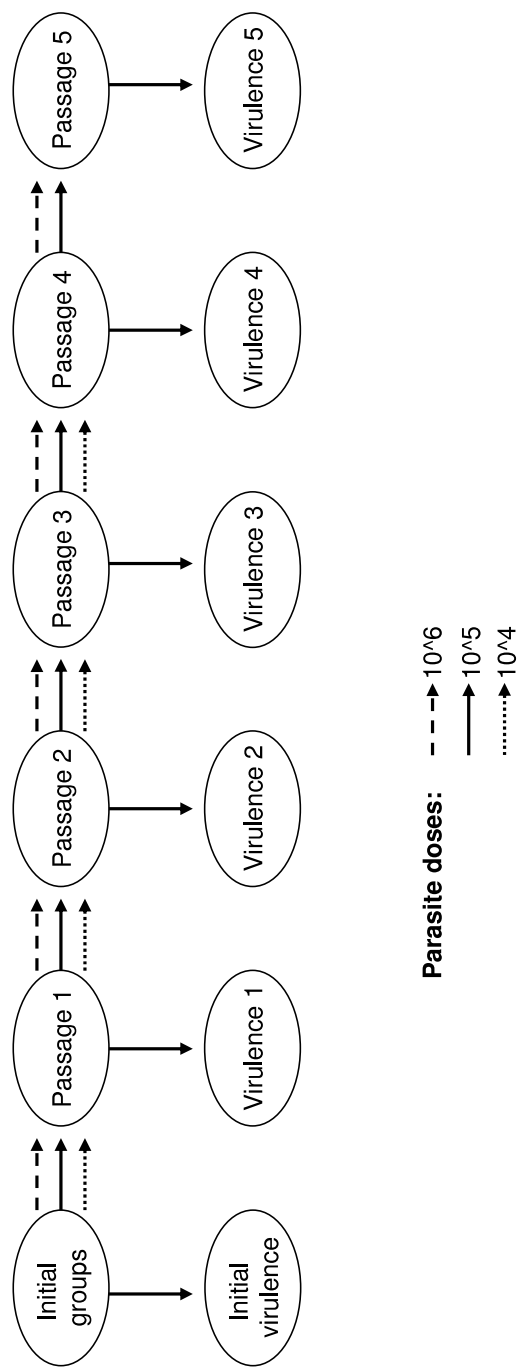


Figure 2

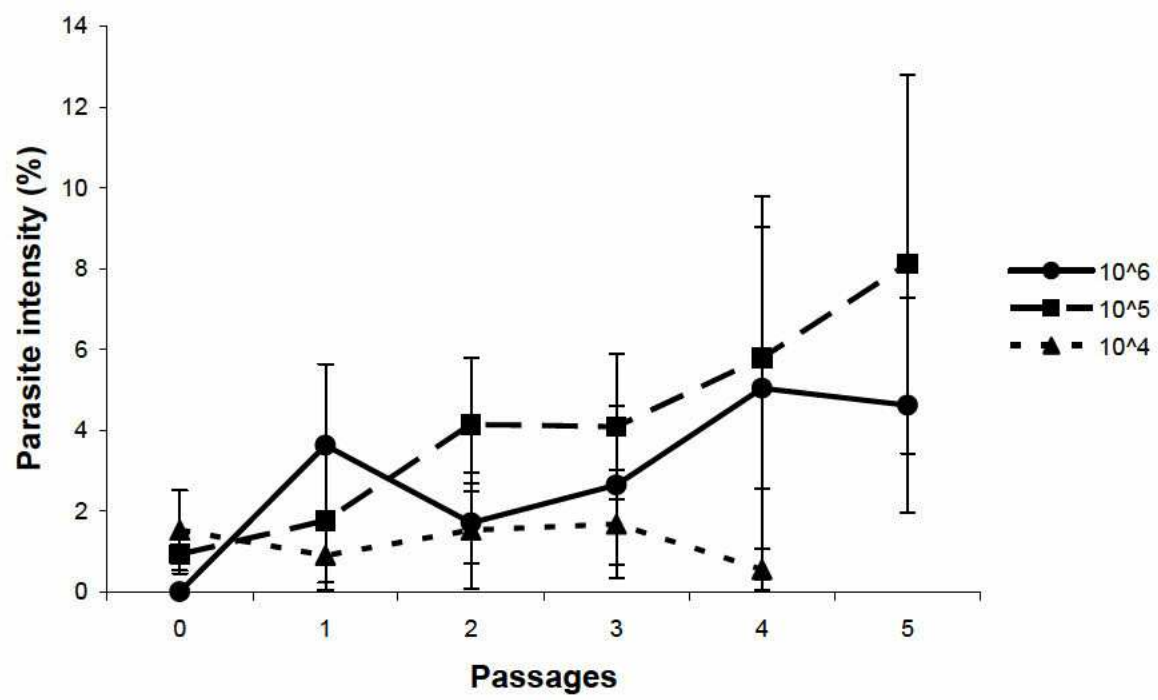


Figure 3

