

Université Cheikh Anta Diop de Dakar



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016

N° d'ordre : 238

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

Abdoulaye Gaye

**Interaction entre transmission, morbidité et facteurs naturels
inhibant le cycle sporogonique de *plasmodium falciparum* dans
une zone hypoendémique du Sénégal**

Soutenue publiquement le : 2 Août 2016

Membres du jury :

	Nom et prénoms	Grade	Etablissement
Président	Oumar GAYE	Professeur	FMPOS – UCAD / Sénégal
Rapporteurs	Ngor FAYE	Professeur	FST – UCAD
	Mawlouth DIALLO	Dr. Sc. HDR	IPD / Sénégal
	Jean L. Abdourahime NDIAYE	MC Agrégé	FMPOS – UCAD / Sénégal
Examineurs	Cheikh S. SOKHNA	HDR	IRD / Sénégal
	Ibrahima DIA	Dr. Sc. HDR	IPD / Sénégal
Directeur de thèse	Ousmane FAYE	Professeur	FST – UCAD

« Existe-t-il pour l'homme un bien plus précieux que la santé ? »

Socrate



A toute ma famille, pour leur soutien et leur aide

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés conjointement à l'UMR 198 de l'Institut de Recherche pour le Développement de Dakar et au Département de Biologie Animale de la Faculté des sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar plus précisément au Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire (LEVP).

Ils ont été dirigés parallèlement par les docteurs Christian Boudin et Lassana Konaté.

Je remercie vivement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mon travail, de le corriger et d'en juger la qualité :

Je tiens aussi à remercier les représentants de l'IRD à Dakar, pour m'avoir permis de réaliser ce stage. Je ne manquerai pas de remercier mes collègues, amis et mes plus proches collaborateurs ; je veux nommer Libasse Gadiaga, Ousmane Ndiatt, El Hadj Niang, ainsi que tous les techniciens de l'UMR 198, particulièrement, Moussa Gueye, Maty..... je leur adresse à tous ma reconnaissance et ma sympathie.

Je remercie particulièrement Abdoulaye Kane Dia qui s'est occupé de bout en bout, de mes obligations administratives durant mon absence du pays.

Une note speciale à Oumar Niang et à mon grand père Mapathé Ndiouck...

Mes plus vifs remerciements vont à mes directeurs de thèse : Pr Ousmane Faye et Dr Lassana Konaté. Ils ont chacun de leurs coté, tout mis en œuvre pour que ce travail se réalise dans les meilleures conditions. Merci à eux de m'avoir fait découvrir l'univers de l'entomologie et de l'épidémiologie du paludisme.

Je remercie Dr Cheikh Sokhna qui m'a beaucoup aidé après le depart à la retraite anticipée de Christian Boudin.

Je ne pourrais clore ces remerciements sans en adresser à toute la population de la zone de Anène, particulièrement aux villages de Keur Amar, Keur Mamour et Ndiréne. C'est grâce à la compréhension des habitants de cette zone que toutes ces études de terrain ont pu être réalisées. Je tiens à les adresser mes sincères remerciements.

Un dernier mot pour remercier toutes les personnes qui m'ont toujours soutenues et encouragées dans les moments difficiles : particulièrement, mon épouse, mes parents et l'ensemble de ma famille ; mon père, mon grand père Mapathé, mon oncle Saliou et son épouse Fat Kébé ; mes cousins Abdoul Aziz Ndiouck et son épouse Ndéye Khady Touré ; Babacar Ndiouck ; Mouhamed Abdoulaye Kébé et Son épouse Mame Amy. Je terminerai cette liste de remerciements en citant Oumar Niang qui veille régulièrement à l'état d'état d'avancement de mes travaux.

A tous mille mercis

Table des matières

REMERCIEMENTS	IV
INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. GENERALITES SUR L'INFECTION PALUSTRE	4
1.1. Biologie du parasite.....	4
1.1.1. Taxonomie	4
1.1.2. Cycle biologique	4
1.1.2.1. Phase exo érythrocytaire ou hépatique	4
1.1.2.2. Phase érythrocytaire	5
1.1.2.3. Cycle sporogonique chez le moustique	7
1.2. Biologie du vecteur.....	8
1.3. Clinique du paludisme	10
1.5. Le diagnostic.....	16
1.6. L'épidémiologie du paludisme.....	18
1.7. Les moyens de lutte antipaludique.....	20
1.8. La chimiorésistance	25
2. LES FACTEURS INHIBITEURS DU CYCLE SPOROGONIQUE	28
2.1. Les facteurs humains.....	29
2.2. Les facteurs parasites.....	31
2.3. Les facteurs moustique.....	33
3. MESURE DES DIFFERENTES COMPOSANTES DE LA TRANSMISSION	35
3.1. La Transmission moustique – homme (TMH)	36
3.1.1. Les méthodes de capture	36
3.1.2. Les indicateurs.....	38
3.1.3. Les études épidémiologiques.....	41
3.2. La Transmission Reducing Activity (TRA).....	42
3.2.1. Définitions.....	42
3.2.2. L'immunité « bloquant » la transmission (TBI ou TRI).....	43
3.2.3. L'exploration de la TRA.....	43
3.2.4. Les indicateurs potentiels de la TRA.....	47
3.2.4.1. L'estimation du niveau de TRA naturelle.....	47
3.2.4.2. L'estimation de l'intensité moyenne de la TRA	47
3.2.4.3. L'estimation du rôle relatif de la TRA	48
3.2.4.4. L'estimation du rendement du cycle sporogonique	48
3.2.5. L'exploration de la TRI.....	48
3.3. La transmission homme - moustique (THM)	49
3.3.1. Les indicateurs.....	49
3.3.1.1. Le pourcentage de sujets infectants pour les moustiques (B)	49
3.3.1.2. L'indice gamétocytaire ou la densité gamétocytaire moyenne	49
3.3.1.3. Le pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte (PIG)	50
3.3.1.4. Le taux d'inoculation parasitologique (TIP)	50
3.3.1.5. La contribution d'une population au réservoir de moustiques infectés.....	50
3.3.1.6. La proportion de moustiques infectés sur sujets infectants (Ci)	51
3.3.1.7. La probabilité d'un repas sanguin infectant (K).....	51
3.3.2. Les méthodologies	52
3.3.2.1. L'estimation de la gamétocythémie	52
3.3.2.2. L'infectivité des gamétocytes pour le vecteur local	52
3.3.2.3. L'estimation du volume sanguin ingéré par les moustiques	54
3.3.3. Les études épidémiologiques	54

MATERIELS ET METHODES	58
1. ZONE D'ETUDE	58
2. DEPISTAGE DES SUJETS INFECTES	59
3.1. Gorgement direct (DIR).....	62
3.2. Gorgement sur membrane de parafilm®.....	63
4. ETUDE DE LA MORBIDITE.....	67
5. ETUDE DE LA TRANSMISSION HOMME-MOUSTIQUE (THM)	68
6. ETUDE DE LA « TRANSMISSION REDUCING ACTIVITY » (TRA).....	69
RESULTATS.....	71
1. NIVEAUX DE LA PARASITEMIE DANS LA POPULATION	71
1.1. La parasitémie globale dans la zone d'étude	71
1.2. Parasitémie dans l'échantillon de morbidité.....	74
2. LA MORBIDITE PALUSTRE	78
2.1. Les fébriles parmi les consultants	78
2.2. Taux d'incidence palustre	79
2.3. Proportion d'accès palustres fébriles et non fébriles.....	80
2.4. La densité d'incidence palustre	82
2.5. Le nombre moyen d'accès palustres par individu et par an	83
2.6. Densité parasitaire chez les accès palustres.....	84
3. CHIMIORESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES	85
3.1. Chimiorésistance à la sulfadoxine pyriméthamine (SP).....	85
3.2. Efficacité thérapeutique à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP)	86
4. GAMETOCYTOGENESE ET ANTIPALUDIQUES	86
4.1. Gamétocytogénèse et résistance à la SP	86
4.2. Relation entre traitement à la SP et poussée gamétocytaire.....	87
4.3. Relation entre densité parasitaire asexuée et poussée gamétocytaire	87
4.4. Infectivité des gamétocytes post-thérapeutiques.....	88
5. TRANSMISSION REDUCING ACTIVITY (TRA)	90
5.1. Pourcentage de sujet inhibiteur de l'infection chez le moustique	90
5.2. Intensité moyenne de la TRA chez les porteurs de gamétocytes	92
5.3. Rôle relatif de la TRA par rapport à l'inhibition globale	92
5.4. Relation entre TBI/TRA et densité gamétocytaire.....	93
5.5. Relation entre TRA et âge des porteurs de gamétocytes	94
6. LA TRANSMISSION HOMME MOUSTIQUE (THM)	95
6.1. Caractéristique de l'échantillon de la population	96
6.2. Caractéristiques de l'échantillon des porteurs de gamétocytes	96
6.3. Contribution au réservoir humain infectant et probabilité de repas sanguine infectant.....	97
6.5. Relation entre densité gametocytaire et pourcentage de moustiques infecté	100
6.6. Différence d'infectivité entre les individus selon le statut gametocytaire	100
DISCUSSION	102
CONCLUSION	112
PERSPECTIVES	113
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114
ANNEXE.....	130
LISTE DES FIGURES.....	130
LISTE DES TABLEAUX.....	131
PUBLICATIONS.....	132

INTRODUCTION

Le Paludisme est dû à un parasite du genre *Plasmodium* vivant dans le sang de l'homme. Cette infection se rencontre dans toute la ceinture tropicale. Elle revêt généralement un caractère chronique et silencieux chez les sujets vivant dans ces zones d'endémie, avec de temps en temps des poussées parasitaires occasionnant un accès palustre bruyant. Celui-ci peut évoluer vers la guérison, spontanément chez les sujets immuns, ou après un traitement simple. Plus rarement une évolution vers une complication mortelle est possible, surtout chez les sujets non immuns et en cas de retard au traitement. On estime actuellement que 1,5 milliards de personnes sont exposées au risque palustre dans le monde, que 219 à 451 millions font un accès palustre chaque année et que 660 millions à 1 238 000 morts par an peuvent être attribuées à cette parasitose (WHO, 2012 ; Hay *et al* 2010). Chez l'homme, le paludisme est causé par 5 espèces de plasmodium. La plus part des cas est causé soit par *Plasmodium falciparum* ou *plasmodium vivax*. Les infections chez l'homme sont également assurées par *Plasmodium ovalae*, *plasmodium malarae* et *Plasmodium Knowlesi*. La quasitotalité de la mortalité palustre est due à *Plasmodium falciparum* (Kantele *et al*, 20011). Le continent africain rassemble 90% des cas graves de paludisme (Rogier, 2003). Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les couches démographiques les plus touchées (Snow *et al.*, 2004). La morbidité et la mortalité causées par cette maladie entraînent des pertes importantes au niveau de l'économie nationale (Malaney, 2004). Selon l'OMS, depuis 1990, le Produit Intérieur Brut (PIB) par habitant dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne a diminué et le paludisme serait en partie responsable de cette situation déplorable.

La transmission de cette parasitose se fait par l'intermédiaire d'un moustique hématophage qui absorbe un des stades sanguins du parasite : le gamétocyte. Ce stade va suivre un développement complexe chez le moustique pour aboutir à des sporozoïtes. Ceux-ci vont être inoculés à l'homme lors d'une autre piqûre du moustique infecté. La transmission du parasite peut donc être divisée en 3 composantes interdépendantes : la transmission du parasite du moustique vers l'homme (ou TMH), la transmission du parasite de l'homme vers le moustique (ou THM) et le développement du parasite chez le moustique.

Par définition, la TMH estime l'infectivité d'une population de moustique pour une population humaine. Plusieurs méthodologies et indicateurs ont été développés par les entomologistes. Différentes techniques de capture de moustiques sauvages ont été mises au

point, chacune avec ses avantages, ses inconvénients et ses indications. Aucune n'est capable d'explorer la population globale des moustiques dans une zone, mais ce qui est important c'est d'étudier la population de moustiques potentiellement vecteurs, en contact avec l'homme. Des indicateurs ont été proposés, avec leurs avantages et inconvénients. Les plus importants sont ceux qui peuvent mesurer le degré d'infection des moustiques et l'intensité des contacts homme - moustique. De nombreuses études, dans différentes zones géographiques, ont été publiées. Cependant elles sont difficilement comparables à cause des disparités méthodologiques et du manque de sensibilité de certains indicateurs. Des chercheurs ont tenté de modéliser la TMH (**Ross, 1911**). Mais c'est avec **Mc Donald (1950)** que l'étude TMH a atteint son apogée et plusieurs paramètres et indices quantitatifs ont été définis (**Boudin et al. 1998**). Malgré cette somme de connaissances, les données sur la transmission palustre ne sont que fragmentaires, car la TMH ne reflète qu'une partie de cette transmission et les indicateurs utilisés ne permettent pas d'estimer l'infectivité d'une population humaine au moustique (**Tusting et al 2014**).

L'étude de la THM vise à mesurer l'infectivité d'une population humaine pour une population de moustique. Deux méthodes sont proposées : gorgement direct de moustiques d'élevage sur un échantillon représentatif de la population, ou estimation du pouvoir infectant pour les moustiques d'un échantillon de porteurs de gamétocytes (**Graves et al. 1988**), mais le choix n'est pas uniforme. Les études de la THM restent rare dans la littérature et sont très peu explorées (**Bousema et al 2011**) et reposent sur des méthodologies et des indicateurs différents, rendant ainsi les comparaisons difficiles. En effet le choix des indicateurs considérés comme pertinent varient d'une étude à l'autre (**Boudin et al. 1998**) et à l'heure actuelle il n'existe pas de méthodologie standardisée pour explorer la THM. Donc un effort important doit être fait dans ce domaine pour améliorer nos connaissances sur la transmission globale du paludisme.

Les facteurs inhibiteurs du cycle sporogonique sont nombreux. Parmi ces facteurs, on distingue habituellement les facteurs d'origine humaine et sérique appelée Transmission Reducing Activity (TRA), et ceux qui dépendent du moustique ou du parasite. Chez l'homme on a démontré depuis quelques dizaines d'années, l'existence d'une immunité spécifique anti formes sexuées (**Carter et al., 1988; Bousema et al 2011**). On parle alors de Transmission Blocking Immunity (TBI), bien que ces facteurs spécifiques soient rarement bloqueurs, mais plutôt inhibiteurs du cycle sporogonique. Le gamétocyte est le principal stimulus antigénique de cette immunité qui n'est efficace que chez le moustique car inhibant le début du cycle sporogonique. C'est ce qui fait toute son originalité. De très nombreux travaux expérimentaux

sur la TBI ont été publiés, mais les études de terrain restent rares dans la littérature. La TBI n'est qu'une fraction de la TRA, car de nombreux facteurs sériques non immunologiques, comme les médicaments, peuvent renforcer cette TBI naturelle.

Pour étudier la TRA, on se sert généralement d'une technique d'infection artificielle des moustiques, à partir de gamétocytes de culture ou d'un porteur. La comparaison des taux d'infection chez le moustique, en présence d'un sérum test de zone d'endémie ou d'un sérum témoin d'une zone non endémique, permet de définir des sujets inhibiteurs du cycle sporogonique. La proportion de sujets inhibiteurs dans une population pourrait estimer le niveau de TRA dans une zone. Il devient donc théoriquement possible d'estimer le niveau de cette inhibition sérique sur le terrain (**Boudin *et al.*, 1998; Bousema et al, 2011**).

Parallèlement, il est possible de quantifier le développement parasitaire chez le moustique et de définir les cibles de la TRA, en utilisant une technique de coloration du bol alimentaire ou de l'estomac du moustique, avec des anticorps monoclonaux spécifiques de stades et marqués à la fluorescéine (**Gouagna *et al.* 1998**). L'exploration du cycle sporogonique devient donc possible, mais cette technique ne peut être appliquée aux grandes séries pour l'instant.

Ainsi nous avons théoriquement des moyens et des indicateurs qui permettraient d'évaluer, dans sa globalité, le niveau de transmission palustre dans une zone définie. Mais aucune méthodologie n'est parfaitement standardisée. Il n'est donc pas encore possible de comprendre les interactions entre TMH, THM et TRA dans différents faciès épidémiologiques et encore moins de modéliser ces relations. Pourtant c'est probablement un objectif prioritaire des épidémiologistes du paludisme, afin de mieux poser les indications des moyens de lutte qui doivent être adaptés aux conditions locales pour être efficaces.

Notre objectif est d'étudier la THM et la TRA dans une zone hypoendémique sahélienne du Sénégal et de comparer nos observations à celles obtenues précédemment au Cameroun, zone hyperendémique permanente, en utilisant exactement la même méthodologie.

Nous espérons que cette première étude homogène nous permettra de déterminer la TRA dans deux faciès épidémiologiques différents, notamment la part de la TBI dans cette dernière.

Synthese bibliographique

1. Généralités sur l'infection palustre

1.1. Biologie du parasite

1.1.1. Taxonomie

Le *Plasmodium* appartient au règne des protistes, au Phylum des Apicomplexa (**Vivier 1989**) et à l'ordre des Haemosporida. Morphologiquement, les Apicomplexa présentent un complexe apical, outil qui leur permet de pénétrer à l'intérieur d'une cellule hôte. Le genre *Plasmodium* comprend 9 sous-genres, parasites obligatoires de vertébrés, dont trois chez les Mammifères. Il existe chez l'homme 4 espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Ces dernières années, on a aussi enregistré certains cas de paludisme à *Plasmodium knowlesi*. A l'origine, c'est un paludisme du singe rencontré dans certaines zones de forêts d'Asie du Sud-Est. A l'intérieur des espèces on peut encore distinguer des souches géographiques qui ont des propriétés biologiques différentes, notamment chez *P. falciparum* en ce qui concerne le pouvoir gamétocytochrome et chez *P. vivax* en ce qui concerne le temps d'incubation (**Garnham P, 1988**). Ces souches géographiques sont adaptées à des vecteurs locaux spécifiques et se développent généralement moins bien chez des vecteurs d'origine géographique différente de celle de la souche parasitaire (**Mouchet et al., 2004**).

1.1.2. Cycle biologique

Le cycle du parasite peut se décomposer en 3 phases successives : d'abord une phase dans un organe profond chez l'hôte vertébré (phase exo érythrocytaire), puis une phase sanguine chez ce même hôte vertébré (phase érythrocytaire) et enfin une dernière phase chez le moustique (phase sporogonique).

1.1.2.1. Phase exo érythrocytaire ou hépatique

Au cours de son repas sanguin, l'anophèle femelle infectée inocule des sporozoïtes dans un capillaire sanguin. Les sporozoïtes, stade infectant pour l'homme, transitent dans la circulation générale en une demi-heure et envahissent les hépatocytes pour déclencher la schizogonie hépatique (**Frevert, 2004**).

Chez *P. falciparum* et *P. malariae*, le sporozoïte se multiplie et se différencie en schizontes hépatiques matures multinucléés (40 à 100 μ). Ce schizonte hépatique en grandissant va faire

éclater la cellule hôte et libérer des dizaines de milliers de nouveaux stades, les mérozoïtes, qui, après passage dans la circulation générale vont envahir les érythrocytes.

Chez *P. vivax* et *P. ovale* les sporozoïtes inoculés peuvent demeurer latents sous forme de cryptozoïtes ou hypnozoïtes (**Krotoski et al., 1989**). Ainsi, s'expliquent les formes « retard » de la maladie qui peuvent survenir plusieurs années après le départ de la zone d'endémie. Il existe aussi des formes « retard » chez *P. falciparum* (1 à 2 ans) et chez *P. malariae* (jusqu'à 25 ans), mais elles ne sont pas dues à des cryptozoïtes. On pense plutôt à des formes latentes sanguines.

Chez les 4 espèces plasmodiales humaines, il n'existe pas de cycle hépatique secondaire, avec envahissement de nouveaux hépatocytes à partir de l'éclatement d'un schizonte hépatique de primo infection. Cette phase hépatique vise à compenser les pertes de sporozoïtes occasionnées par l'immunité anti-sporozoïte pendant la phase de migration sanguine mais aussi par le système réticulo-endothélial des organes filtres (foie et rate). En effet, très peu des sporozoïtes inoculés semblent se transformer en schizonte hépatique.

1.1.2.2. Phase érythrocytaire

Les mérozoïtes hépatiques ont eux aussi une phase de migration sanguine pendant laquelle ils sont théoriquement vulnérables. Cependant, la variation antigénique leur permet d'échapper aux mécanismes immunitaires (voir le § 1.4.3). Après l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes, le développement du parasite commence d'abord par le stade trophozoïte uni-nucléé avec sa forme typique en anneau. Le stade jeune évolue en forme trophozoïte mûre, mesurant 2 à 3 μ et possédant une volumineuse vacuole nutritive qui refoule en périphérie le cytoplasme et le noyau. Le parasite continue son développement, grossit et se multiplie en un stade pluri-nucléé, le schizonte érythrocytaire qui se charge de pigment malarique brun ou hémozoïne résultant de la digestion des constituants de l'érythrocyte, notamment l'hémoglobine. La multiplication des noyaux, dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique, forme un schizonte mûr ou « corps en rosace ». Le corps en rosace va éclater et libérer 16 à 32 nouveaux mérozoïtes qui vont envahir de nouveaux érythrocytes et effectuer de nouveaux cycles schizogoniques érythrocytaires secondaires. La parasitémie va ainsi se multiplier par 16 à 32 fois à chaque cycle et, lorsqu'une densité seuil sera atteinte, un accès palustre aigu pourra survenir. A moins que le système immunitaire arrive à contrôler cette flambée parasitaire (voir le § 1.4.3).

La lyse des érythrocytes est relativement synchronisée et chaque cycle érythrocytaire dure 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* et 72 heures pour *P. malariae*, rythmant ainsi les accès aigus périodiques.

Pour que la transmission du *plasmodium* de l'homme au moustique puisse se produire, une sous - population de stades sanguins asexués du parasite va dévier son cycle cellulaire et se développer en gamétocytes, cellules spécialisées pour la reproduction sexuée. C'est la « souffrance » des stades asexués, quelque soit le mécanisme, qui engage le parasite vers la gamétocytogénèse (Sinden, 1999). Il est établi que tous les mérozoïtes provenant d'un même schizonte sont tous "engagés", soit vers la prolifération asexuée, soit vers la différenciation sexuée (Bruce *et al.*, 1990). De plus, dans un même schizonte, chaque mérozoïte devient gamétocyte soit mâle soit femelle (Silvestrini *et al.*, 2000). Enfin, il n'existe qu'une assez faible proportion de schizontes engagés vers le cycle sexué, ce qui explique que les gamétocytes soient toujours beaucoup moins nombreux que les formes sanguines asexuées.

Le gamétocyte évolue en plusieurs stades différenciés chez *P. falciparum* (Sinden, 1983). La gamétocytogénèse dure environ 7 à 10 jours (Robert & Boudin, 2003). Donc la poussée gamétocytaire observée dans le sang résulte d'une ancienne poussée asexuée qui a été jugulée 7 à 10 jours avant. Pour les 3 autres espèces, le développement gamétocytaire est contemporain de la poussée asexuée qui lui a donné naissance.

A maturité, les gamétocytes restent dans le sang périphérique de l'homme et ils ne vont continuer leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle au cours de son repas sanguin. C'est donc en changeant d'hôte, à partir de ce stade physiologiquement bloqué, que le *Plasmodium* peut continuer son cycle et assurer sa dissémination. Le système immunitaire semble relativement inefficace sur les formes sexuées du parasite. En effet, seule une phagocytose des hématies parasitées par les formes sexuées s'observe au niveau des organes filtres, notamment la rate. La durée de vie d'une poussée gamétocytaire semble évoluer de manière exponentielle avec une demi-vie courte de 2,5 jours et une persistance à un faible niveau dans le sang périphérique qui peut atteindre 1 mois (Smalley & Sinden, 1977).

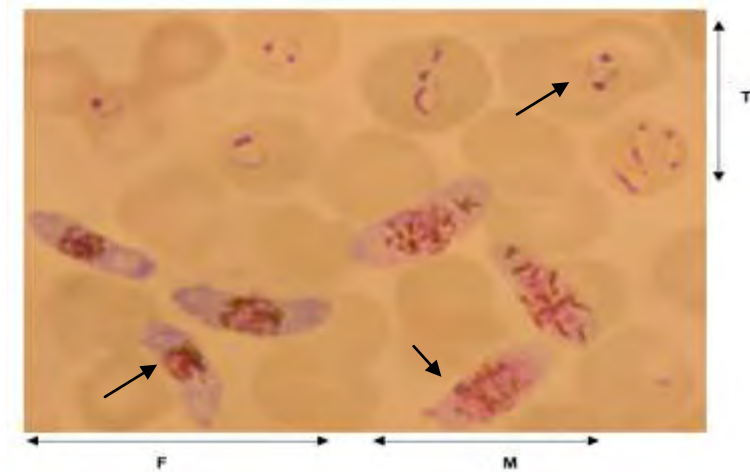


Figure I : Illustration des formes sexuées (gamétocytes) et asexuées (trophozoïtes) de *P. falciparum* sur un frottis de sang infecté.

T représente la zone des trophozoïtes jeunes ou mûrs, tandis que *M* et *F* représentent les zones des formes gamétocytaires mâle (rose) et femelles (bleu).

1.1.2.3. Cycle sporogonique chez le moustique

A l'occasion d'un repas sanguin chez un homme porteur de gamétocytes l'anophèle femelle pique et aspire avec le sang, tous les stades du développement du parasite. Seules les formes sexuées (les gamétocytes) sont capables de poursuivre leur développement chez le vecteur. Les autres formes meurent et sont digérées.

Dans l'estomac du moustique, le gamétocyte mâle et femelle se transforment respectivement en 8 microgamètes mâles et 1 macrogamète femelle. C'est la période de gamétogénèse. L'activation en gamètes a lieu entre 7 et 10 minutes après le début du repas sanguin. La diminution de température, l'élévation de pH et l'exposition à des molécules du moustique tel que l'acide xanthurénique, sont autant de facteurs impliqués dans l'induction de l'activation (Billker *et al.* 1998).

La fécondation a lieu lorsque l'un des microgamètes fusionne avec un macrogamète pour former d'abord un zygote (œuf), puis un ookinète très mobile. Suite à la fusion des gamètes, le génome diploïde est immédiatement réduit au stade haploïde au moyen d'une méiose (Janse & Mons, 1987). L'ookinète est une forme invasive asexuée qui traverse activement la paroi de l'estomac de l'anophèle et se fixe au niveau de la membrane basale externe donnant naissance à l'oocyste.

En une dizaine de jours (durée variable selon l'espèce de moustique, l'espèce de parasite et la température ambiante), l'oocyste grossit et des sporozoïtes fusiformes (8 à 12 μ de long) s'individualisent. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, les sporozoïtes gagnent avec

prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Le moustique devient alors infectant et le restera pendant toute sa vie (environ un mois) (**Kaiser et al., 2004**).

Cette étape est habituellement dénommée « cycle » sporogonique, bien qu'il n'y ait pas de cycle à proprement parler. C'est une étape de multiplication cruciale du parasite qui vise à compenser les pertes parasitaires lors de la souffrance des formes sanguines et lors du passage hasardeux des formes sexuées chez le moustique. Elle a une durée variable (entre 12 à 21 jours) selon la température extérieure et l'espèce parasitaire.

Ainsi le *Plasmodium* subit plusieurs phases de multiplication (schizogonie hépatocytaire et érythrocytaire, sporogonie) qui visent à compenser les pertes parasitaires dues à des facteurs externes (système immunitaire de l'hôte, organes filtres, système de défense du moustique, aléas des migrations chez l'homme et le moustique).

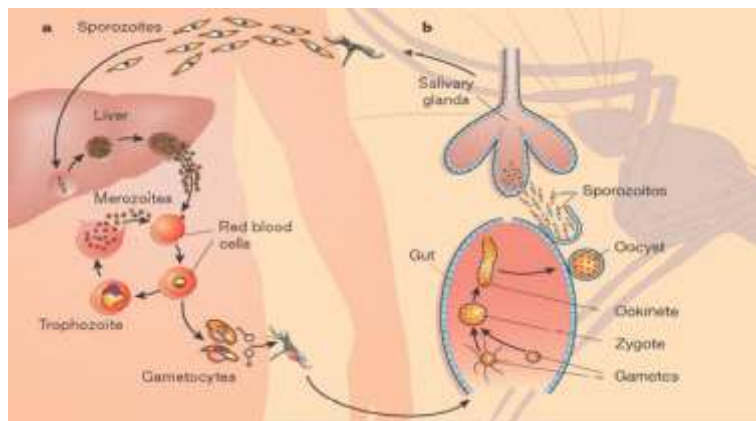


Figure II : Cycle de développement du *plasmodium falciparum* (d'après Wirth, 2002)

1.2.Biologie du vecteur

1.2.1.Taxonomie

L'anophèle est un insecte de l'ordre des diptères appartenant à la famille des culicidés. Ces derniers forment trois sous-familles principales : Les anophélinés, les aediné, et les culicinés. Chez les anophélinés, seul le genre *anopheles* peut permettre le développement complet du *plasmodium*. Il existe plusieurs espèces d'anophèles de capacité vectorielle différentes selon les continents. En Afrique où la maladie sévit le plus, les principales espèces vectrices appartiennent au complexe *An gambiae* et au groupe *An funestus*. Mais il existe aussi des espèces vectrices spécifiques à certaines régions et de très nombreuses autres espèces non ou occasionnellement vectrices (**Carnevale et al., 1984**).

Les classiques espèces anophéliennes sont actuellement subdivisées en « complexe ou groupe d'espèces » douées de capacités vectorielles très différentes et sélectionnées sur le plan génétique par des particularités environnementales. C'est ainsi que le complexe d'espèce *An.*

gambiae est actuellement scindé en 7 espèces qui ne se reproduisent pas ou très peu entre elles (**Fontenille et al. 2003**). Les entomologistes vont encore plus loin et identifient, pour certaine espèce des formes chromosomiques ou moléculaires (**Fontenille et al. 2003**) ayant des compétences vectorielles différentes et des spécificités écologiques.

1.2.2.Phase aquatique larvaire

Les gîtes de ponte varient selon l'espèce anophélienne. Ce sont des collections d'eau permanentes ou temporaires (persistant au moins dix jours consécutifs), claires ou polluées, douces ou saumâtres, ensoleillées ou ombragées. Dans l'eau, des œufs sont pondus isolément et restent en surface durant l'embryogénèse. De chaque œuf éclôt une seule larve. La larve aquatique des anophèles se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Du fait d'un tégument chitineux inextensible, il y a trois mues larvaires séparant 4 stades de développement. Le quatrième stade effectue une mue particulière : la nymphose qui aboutit à une nymphe aquatique mobile qui ne se nourrit plus (figure 3). De profonds remaniements de la morphologie s'effectuent au cours du stade nymphal. Les organes propres au stade larvaire sont détruits. Les organes caractéristiques de l'adulte, présents à l'état d'ébauches dans la larve, apparaissent. De la nymphe, émerge un adulte (mâle ou femelle) qui s'envole rapidement.

1.2.3. Phase aérienne adulte

C'est au cours de la phase aérienne que s'effectue l'insémination de la femelle néonate. Les spermatozoïdes sont introduits dans la bourse copulatrice de la femelle puis ils migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant jusqu'à la mort de la femelle. Donc les différentes pontes d'une même femelle seront systématiquement fécondées sans nouvelle copulation.

La femelle ne peut pondre qu'après un repas sanguin pris sur l'homme ou sur animal. Le cycle de maturation ovarienne est de 2 à 3 jours, si bien qu'un anophèle femelle doit rechercher un hôte vertébré préférentiel tous les 2 ou 3 jours. La femelle ne s'écarte que très peu de cette source alimentaire entre les repas sanguins. Le moustique mâle ou femelle se repose dans des caches ombragées, chaudes et humides et se nourrit de nectar entre les repas sanguins.



Figure III : Cycle de développement d'un anophèle (d'après J. Brunhes *et al.* les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM ed, 1998)

1.3. Clinique du paludisme

Le paludisme est généralement une infection chronique silencieuse dans laquelle le parasite vit en harmonie avec son hôte. Ainsi, en zone de transmission intense et permanente, la quasi totalité des individus est porteuse de *Plasmodium*. De temps en temps, sous l'effet d'une baisse temporaire de l'état général ou après une inoculation massive de sporozoïtes, une crise aigue, appelée accès palustre peut se manifester. Elle peut parfois se compliquer, selon le niveau de la densité parasitaire et les réactions immuno-pathologiques de l'homme. Généralement c'est l'absence d'un traitement bien conduit ou la résistance du parasite au traitement qui peuvent être responsables de ces complications.

1.3.1. Accès simple

D'après l'OMS un accès palustre se définit en zone d'endémie comme une fièvre isolée, associée à une forte parasitémie. Mais dans cette définition se pose le problème du seuil pathogène c'est-à-dire de la densité parasitaire à partir de laquelle la fièvre est observée. En fait, ce seuil est variable selon les zones d'endémie, l'âge des patients et l'espèce parasitaire en cause. (Rogier *et al*, 2002). Dans ces conditions, le seuil pathogène encore appelé seuil pyrogène est très variable et ne peut pas servir d'argument diagnostique formel. Sur le plan épidémiologique, pour suivre l'évolution de la morbidité palustre dans une population, on pourra utiliser arbitrairement un seuil de densité parasitaire donnant un risque de fièvre significatif (Armstrong-Schellenberg *et al.*, 1994). Mais dans la pratique clinique, le diagnostic d'accès palustre repose sur un examen biologique qui montre une forte densité parasitaire accompagnant une fièvre isolée. On comprend tout de suite la difficulté du

diagnostic d'accès palustre en zone d'endémie où toute la population héberge des parasites en plus ou moins grand nombre. La fièvre chez le malade du paludisme est due à l'abondance des toxines libérées lors des fortes parasitémies. Ces toxines sont responsables de l'activation des macrophages qui sont à l'origine des poussées de TNF (Tumors Necrosis Factor) lui-même libéré par des macrophages préalablement activés par divers antigènes plasmodiaux dont les toxines (**Kwiatkowski 1995**). Cependant, on ignore encore pourquoi certaines fortes parasitémies demeurent asymptomatiques chez les individus prémunis? L'hypothèse la plus probable stipule qu'une immunité « anti-toxique » se développerait progressivement et interromperait la cascade déclenchée par la libération des toxines plasmodiales (**Clark et al., 2004**). Cette immunité anti-toxique est encore peu étudiée.

1.3.2. Les complications

Les complications attribuées au paludisme sont de plusieurs ordres. Les plus fréquemment citées sont entre autre:

1.3.2.1. L'accès pernicieux

L'accès pernicieux ou paludisme neurologique s'observe uniquement avec *P. falciparum*. Il pourrait être provoqué par les schizontes érythrocytaires qui adhèrent au système endothélial des capillaires et se multiplient dans les viscères profonds, entraînant une anoxie tissulaire et des troubles de la circulation (**WHO, 2000**). En fait, les mécanismes physiopathologiques de l'accès pernicieux sont vraisemblablement plus complexes et multiples. Les signes cliniques sont souvent d'ordres neurologiques, à cause d'une localisation dans les capillaires cérébraux (**Kristensson et al., 2002**). Les accès pernicieux sont dans la plupart des cas réversibles sous traitement précoce bien conduit, mais 20% (**Imbert., 2002**) des malades peuvent en mourir. En Afrique, moins de 10% (**Newton et al., 2000**) des enfants atteints du neuropaludisme présentent des séquelles neurologiques.

1.3.2.2. L'anémie

L'anémie sévère est l'une des causes principales de mortalité dans le paludisme à *P. falciparum*. Elle résulte de plusieurs mécanismes (**Nagel, 2002**):

- la lyse des hématies parasitées du fait de l'activité hémolytique exagérée du système phagocytaire (réticulo endothélial) principalement dans la rate.
- de phénomènes immuno-pathologiques détruisant des hématies saines ;
- d'une diminution de l'hématopoïèse.

Cette anémie s'accompagne d'une splénomégalie liée à l'activité phagocytaire des histiocytes vis à vis des hématies parasitées et de l'hyper - réactivité des formations lymphoïdes qui synthétisent des anticorps. On observe aussi une hépatomégalie et un éventuel subictère liés à l'activité phagocytaire des cellules de Küpffer et à la dégradation en bilirubine de l'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse.

1.4. Immunologie du paludisme

Par la définition même du parasitisme, le *Plasmodium* doit survivre chez un hôte immunologiquement hostile sans le tuer. Il existe donc un équilibre instable entre les mécanismes d'évitement mis en jeu par le parasite et les mécanismes protecteurs ou pathologiques mis en jeu par l'hôte.

L'organisme humain va développer plusieurs types d'immunités. Parmi les mécanismes immunologiques, certains seront de simples témoins de l'infection, d'autres seront protecteurs et détruiront le parasite et d'autres occasionneront des réactions immuno - pathologiques. Chaque mécanisme sera spécifique de stade et d'espèce. Ainsi, il est possible de caractériser de nombreux types d'immunité protectrice (prémunition, anti-maladie, TBI, anti-sporozoïte).

Parallèlement, le parasite est capable de mettre en jeu des mécanismes d'évitement de la réponse immune, (1) soit en se protégeant dans une cellule, (2) soit en occasionnant une immuno - dépression, (3) soit en acquérant des antigènes d'hôtes ou (4) en variant ses propres antigènes de surface afin de se déguiser et d'échapper aux mécanismes de défense.

Quand les conflits antigène - système immunitaire deviennent trop intenses et inflammatoires, on assiste alors au développement de réactions immuno - pathologiques qui viennent encore compliquer le tableau immunologique et clinique.

1.4.1. Les principaux antigènes parasitaires

Le parasite est constitué d'une multitude d'antigènes (somatiques, métaboliques, internes, externes, ou secrétés) qui entraînent le plus souvent des réponses immunes spécifiques (humorales, cellulaires, ou mixtes). En outre, ces antigènes peuvent être communs à toutes les espèces de *Plasmodium*, ou spécifique d'espèce, ou vont changer en fonction du stade de développement (spécifiques de stade).

Parmi les différents antigènes plasmodiaux, certains vont n'avoir aucun rôle apparent, d'autres vont être de simples témoins de l'infection et quelques uns vont posséder des propriétés physiologiques importantes pour le parasite (antigènes fonctionnels). Certains

antigènes externes au parasite ou secrétés, pourront être une cible prioritaire pour le système immunitaire car facilement accessibles. D'autres seront « exposés » à la surface des cellules parasitées (hépatocytes et globules rouges) et pourront avoir un rôle physiologique important (cytoadhérence) ou permettre le déguisement du parasite pour échapper aux mécanismes de défense.

Une des caractéristiques des antigènes fonctionnels que le parasite doit à tout prix « protéger » est de pouvoir changer de constitution chimique au gré de la pression immune. Ainsi certains antigènes seront-ils « variants » ou polymorphes. Tous les antigènes « fonctionnels » ne sont probablement pas encore connus. Cette brève revue permet de mieux comprendre la complexité de la réponse immune de l'hôte.

Parmi les antigènes fonctionnels du sporozoïte, il est habituel de citer la CSP (**Myang et al., 2004 ; Menard et al. 1997 ; Nussenzweig & Zavala 1997 ; Schofield 1990 ; Nussenzweig & Nussenzweig 1989**) et la TRAP (**Dolo et al., 1999, Hollingdale et al., 1998 ; Robson et al., 1998 ; Sultan et al., 1997**) exprimés à la surface des sporozoïtes. Ces antigènes ont un rôle sur la maturation des sporozoïtes, sur leur reconnaissance des récepteurs tissulaires et sont des cibles privilégiées pour le système immunitaire. D'autres molécules sont exprimées à la surface de l'hépatocyte infectés. C'est le cas de LSA-1 et 2 (**Kurtis et al., 2001 ; Hoffman & Doolan 2000 ; Nardin et al., 1999 ; Hollingdale et al., 1998**).

Chez le trophozoïte on trouve du MSP (**Hoessli et al., 2003 ; Tanabe et al., 2000 ; Holder et al., 1999**) principal antigène de surface variant permettant la survie du parasite ; et des antigènes de rhoptrie qui pourraient intervenir dans la reconnaissance et la pénétration des hématies (**Collins et al. 2000 ; Sam-Yellowe 1996**).

Chez le schizonte érythrocytaire on a décrit des antigènes de cytoadhérence (PfEMP) qui permettent au parasite d'adhérer à l'endothélium des capillaires profonds (**Duffy & Fried 2003 ; Baruch et al. 2002 ; Pouvelle et al. 2000 ; Baruch et al. 1996**).

Chez le gamétocyte on a isolé des protéines Pfs 48/45 kD et Pfs 230 kD qu'on retrouve en surface chez les stades précoces du cycle sporogonique (zygote et ookinète), désignant ces stades comme cible des anticorps anti-sexués ingérés avec le repas sanguin (**Niederwieser et al. 2001 ; van Dijk et al. 2001 ; Kumar et al. 1995**). On a aussi observé la synthèse de Pfs 25 kD exprimé à la surface des ookinètes et des oocystes jeunes et qui pourrait faciliter la migration du parasite à travers l'épithélium digestif du moustique (**Roditi & Liniger 2002 ; Sauerwein & Eling 2002 ; Kaslow 1992 ; Lensen et al. 1992 ; Fries et al. 1990**). Ce néo-antigène n'étant jamais en contact avec le système immunitaire humain, il n'existe pas de

mécanismes de défense naturel, mais du fait de sa fonction c'est un candidat vaccin de premier plan.

Enfin il existe des antigènes internes du parasite. Ils ne jouent probablement aucun rôle en ce qui concerne l'immunité protectrice. Ils sont excrétés soit au cours du développement des schizontes, soit libérés au moment de la rupture des schizontes. En revanche, ces antigènes peuvent avoir un rôle important dans l'immunopathologie du paludisme car certains sont extrêmement immunogènes, comme les toxines du parasite (**Clark & Cowden 2003 ; Schofield 1997 ; Taverne et al. 1996**). Ils peuvent aussi jouer un rôle dans le diagnostic immunologique du paludisme.

1.4.2.L'immunité protectrice

Face à cette multitude d'antigènes il y a des réponses immunitaires spécifiques, humorales, cellulaires ou mixtes qui peuvent occasionnellement détruire le parasite, notamment pendant les phases de migration libre du parasite (sporozoïte, mérozoïte, formes sexuées chez le moustique). Les mécanismes sont nombreux et le plus souvent spécifiques d'espèce et de stade. Ces mécanismes complexes ne sont pas encore tous compris, notamment chez l'homme. Il devient donc possible d'identifier un certain nombre d'immunités spécifiques et protectrices, spécifiques de stade. (**Ballou et al. 2002 ; Baruch et al. 2002 ; Berzins 2002 ; Dimopoulos et al. 2002 ; English & Newton 2002 ; Hollingdale & Krzych 2002; Troye-Blomberg 2002**).

On peut citer également l'immunité antitoxique (ou anti - maladie) (**Clark et al. 2003 ; Boutlis et al. 2002**) et la TBI que nous développerons plus loin (**Kaslow 2002**).

A côté de ces immunités spécifiques, on a aussi caractérisé une immunité spéciale, connue de longue date (**Sergent, 1963**) appelée prémunition. Chez l'individu impaludé vivant en zone d'endémie, on note une diminution de la parasitémie parallèle à une augmentation progressive des anticorps antipalustres et des cellules spécialisées. Cette immunité est d'autant plus efficace que l'expérience palustre est importante et prolongée. Elle s'acquière très lentement, mais peut disparaître assez vite quand le stimulus antigénique disparaît, notamment chez des sujets migrant vers des zones non impaludées (**Wery, 1995**). Elle conduit à une réduction des charges parasitaires circulantes, sans jamais être stérilisante, ce qui permet la persistance du stimulus antigénique. Les mécanismes de cette prémunition sont encore inconnus chez l'homme. Il est très probable qu'un certain nombre d'immunités spécifiques rentrent dans la composition de cette prémunition.

1.4.3. Les mécanismes d'évitement

Le parasite peut contourner les mécanismes de défenses de l'hôte et assurer sa survie chez cet hôte immunologiquement hostile, en développant différentes stratégies.

♦ La variation et le polymorphisme antigénique (**Duffy et al., 2003 ; Dean et al., 2002 ; Kyes et al., 2001 ; Bruce et al., 2000 ; Newbold, 1999**) permettent au parasite de changer la composition protéique de certains antigènes de surface en sélectionnant certains gènes sous l'effet de la pression immune environnante. Les néo-antigènes ne sont alors plus reconnus par l'hôte qui doit monter une nouvelle réponse immune. Ce délai permet au parasite de survivre. En cas de polymorphisme antigénique de certains antigènes de surface, ceci occasionne une « dilution » de la réponse immune spécifique de chaque variant.

♦ La localisation intracellulaire permet au parasite d'être à l'abri des anticorps et cellules immuno - compétentes. Cependant le parasite émet des antigènes parasitaires à la surface de certaines cellules hôte (globules rouges et hépatocytes). Certains antigènes interviennent dans la cytoadhérence, les mécanismes de cytotoxicité ou servent à monopoliser le système immunitaire (**Newbold et al. 1999 ; Bull et al. 1998 ; Mazier et al. 1997 ; Holder, 1994**). Ils sont éminemment variables, car soumis à une forte pression immunologique.

♦ On peut rapprocher la synthèse, par le parasite, de certains antigènes d'hôte. Ces antigènes parasitaires sont reconnus par le système immunitaire comme appartenant à l'hôte et donc ne déclenchent pas de réponse immune. Le parasite peut ainsi se déguiser derrière ce paravent (**Abu-Shakra et al. 1999 ; Nowack 1995**).

♦ Dans le dysfonctionnement de la réponse immunologique de l'hôte, le parasite perturbe la réponse spécifique.

1.4.4. Les réactions immuno-pathologiques

Lors des fortes poussées parasitaires, de nombreux antigènes solubles sont sécrétés et complexés par les anticorps spécifiques. La formation d'immun - complexes occasionne une stimulation des macrophages qui les phagocytent. Les macrophages activés synthétisent des cytokines inflammatoires responsables de troubles pathologiques très différents en fonction de l'endroit où se déroulent ces phénomènes. C'est ainsi qu'on peut expliquer la plupart des complications du paludisme comme l'accès pernicieux, l'anémie, mais aussi le syndrome de splénomégalie tropicale et la néphrite aiguë ou chronique (**Hunt & Grau 2003 ; Miller et al. 2002 ; Angulo & Fresno 2002 ; Chen et al. 2000**).

Ce survol de l'immunité antipalustre montre bien la complexité du problème. Il faut retenir toutefois que la plupart des mécanismes ont été démontrés avec des modèles expérimentaux, et qu'il est difficile, voir impossible, de disséquer la réponse immune chez l'homme. Une chose demeure formelle, c'est qu'une immunité protectrice anti parasitaire existe. Elle est d'installation progressive, dépend du niveau du stimulus antigénique, et n'est pas stérilisante. Elle suffit néanmoins à contrôler les poussées parasitaires donc les accès aigus et les complications.

1.5.Le diagnostic

Un test biologique est capital pour assurer le diagnostic d'accès ou d'infection palustre. Dans la plupart des pays d'Afrique, le diagnostic d'accès palustre se fait seulement sur des symptômes évocateurs mais non spécifiques. Même les médecins spécialistes en paludologie se trompent dans 50% des cas lorsqu'ils portent le diagnostic d'accès palustre sur les seuls critères cliniques. Autrement dit une grande partie des traitements ne sont pas justifiés. Ce genre de situation favorise l'apparition rapide des cas de résistance du parasite aux médicaments.

Pour éviter ces fausses médications, on dispose de deux types de test biologiques : les tests directs qui permettent de mettre en évidence le parasite avec certitude et les tests indirects qui ne permettent pas d'affirmer l'infection.

1.5.1.Diagnostic direct

1.5.1.1. Les étalements sanguins

Pour diagnostiquer la présence du parasite dans le sang, deux types d'étalement sanguins peuvent être employés : le frottis mince et la goutte épaisse.

Dans le frottis, on réalise un prélèvement capillaire au bout d'un doigt avec confection immédiate d'un frottis mince. Cet examen sanguin permet l'appréciation de la densité parasitaire en pourcentage d'érythrocytes parasités. Il permet aussi de déterminer l'espèce.

Quant à la goutte épaisse, il s'agit d'une technique de concentration des hématies. On dépose 3 gouttes de sang capillaire sur la lame. Les hématies sont étalées grossièrement, séchées, puis lysées pour ne laisser sur la lame que les globules blancs et les parasites assez facilement identifiables malgré les déformations dues à l'étalement. L'estimation de la densité parasitaire se fait en faisant la numération des parasites par rapport aux leucocytes. L'étalement sanguin reste la méthode de référence la plus économique pour le diagnostic du paludisme.

1.5.1.2. Les tests d'ADN

La Polymérase Chain Reaction (PCR) ou technique d'amplification génique, repère dans un prélèvement, à l'aide d'amorces synthétiques, une séquence nucléotidique sélectionnée ; et la multiplie au moyen de cycle de polymérisation. La quantité d'ADN parasite est ainsi amplifiée et facilement détectable même quand la parasitémie circulante est très faible. La Polymérase Chain Réaction est certainement la technique la plus sensible (**Urdaneta et al. 1998**). Elle permet de détecter des infections mixtes. Cette technique est également utilisée dans les études de chimiorésistance (**Snounou & Beck 1998**) et en épidémiologie. Elle permet d'estimer le nombre de souches circulantes (**Contamin et al. 1995**). En revanche elle ne peut répondre au diagnostic d'urgence sur le terrain, car étant très coûteuse et nécessitant un équipement et une compétence très particulière.

1.5.2. Diagnostic indirect

1.5.2.1. Test des bandelettes réactives ou test rapide

Les antigènes sécrétés par le *plasmodium* dans le courant sanguin peuvent servir à faire un diagnostic biologique. C'est notamment le cas de certains enzymes parasites (**Craig et al. 2002**). Cette protéine est détectée dans le plasma des personnes infectées, notamment quand la densité parasite est importante. Ces tests diagnostiques se font à partir d'une bandelette de nitrocellulose imprégnée d'anticorps dirigés contre les antigènes du parasite. Pour pratiquer ce test on dépose une goutte de sang sur la bandelette pour faire réagir d'éventuels antigènes du parasite avec l'anticorps spécifique de la bandelette. Il y a alors formation d'un immun complexe, se traduisant par une coloration localisée au niveau de la bandelette. Ces tests se font rapidement avec une grande simplicité et à partir de sang capillaire. Cependant, l'antigène recherché peut persister 15 jours après la clairance parasitaire, d'où la possibilité d'obtenir de faux positifs chez des sujets guéris. Par ailleurs ce test est relativement coûteux.

1.5.2.2. La sérologie

Le principe consiste à rechercher des anticorps antipalustres dans le sérum. Ils sont détectés par des antigènes spécifiques en utilisant des techniques diverses comme l'hémagglutination passive, l'immunofluorescence indirecte et surtout l'ELISA (**Bidwell & Voller, 1981**).

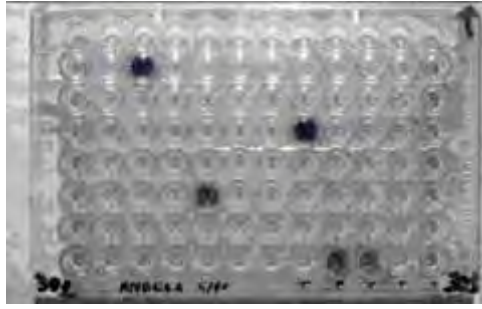


Figure IV : Plaque de microtitration pour ELISA

Cette technique est relativement facile et peu onéreuse. La lecture peut se faire à l'œil nu en faisant la comparaison avec un témoin positif, ou automatiquement à l'aide d'un spectrophotomètre. En outre cette technique permet de tester un grand nombre de sérums en même temps. L'inconvénient de ce test est qu'il peut engendrer des réactions croisées entre l'antigène de capture et d'autres anticorps non spécifiques du paludisme.

Le gros problème des tests sérologiques est qu'ils mettent en évidence des anticorps témoins d'une infection, mais que ces anticorps persistent longtemps après la disparition de l'infection. Ils ne sont donc d'aucune valeur diagnostic.

1.6. L'épidémiologie du paludisme

1.6.1. Répartition géographique

Le paludisme est endémique dans la ceinture tropicale et équatoriale du globe. Il sévit en particulier sur le continent africain, mais aussi sur une partie de l'Amérique du sud, au Moyen Orient et en Asie du sud-est (voir figure V). Cette répartition diversifiée est sans doute liée à quatre paramètres essentiels : (1) les conditions optimales de développement des moustiques, (2) la présence d'un réservoir endémique de parasites, (3) l'existence d'une ou plusieurs espèces vectrices et (4) des rapports homme - vecteurs fréquents. C'est naturellement dans la ceinture tropicale et équatoriale du globe qu'on rencontre ces quatre conditions rassemblées.

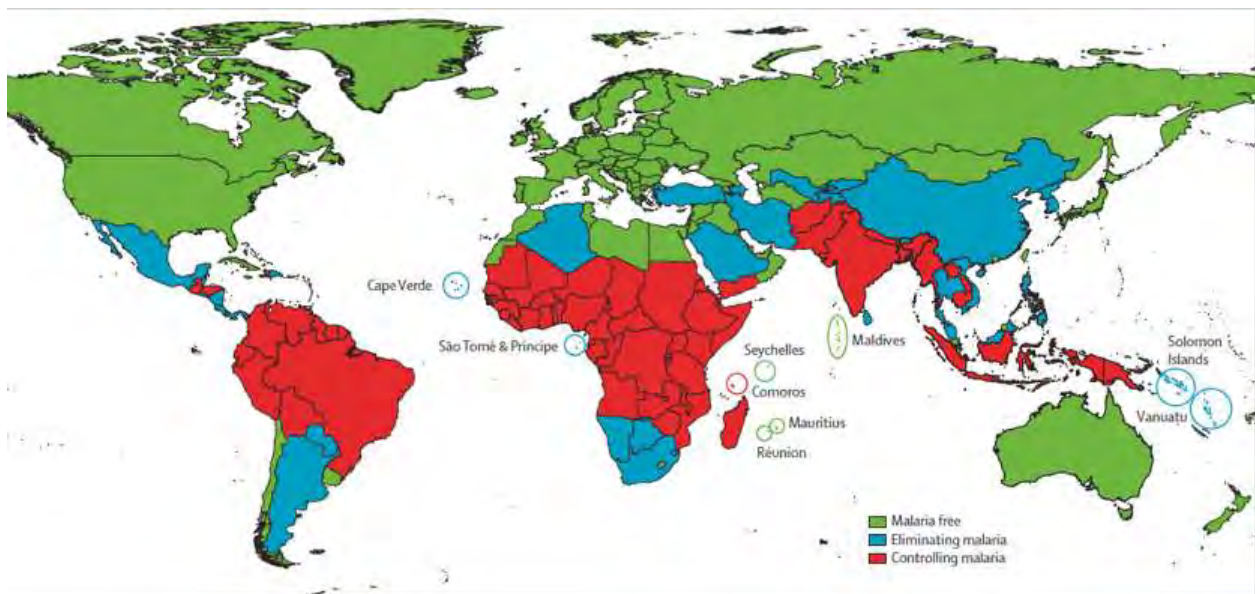


Figure V : Zones impaludées dans le monde (OMS, 2011)

La répartition des espèces plasmodiales est différente. *P. falciparum* s'observe partout sous forme endémique ou parfois épidémique. *P. malariae* est aussi largement distribué, mais sous forme de petits foyers localisés, dans lesquels existent des conditions hyper favorables à la longue survie du vecteur. Les foyers de *P. ovale* sont cantonnés en Afrique centrale. *P. vivax* n'existe pratiquement pas en Afrique noire, mais se retrouve partout ailleurs dans la ceinture tropicale et équatoriale.

La répartition de chaque espèce vectrice a été résumée dans l'excellent ouvrage de **Mouchet et al., 2006**.

1.6.2. Les tentatives de rationalisation de l'endémie palustre

L'épidémiologie du paludisme est l'étude de tous les facteurs pouvant intervenir pour expliquer cet équilibre instable entre l'hôte, le parasite et le vecteur. Nous avons précédemment survolé les facteurs immunologiques. Nous aborderons plus loin et en détail les facteurs contrôlant la transmission du parasite à l'homme ou au vecteur. Ici nous décrivons l'hétérogénéité des situations épidémiologiques avec le rôle des facteurs environnementaux ou climatiques ainsi que des modifications de cet environnement, introduites par l'homme.

Pour mieux cibler les moyens de lutte qui sont très coûteux à l'échelon d'une population, les chercheurs ont essayé de définir certaines zones d'endémie homogène. Divers indicateurs ont été utilisés comme la fréquence et la taille moyenne de la splénomégalie chez les enfants de 2-9 ans (**Classification de Kampala, 1950**), ou les niveaux de la prévalence parasitaire chez les enfants non prémunis (**Classification de Yaoundé, 1962**). Ainsi une première classification

en 4 strates (hypo, meso, hyper et holoendémique) a été grossièrement définie. Mais elle s'est avérée très vite insuffisante compte tenu de la diversité épidémiologique au sein d'une même strate.

Depuis longtemps les entomologistes ont mis au point des indicateurs de transmission en piqûres infectées par homme et par an. Mais ces indicateurs sont assez grossiers et ne donnent qu'un aperçu très focalisé de la situation générale. Ils servent tout de même pour estimer un niveau de transmission, en sachant que ce niveau présente de très nombreuses variations annuelles en fonction des saisons et d'une année sur l'autre (**Fontenille et al. 1997**), ce qui exige de multiplier les mesures. Pour l'instant ce sont les indicateurs les plus utilisés pour comparer une situation épidémiologique avant et après intervention humaine sur l'environnement ou introduction d'une stratégie de lutte.

La littérature a montré une relation entre le niveau de transmission (en piqûres infectées par homme et par an) et la prévalence ou la densité parasitaire moyenne dans la population et la morbidité chez l'enfant (**Beier et al., 1999, Charlewood et al., 1998 ; Smith et al., 1998 ; Snow & Marsh 1998**). Il ne fait aucun doute que le développement progressif d'une immunité protectrice intervient sur les niveaux de parasitémie chez l'individu ou les populations et est fonction du niveau de transmission. Ainsi arrive-t-on à ce paradoxe d'un paludisme bien supporté dans les zones hyper et holoendémique, du fait du développement et du maintien d'une prémunition efficace, tandis que la mortalité et la morbidité restent importantes dans les zones hypo à mésoendémiques, avec une transmission saisonnière courte qui n'est pas favorable à l'acquisition et au maintien d'une immunité protectrice solide (**Fleming, 1997 ; Lines 1997 ; Molineaux 1997 ; Saul, 1997**). Il est malheureusement impossible à l'heure actuelle de mesurer le degré de prémunition acquise par une population, ni la part de la mortalité due au paludisme (possible dans certaines études). Ces indicateurs essentiels ne sont donc pas encore intervenus dans les classifications épidémiologiques.

Les épidémiologistes ont modélisé récemment les relations entre caractéristiques géographiques et risque de transmission (**Hay et al., 2000 ; Craig et al., 1999 ; Snow et al., 1999**). Il est encore trop tôt pour connaître les véritables implications pratiques d'une telle modélisation.

1.7. Les moyens de lutte antipaludique

Les stratégies de lutte engagées contre le paludisme depuis près d'un demi-siècle n'ont connu jusqu'ici que des succès sporadiques et à court terme. Ceci est probablement dû à la grande

faculté d'adaptation du vecteur et du parasite. On peut schématiquement distinguer les moyens de lutte contre le *Plasmodium* et ceux contre l'anophèle.

1.7.1. La lutte antiparasitaire

Elle repose à l'heure actuelle sur 3 stratégies différentes et complémentaires : la chimiothérapie, la chimioprophylaxie et la vaccination.

1.7.1.1. Les médicaments

On dispose actuellement de 6 grandes familles de médicaments qui agissent soit sur les schizontes, soit sur les gamétocytes ou encore sur le cycle sporogonique.

- **Les alcaloïdes**

Les principaux représentants de ce groupe sont la quinine et la quinidine. Leurs principes actifs sont extraits à partir d'un arbre qu'on appelle le quinquilba. Ces molécules sont utilisées pour le traitement des accès palustres graves, car elles ont une action très rapide, avec cependant une demi-vie courte, exigeant la répétition des doses. Ce sont des schizonticides bien tolérés et administrables per os ou en injection (intramusculaire ou perfusion). Le traitement doit être prolongé au moins pendant 7 jours. On ne note que rarement des cas de résistance vis-à-vis de ces médicaments.

- **Les amino-4-quinoléines**

Les représentants de cette famille sont la chloroquine (CQ) et l'amodiaquine (AQ). Ce sont des schizonticides sanguins. Ils peuvent également agir sur les stades jeunes des gamétocytes. La CQ a été largement utilisée per os pour le traitement ou la prévention du paludisme à travers le monde. Le métabolisme n'exige qu'une dose par jour. Ces molécules sont peu toxiques et peu coûteuses. Utilisée en prophylaxie, la CQ peut toutefois provoquer des prurits, des pertes de mémoire ou des troubles de la vision à long terme (**Hatton C.S. et al. 1986**) tandis que l'amodiaquine peut entraîner des troubles de l'hématopoïèse, ce qui contre-indique son utilisation en préventif. Ces molécules sont en train de perdre leur efficacité à travers le monde entier, à cause de l'apparition de résistances, notamment avec *P. falciparum*. Cette chimiorésistance a probablement été favorisée par l'énorme pression médicamenteuse et par des campagnes de chimioprophylaxie mal conduites.

- **Les amino-8-quinoléines**

Ces médicaments sont gamétocytocides et agissent sur les formes hépatiques. Ils sont donc théoriquement associés au traitement de l'accès aigu, pour éviter toute poussée

gamétocytaire post-thérapeutique et toute rechute, notamment chez *P. vivax*. Le principal représentant est la primaquine. Ces amino-8-quinoléines sont toutefois déconseillés en Afrique noire et en Indonésie, à cause de leur toxicité sanguine en cas de déficience génétique à la G6PD (Clide, 1981), fréquente dans ces zones géographiques. Par contre ils restent efficaces dans les infections à *P. vivax* dans le reste du monde.

- **Les antimétaboliques**

Dans ce groupe on retrouve les sulfamides et les sulfones regroupés sous le nom d'antifoliques mais également les biguanides et les diaminopyrimidines, connus sous le nom d'antifoliniques. Ces molécules sont des schizonticides qui bloquent la synthèse de l'ADN parasite. Ils ont une action et une excrétion lentes et ne sont donc pas indiqués dans le traitement de l'accès palustre aigu. Ces molécules sont responsables de cas d'allergies et des nausées. Il faut généralement les associer à d'autres médicaments à cause de leur forte capacité à entraîner des résistances chez le parasite. Ils sont contre indiqués chez la femme enceinte. Ils peuvent avoir un effet gamétocytogène en faisant souffrir le parasite sans le tuer rapidement, ce qui lui laisserait le temps de dévier son cycle vers la gamétocytogénèse. L'association antifolique + antifolinique qui a l'avantage de se donner à dose unique, aurait en outre une activité sporontocide chez le moustique ce qui compenserait son activité gamétocytogène. Mais cette dernière activité n'est pas encore admise par tout le monde.

- **Le groupe des amino alcool**

Ce groupe de médicaments a été mis au point pour lutter contre les souches chloroquino résistantes, notamment en Asie du Sud-Est pendant la guerre du Vietnam. Ce groupe est réservé au traitement de l'accès palustre, quelque soit l'espèce en cause et comprend deux types de molécules : l'halofantrine et la méfloquine. Cependant, ces médicaments ont une certaine toxicité cardiaque (halofantrine) ou psychique (méfloquine) en prophylaxie prolongée. La méfloquine peut toutefois se donner à dose unique.

- **Les dérivés de l'artésunate**

L'artémisinine (ou qinghaosu) est un dérivé de la plante, *Artemisia annua*. Il est employé depuis plus de deux mille ans en Chine, pour traiter les fièvres associées au paludisme. Au cours de ces vingt dernières années, des dérivés synthétiques (Arteméter, Artésunate, Dihydroartémisinine, Artemotil) ont été commercialisés, mais ils restent très coûteux. Le métabolisme permet une seule dose par jour. Ces dérivés sont administrés par voie orale ou en suppositoire ou par voie parentérale. C'est le médicament de choix dans le paludisme multi-résistant. Ces molécules sont schizonticides et gamétocytocides. Pour préserver toute leur

efficacité, ces molécules doivent être utilisées en combinaison. Pour l'instant ces dérivés sont déconseillés chez la femme enceinte.

1.7.1.2. Les stratégies médicamenteuses

Le développement très rapide de la résistance à certains médicaments utilisés en monothérapie a conduit à rechercher de nouvelles molécules et à évaluer l'efficacité d'anciens traitements en combinaison. La stratégie actuellement recommandée par l'OMS est la polythérapie systématique des accès fébriles en période de transmission. De nombreuses combinaisons médicamenteuses sont actuellement à l'essai. La probabilité d'apparition simultanée d'une résistance à deux agents chimiothérapeutiques dont les mécanismes d'action sont différents est extrêmement faible. Cependant, cette polythérapie coûte beaucoup plus cher que la monothérapie aux amino-4-quinoléines et le nombre de comprimés à ingérer par jour est souvent prohibitif, ce qui risque de rebuter les patients et de favoriser les sous dosages.

A ce jour, seuls la quinine et les dérivés de l'artémisinine semblent épargnés par les phénomènes de résistance. On réserve donc la quinine au traitement de l'accès palustre grave en injections ; et les dérivés de l'artémisine au traitement de l'accès palustre simple et toujours en association. Un effort soutenu de recherche doit être maintenu pour découvrir de nouvelles molécules et fabriquer à bas prix des combinaisons thérapeutiques efficaces, limitant ainsi le nombre de comprimés à prendre.

1.7.1.3. Les vaccins

Une autre alternative de lutte antiparasitaire est la mise au point d'un vaccin. Trois groupes de vaccin sont actuellement à l'étude :

- Le vaccin anti-sporozoïte.

Il devrait empêcher l'invasion des hépatocytes ou détruire le sporozoïte pendant sa phase de migration sanguine. Des épitopes (morceaux d'antigène, particulièrement immunogènes et déclenchant une réponse spécifique protectrice) ont été sélectionnés tant sur la CSP que sur la TRAP, principaux antigènes fonctionnels du sporozoïte. Ces épitopes occasionnent une réponse humorale ou cellulaire cytotoxique chez certains modèles expérimentaux. Malheureusement les tentatives de vaccination chez l'homme n'ont pas donné de bons résultats, peut être à cause d'une mauvaise présentation de l'antigène vaccinal au système immunitaire et certainement aussi par manque d'un adjuvant non toxique (**Nussenzweig &**

Nussenzweig 1990 ; Nardin *et al.* 1995 ; Nussenzweig & Zavala 1997 ; Ahlborg *et al.* 1998 . Nardin *et al.* 1999 ; Hollingdale & Krzych 2002 ; Allouche *et al.* 2003 ; Snounou *et al.* 2005).

- **Le vaccin contre les stades sanguins.**

Les recherches sont beaucoup moins avancées que pour le vaccin anti-sporozoïte. Ce vaccin devrait réduire fortement la densité parasitaire asexuée, donc la morbidité et la mortalité palustre. De nombreux épitopes ont été sélectionnés chez les différents antigènes fonctionnels du schizonte ou du mérozoïte. Le problème est que ces antigènes sont souvent des variants ou sont très polymorphes. Il devient donc difficile de mettre au point un vaccin universel. Là encore les études expérimentales chez la souris, le rat ou le singe ont donné quelques résultats intéressants, mais chez l'homme il n'y a qu'exceptionnellement des succès, même avec des vaccins associant plusieurs molécules de fonctionnalité différente (Good 2005 ; Moorthy *et al.*, 2004 ; Good *et al.*, 2004 ; Webster & Hill 2003 ; Kumar *et al.*, 2002 ; Moorthy & Hill 2002 ; Greenwood & Alonso 2002 ; Carvalho *et al.*, 2002 ; Doolan & Hoffman 2002 ; Kumar *et al.*, 2002 ; Patarroyo *et al.*, 1992).

- **Les vaccins anti-stade sexué**

Ils sont d'introduction beaucoup plus récente. Ces vaccins n'ont aucun effet sur la symptomatologie mais ils peuvent théoriquement protéger la communauté en réduisant ou stoppant la transmission du parasite par le vecteur. Des épitopes ont été sélectionnés à partir des 3 antigènes de surface Pfs 48/45, Pfs 230 et Pfs 25. Des études de terrain sont actuellement en cours.

Les voies de recherche dans le domaine du vaccin antipaludique, s'orientent actuellement vers l'élaboration d'un vaccin multivalent contenant divers antigènes fonctionnels, spécifiques de différents stades et capables d'induire des réponses immunitaires grâce à de nouveaux adjuvants ou de nouvelles techniques de couplage.

1.7.2.La lutte contre le vecteur

La lutte antivectorielle est une composante importante, mais souvent coûteuse et qui doit être très efficace pour diminuer sensiblement la transmission. Les cibles sont l'insecte et/ou plus rarement son stade larvaire. Une abondante littérature peut être consultée sur ce sujet un peu en marge de nos préoccupations. Aussi resterons nous volontairement bref.

On peut citer parmi les stratégies antivectorielles, les insecticides à effet rémanent et plus rarement les larvicides, notamment biologiques. Les insecticides ont été longtemps appliqués

en asperion intra domiciliaire pendant les années de tentative d'éradication du paludisme. Le seul effet a été le développement de la chimiorésistance des vecteurs au DDT. Actuellement les nouveaux insecticides comme les pyréthriinoïdes sont utilisés en imprégnation sur les moustiquaires.

Les moustiquaires imprégnées (MI) constituent le principal outil d'intervention contre les anophèles vecteurs. Elles ont donné de bons résultats dans beaucoup d'études pilotes sur le terrain (**Lengeler, 2000 ; Cochrane & Lengeler, 1998**). La promotion des MI est maintenant devenue une priorité dans la plupart des programmes nationaux, sous l'effet d'une forte publicité de l'OMS. Le problème est maintenant de savoir si les MI vendues à une population sont toujours autant efficaces que dans les études pilotes et si des résistances du vecteur aux insecticides n'en limitent pas rapidement l'efficacité. Il est primordial de développer dès maintenant des molécules de remplacement.

1.8.La chimiorésistance

La chimiorésistance est l'aptitude d'une souche de parasite ou d'un moustique à survivre malgré l'administration d'un médicament ou d'un insecticide utilisé dans les conditions optimales. Il s'agit d'une sélection progressive d'individus génétiquement résistants dans une population sauvage, sous l'effet d'une pression médicamenteuse ou insecticide, à doses non mortelles pour le parasite ou le moustique. Ainsi la chimiorésistance apparaît-elle progressivement dans une zone déterminée. C'est la répétition des tests de sensibilité qui permet de détecter la proportion croissante d'individus résistants.

La chimiorésistance est spécifique du médicament ou de l'insecticide testé, mais il peut exister des résistances croisées, notamment quand les compositions chimiques des produits sont voisines.

1.8.1.La chimiorésistance aux antipaludiques

La chimiorésistance des parasites aux antipaludiques constitue un des obstacles majeurs qui entravent l'efficacité des programmes nationaux de lutte contre le paludisme depuis des décennies. La situation est déjà fortement compromise pour les antifoliques + antifoliniques ainsi que pour les amino-4-quinoléines. Des échecs thérapeutiques à ces molécules se rencontrent à des taux supérieurs à 25% dans un très grand nombre de pays d'Asie et d'Afrique.

1.8.1.1. Causes et conséquences de la chimiorésistance

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'apparition, puis la dispersion des souches résistantes. L'utilisation massive et la chimioprophylaxie mal contrôlée avec des amino-4-quinoléines, depuis des décennies, ont favorisé la sélection progressive de souches naturellement résistantes. Les résistances à la quinine sont inexistantes parce que le métabolisme du médicament dans le sang est très rapide. Par contre le métabolisme lent des anti foliques et foliniques explique en partie l'apparition rapide des résistances. Mais l'extension rapide de la résistance aux antifoliques et foliniques s'explique aussi par le fait que cette résistance est due à une seule mutation génétique. Par contre, pour la chloroquine par exemple, il existe plusieurs mutations successives qui occasionnent des résistances faibles et ce n'est que la coexistence de ces mutations qui favorise l'apparition d'une résistance mesurable *in vivo*.

Enfin, certains médicaments comme les anti foliques sont gamétocytogènes. Après chimiothérapie d'un accès palustre, le parasite résistant souffre sans être tué et dévie son cycle vers la gamétocytogénèse. Il s'en suit une dispersion préférentielle des souches résistantes dans la zone. L'intensité de la transmission est un facteur aggravant de la dispersion des souches résistantes. Mais l'intensité de transmission favorise aussi la prémunition qui contrôle le développement de ces souches résistantes, donc diminue la fréquence des échecs thérapeutiques. Ceci explique pourquoi la dispersion des résistances aux anti paludiques en Afrique a été plus tardive et plus progressive qu'en Asie ou en Amérique du Sud, où l'immunité protectrice est beaucoup moins forte dans les populations. Ceci explique aussi pourquoi de hauts niveaux de chimiorésistance peuvent être bien tolérés par les populations vivant en zone hyper à holo endémiques ; alors que des niveaux beaucoup plus faibles occasionnent une grande fréquence des échecs thérapeutiques dans les zones hypoendémiques. On pense aussi que la chloroquinorésistance a favorisé l'apparition de résistances à d'autres quinolones, comme la méfloquine ou l'halofantrine.

La chimiorésistance est probablement responsable de l'augmentation de la mortalité palustre et des accès graves observée ces dernières années (Trape *et al.*, 1998). Mais il est difficile d'en être sûr car l'estimation de la mortalité spécifique due paludisme est impossible. Dans le doute l'OMS recommande de changer de politique médicamenteuse dès que le niveau d'inefficacité thérapeutique dépasse 25%.

1.8.1.2. Les tests de chimiorésistance du parasite aux médicaments

Afin de mieux définir les niveaux de chimiorésistance, d'adapter de nouvelles politiques médicamenteuses, et de limiter la dissémination des souches résistantes, des tests de surveillance ont été mis au point.

Les tests *in vitro* dépistent très précocement l'installation de souches résistantes dans une zone. Ces tests sont basés sur l'inhibition de la croissance *in vitro* de *P. falciparum* en présence de différentes doses de médicaments. Ces tests ont peu d'intérêt pratique mais sont utiles pour surveiller l'apparition d'une chimiorésistance dans une zone.

C'est pourquoi nous n'insisterons que sur les tests *in vivo*. Les tests *in vivo* s'adressent à des sujets parasités ou malades, peu ou pas prémunis, et traités de manière correcte. On suit l'évolution parasitologique ou/et clinique de ces individus. Une résistance se définit par la persistance ou la réapparition des parasites dans les jours ou le mois suivant le traitement. Un échec thérapeutique se définit par la persistance ou la réapparition de signes cliniques associés à une parasitémie.

Il existe donc deux grands types de test *in vivo* : les tests de chimiosensibilité basés uniquement sur l'évolution de la parasitémie après traitement et les tests d'efficacité thérapeutique qui prennent en compte à la fois la parasitémie et le tableau clinique. Le test d'efficacité est actuellement le plus indiqué pour établir une situation objective du niveau de résistance aux antipaludiques. Ce test vise à déterminer la proportion de sujets encore malades et parasités après un traitement bien conduit, parmi un échantillon de sujets malades de moins de 5 ans, réputés non prémunis. Un certain nombre de réponses permettent de classer l'efficacité du traitement en 3 catégories :

- Guérison apparente avec une réduction franche ou une stérilisation de la charge parasitaire en moins de 3 jours, parallèle à un retour à la normale de la température. Ces 2 critères doivent rester stables pendant 15 à 28 jours après traitement.
- Echec thérapeutique précoce avec une persistance de la fièvre et de la parasitémie dans les 3 premiers jours, exigeant un changement de médicament.
- Echec thérapeutique tardif avec une résurgence de la fièvre et/ou de la parasitémie après une accalmie dans les premiers jours. Ici il faut faire attention à différencier une résurgence de la maladie, d'une réinoculation par un moustique infecté. Nous sommes en zone de transmission et un sujet récemment traité a très bien pu guérir de son accès palustre et en faire un nouveau 15 jours (durée du cycle sporogonique) après le premier.

C'est le taux d'échecs thérapeutiques dans l'échantillon et surtout son évolution vers l'aggravation qui va conditionner un changement de politique médicamenteuse. Le problème est que la situation de la chimiorésistance est certainement très hétérogène dans une région ou un pays ; et recommander un changement de stratégie médicamenteuse pour tout le pays est une décision très coûteuse.

1.8.2. La chimiorésistance du vecteur aux insecticides

Pour étudier la chimiorésistance du vecteur aux insecticides l'OMS a mis en place un test standardisé. Il s'agit de mettre en contact pendant une heure, un gobelet de moustiques sauvages de génération F1 avec un papier buvard imprégné d'insecticide. L'effet létal de l'insecticide est évalué après une mise en observation de 24 heures des moustiques. Pour une bonne interprétation des résultats, la mortalité du lot témoin doit être inférieure à 5%; en cas de mortalité comprise entre 5% et 20%, la formule d'Abbot qui corrige la mortalité des moustiques exposés, permet encore l'exploitation des données. Si la mortalité du lot témoin est > 20%, le test est à refaire.

Là encore c'est la répétition des tests et l'aggravation de la situation qui va commander un changement d'insecticide. Là aussi la situation est certainement très hétérogène au niveau d'une région ou d'un pays, mais il est exceptionnel qu'un programme de lutte reposant sur l'utilisation d'insecticides soit mis en œuvre au niveau national.

2. Les facteurs inhibiteurs du cycle sporogonique

Théoriquement, la transmission palustre peut se diviser en trois principaux composants : la transmission « moustique - homme » ou TMH, la transmission « homme – moustique » ou THM et entre les deux, le « cycle » sporogonique. Cette dernière composante est soumise à des phases naturelles de réduction parasitaire (dans l'estomac du moustique, lors des traversées de la membrane péritrophique et stomacale, et lors du conflit avec l'immunité du moustique). Ces phases de réduction sont compensées par des phases de multiplication (micro-gamogénèse, sporontogénèse).

Les phases de réduction, au sein du cycle sporogonique sont dues à plusieurs facteurs, classés en : (1) facteurs humains, (2) parasite, ou (3) moustique.

2.1. Les facteurs humains

L'homme est capable d'inhiber le développement parasitaire chez le moustique. Il agirait par l'intermédiaire d'un certain nombre d'anticorps ou cellules immuno-compétentes, ingérées avec le repas sanguin. Parmi ces mécanismes, on peut citer :

- les anticorps contre les tissus de moustique,
- les anticorps contre les formes sexuées,
- les anticorps antisorozoïte,
- la phagocytose,
- les médicaments sporontocides.

2.1.1. Les anticorps antimoustiques

Cet aspect commence à être étudié avec pour principal objectif celui d'inhiber le développement du parasite chez le moustique en vaccinant l'homme avec des antigènes de moustique.

Certains enzymes du moustique activeraient la prochitinase sécrétée par l'ookinète sous forme inactive, en chitinase qui permet la traversée de la membrane péritrophique par ce stade parasitaire (Huber *et al.*, 1991 ; Shahabuddin *et al.*, 1993). Des anticorps dirigés contre ces enzymes pourraient donc inhiber le cycle sporogonique (Shahabuddin *et al.* 1998 ; Taylor-Robinson 2001). Il a été montré que des IgG dans le sang de l'hôte, peuvent être ingérées par le moustique et rester actives dans son estomac au moins 48h (Vaughan *et al.* 1988).

2.1.2. Les anticorps antisexués

L'homme vivant en zone d'endémie, acquiert des anticorps naturels contre les antigènes des gamétocytes. Certains de ces antigènes sont communs aux gamètes et aux zygotes (Meuwissen & Ponnudurai 1988) comme le Pfs48/45 et le Pfs230 pour *P. falciparum* et le GAM-1 pour *P. vivax* (Mendis *et al.*, 1987). Ces anticorps sont capables d'inhiber voire de bloquer le développement plasmodial chez le moustique (Targett 1988). Cette immunité spéciale, qui apparaît chez l'homme, mais n'est efficace que chez le moustique, s'appelle la TBI ou « Transmission Blocking Immunity » (Kumar *et al.* 1995). Nous développerons plus en détail ce concept d'immunité dans le chapitre suivant.

Certains autres antigènes « sexués » apparaissent avec retard au cours du cycle sporogonique chez le moustique comme le Pfs 25 de *P. falciparum* par exemple qui commence à être synthétisé chez le zygote et l'ookinète et qu'on retrouve encore chez le jeune oocyste (Fries *et*

al. 1990). Des anticorps contre cet antigène peuvent être induits artificiellement chez l'homme ou l'animal. Ils inhibent le développement de l'oocyste mais également la production des sporozoïtes (**Kaslow et al. 1992 ; Lensen et al., 1992).**

2.1.3. Les anticorps ant sporozoïtes

L'homme vivant en zone d'endémie synthétise des anticorps ant sporozoïtes (**Nardin et al., 1979 ; Hoffman et al., 1986**). Les mécanismes d'action de ces anticorps sont multiples. Ils peuvent bloquer l'invasion des hépatocytes (**Hollingdale et al., 1984**) et déclencher une réaction de précipité à la surface du parasite (**Vanderberg et al., 1969**). On peut aussi penser que des repas sanguins successifs, pendant la phase de maturation des sporozoïtes, peuvent inhiber la charge sporozoïtaire des glandes salivaires et bloquer leur infectivité.

Des IgG humaines ont été dépistées dans l'hémocoel et l'hémolymphe quelques minutes après la fin du repas sanguin. La concentration atteint son maximum 3 heures après ingestion puis disparition vers 18-24 heures, probablement à cause de la formation de la membrane péritrophique qui est imperméable au passage des IgG (**Vaughan et al. 1988 ; 1990**). Cependant, le passage trans-digestif des IgG ne s'observe pas chez tous les moustiques vecteurs (**Vaughan & Azad, 1988**).

Dans le système *P. falciparum*-*An. stephensi*, on retrouve ces anticorps ant sporozoïtes sur les oocystes à partir du 9^{ème} jour après l'infection, temps nécessaire à la maturation des sporoblastes et à l'acquisition de l'antigène de surface CSP (**Vaughan et al. 1988**). Les anticorps s'attachent aussi aux sporozoïtes circulants dans l'hémolymphe, mais progressivement la fluorescence de membrane se perd, évoquant un mécanisme de perte progressive du manteau antigénique CSP (**Vaughan et al. 1988**). On a montré que seuls des taux élevés d'anticorps ant sporozoïtes pouvaient inhiber l'infectivité (**Egan et al, 1987**). Par contre, l'ingestion de fortes concentrations naturelles ou de monoclonal d'anti CSP, 10 jours après l'infection n'a aucun effet sur l'indice et la charge sporozoïtaire et ne bloque pas l'envahissement des glandes salivaires (**Beier et al. 1989 ; Ponnudurai et al. 1989**).

La concentration des IgG ant sporozoïtaires dans l'hémolymphe est environ 0.5% de celle dans le sérum du repas sanguin (**Vaughan et al., 1990**). Dans ces conditions, il est fort peu probable que ces faibles concentrations puissent avoir un effet inhibiteur sur l'infectivité du moustique. Au contraire, on a parfois démontré un effet potentialisateur sur l'infection du moustique de ces faibles concentrations d'IgG (**Peiris et al., 1988 ; Nudelman et al., 1989 ;**

Do Rosario et al. 1989 ; Hollingdale & Do Rosario, 1989). Le rôle épidémiologique des anticorps antisperozoïtes demeure donc encore inconnu.

2.1.4. La phagocytose et les cytokines

Les parasites peuvent être phagocytés dans l'estomac du moustique (**Sinden & Smalley, 1976 ; Lensen et al., 1997**). Cette phagocytose serait dépendante des cytokines (**Naotune et al., 1993 ; Lensen et al., 1997**). Cependant, des études ont montré qu'*in vivo*, la phagocytose simple n'expliquerait que 7% des pertes parasitaires chez le moustique (**Sinden & Smalley, 1976**). Le véritable rôle de la phagocytose médiée par des cytokines sur la réduction des parasites est encore inconnu (**Healer et al., 1999**).

2.1.5. Les médicaments antipalustres

Nous avons vu précédemment qu'un traitement à doses subcuratives peut être responsable d'une poussée gamétocytaire, en faisant souffrir le parasite sans le tuer (**Buckling et al., 1999**). L'augmentation de la gamétocythémie est également observée en cas d'infections résistantes traitées par un médicament peu efficace. (**Robert et al., 1996**). La fréquence des poussées gamétocytaires est liée au niveau de résistance. On peut rapprocher de cette observation le traitement avec certains antimalariques à action lente comme le proguanil, la pyriméthamine ou l'association sulfadoxine + pyriméthamine qui, agissant avec un certain retard, peuvent favoriser la gamétocytogénèse (**Sohkna et al., 2001**). Les médicaments antipaludiques auraient donc un effet plutôt facilitateur sur le cycle sporogonique.

Certains antipaludiques, comme les amino-4-quinoléines, les amino-8-quinoléines, ou les dérivés de l'artémisinine sont réputés gamétocytocides (**Butcher, 1997 ; Targett et al., 2001**). D'autres associations (sulfadoxine + pyriméthamine) ou (atovaquone-proguanil), réputées gamétocytogènes, semblent également sporonticides (**Hogh et al., 1998 ; Butcher et al., 2000**), mais les résultats ne sont pas encore formellement démontrés.

2.2. Les facteurs parasites

Le développement du parasite chez le moustique est influencé par un certains nombre de facteurs qui peuvent engendrer un mauvais rendement voire une interruption du cycle sporogonique. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- la densité gamétocytaire,
- le sex ratio,
- le degré de maturation des gamétocytes,

- la distribution agrégée des gamétocytes,
- la parasitémie asexuée associée,
- le pouvoir gamétocytogène des souches plasmodiales

2.2.1. La densité gamétocytaire

C'est logiquement le facteur le plus important. En effet, le nombre de gamétocytes ingérés par le moustique influence théoriquement l'infectivité de ce dernier. Mais il n'y a pas de corrélation linéaire entre densité et pourcentage d'infection chez le moustique. Il existe des moustiques qui ne s'infectent pas ou très peu après gorgement sur de gros porteurs de gamétocytes. Inversement, il existe aussi des moustiques qui s'infectent après s'être gorgés sur un individu apparemment sans gamétocytes sur une goutte épaisse lue dans les conditions standard.

2.2.2. Le « sexe ratio »

Le « sex ratio » des gamétocytes est très variable mais il y a généralement plus de gamétocyte femelle que de mâles. Pour un bon rendement du cycle sporogonique, il semble que le « sex ratio » idéal se situe à un gamétocyte mâle pour 5-6 femelles (Paul *et al.* 2002). Il est probable qu'un « sex ratio » déséquilibré avec plus de mâles que de femelles entraîne une inhibition du cycle sporogonique.

2.2.3. Le degré de maturation infectante des gamétocytes

Il semble bien exister une période de « maturation infectante » qui durerait 2 jours et qui permettrait aux gamétocytes mûrs de *P. falciparum* (stades V) de devenir infectants pour le moustique. De très fortes densités de gamétocytes mûrs récemment apparus, après un traitement d'accès palustre par exemple, peuvent ne donner aucune infection chez le moustique. C'est aussi un problème habituel rencontré lors des infections expérimentales de moustique avec des gamétocytes de culture.

Une fluctuation journalière de l'infectivité des gamétocytes a été aussi observée dans certains cas et chez certaines espèces de *Plasmodium* de singe (*knowlesi* et *cynomolgi*) (Hawking, 1975). Cependant, ce rythme circadien ne semble pas exister chez les espèces humaines.

2.2.4. La parasitémie asexuée associée

Les fortes charges parasitaires asexuées, associées à une poussée gamétocytaire semblent inhiber l'infectivité de ces gamétocytes. Il est possible que cette forte densité des stades asexués s'accompagne de désordres immunologiques ou inflammatoires à l'origine de l'inhibition d'infectivité des gamétocytes. On a notamment démontré le rôle du TNF comme principale cytokine capable d'inhiber l'infectivité des gamétocytes (Naotune *et al.*, 1993 ; Lensen *et al.*, 1997) et abondamment sécrétée lors des accès palustres. Cette hypothèse ne devrait pourtant pas s'appliquer à *P. falciparum* chez qui la poussée gamétocytaire est largement décalée (7 à 12 jours) par rapport à la poussée asexuée qui lui a donné naissance, à moins qu'il existe une nouvelle poussée asexuée du fait de l'absence d'un traitement efficace.

2.3. Les facteurs moustique

Pour qu'un moustique soit un bon vecteur nous rappelons qu'il faut (1) que le moustique soit susceptible à l'infection plasmodiale (compétence vectorielle) et (2) qu'il soit dans les conditions idéales pour transmettre (capacité vectorielle). Finalement, sur plus de 300 espèces d'anophèles recensées, seule une quarantaine est considérée comme étant sérieusement impliquée dans la transmission palustre. Comme nous avons précédemment évoqué, nous allons ici parler que de la compétence vectorielle.

Le cycle sporogonique chez le moustique infecté est soumis à de nombreux facteurs inhibiteurs, même chez les moustiques susceptibles. Ces facteurs visent à contrôler la multiplication parasitaire afin d'éviter les hyper infections mortelles. Parmi ces facteurs on peut citer les plus étudiés (Sahabuddin & Costero, 2001) :

- les enzymes digestifs
- la membrane péritrophique
- le comportement agressif en fonction du degré de développement du cycle sporogonique

2.3.1. Les enzymes digestifs

L'ingestion d'un repas sanguin déclenche chez le moustique une sécrétion enzymatique protéolytique abondante. L'activité enzymatique digestive atteint son apogée à des moments variables après l'ingestion du repas sanguin. Ce temps dépend de l'espèce de moustique en cause. Cette sécrétion digestive peut avoir une activité inhibitrice ou facilitatrice sur le cycle sporogonique précoce.

Les enzymes digestives peuvent détruire le parasite. Cependant, l'ookinète de *P. gallinaceum* survit chez *Aedes. aegypti* mais pas chez *Anopheles*. Ceci peut s'expliquer par l'apparition tardive que la sécrétion digestive apparaît tardivement chez *Aedes*, quand l'ookinète a déjà traversé la membrane péritrophique.

Un autre rôle important des enzymes digestives du moustique serait l'activation de la prochitinase sécrétée par l'ookinète sous forme inactive (**Shahabuddin & Kaslow 1994**). Cette enzyme parasitaire de *P. gallinaceum*, une fois activée, favoriserait la traversée de la membrane péritrophique, donc la survie du parasite.

Enfin, les enzymes digestives du moustique détruiraient les facteurs du complément pouvant ainsi empêcher la lyse des zygotes par les anticorps anti Pfs 230 (**Grotendorst & Carter, 1987**). Il s'agit là encore d'une action facilitatrice.

On le voit le rôle des enzymes digestifs de moustique peut être facilitateur ou inhibiteur de l'inféctivité du parasite, selon la cinétique du développement parasitaire, de la membrane péritrophique ou de la sécrétion digestive du moustique. Ainsi s'explique l'extrême hétérogénéité de développement parasitaire en fonction de l'espèce d'Anophèle ou de *Plasmodium*.

2.3.2. Le rôle de la membrane péritrophique

La majorité des moustiques produisent une sorte de membrane de structure lamellaire, enserrant le bol alimentaire. Le principal stimulus de cette sécrétion serait la distension stomacale, mais peut être aussi la présence de composés sanguins. La membrane péritrophique est sécrétée par les cellules de l'épithélium digestif et entoure tout le bol alimentaire en quelques heures. On ne connaît pas encore son rôle physiologique. La nature chimique et la cinétique de sécrétion de cette membrane dépendent de l'espèce du moustique. Les ookinètes doivent traverser cette membrane pour atteindre l'épithélium digestif. La microscopie électronique détecte du matériel dense au pôle apical de l'ookinète suggérant une sécrétion enzymatique parasitaire. Les ookinètes de *P. gallinaceum* secrètent de la chitinase sous forme de pro-enzyme inactif. La membrane péritrophique de *Aedes aegypti* est principalement constituée de chitine. L'activation de la prochitinase parasitaire se fait par les trypsines stomacales du moustique, sécrétées très tôt pendant la digestion du repas sanguin et la maturation de l'ookinète (**Shahabuddin et al. 1993**). En ce qui concerne *An. stephensi*, la membrane péritrophique commence à apparaître plus tardivement et est constituée uniquement de N-acetylgalactosamine. *P. gallinaceum* ne se développe donc pas chez *A. stephensi* probablement à cause de l'équipement enzymatique de l'ookinète qui est

incompatible avec la structure chimique de la membrane péritrophique (**Langer & Vinetz 2001**).

La membrane péritrophique pourrait donc avoir un rôle inhibiteur chez certains couples vecteur-parasite, en fonction de sa vitesse de développement, de sa composition chimique, de la vitesse de formation de l'ookinète et de l'équipement enzymatique de l'espèce parasitaire.

2.3.3.Fréquence des piqûres en fonction du cycle sporogonique

Le *Plasmodium*, provoquerait chez le vecteur des changements de comportement (**Koella 1999**). Au stade sporozoïte, la fréquence des piqûres du moustique a tendance à augmenter ainsi que la transmission (**Koella et al. 1998**). En revanche au stade précoce du cycle sporogonique, l'agressivité du moustique diminue considérablement (**Koella et al. 2002**).

En conclusion, les facteurs inhibiteurs du cycle sporogonique sont très variés. Ceci explique que les charges parasitaires chez le moustique infecté naturellement sont généralement faibles à modérées. Seuls quelques moustiques seront hyper infectés. Mais il existe parallèlement des facteurs facilitateurs. Ils expliquent aussi pourquoi il est possible d'observer des moustiques infectés sur des sujets apparemment sans gamétocytes dans une goutte épaisse lue de manière classique.

3. Mesure des différentes composantes de la transmission

L'épidémiologie consiste à étudier tous les facteurs qui interviennent dans le maintien d'une endémie locale et pouvant expliquer son niveau et son évolution. Cette science est basée sur un très grand nombre de paramètres et met en jeu de très nombreuses méthodologies et indicateurs. A partir de ces résultats, il est possible de poser objectivement les meilleures indications des moyens de lutte (meilleur rapport qualité/prix) et surtout de mesurer l'impact réel de ces moyens de lutte.

Cependant, les méthodologies et indicateurs sont loin d'être standardisés, et ne couvrent pas l'ensemble des aspects épidémiologiques. En fait, le seul domaine véritablement exploré est la transmission du parasite du moustique vers l'homme (TMH). Les deux autres maillons principaux de la chaîne épidémiologique sont beaucoup moins bien connus. Il s'agit de la transmission de l'homme vers le moustique (THM) et du cycle sporogonique.

3.1. La Transmission moustique – homme (TMH)

L'étude de la transmission du paludisme du moustique vers l'homme a pris son essor avec les premières campagnes d'éradication du paludisme. On pensait à cette époque que le moustique était probablement le maillon le plus faible de la chaîne épidémiologique et qu'une réduction importante de la population vectorielle devait entraîner un arrêt de la transmission. En fait il s'est avéré rapidement que des réductions de 80 à 90% de la population vectorielle ne suffisaient pas à diminuer sensiblement la transmission ; que les mesures de lutte devaient être poursuivies sur de longues périodes et que rapidement les moustiques acquéraient une résistance aux insecticides.

Tous ces travaux ont cependant permis de développer des méthodologies, des indicateurs et de modéliser la transmission moustique-homme. C'est actuellement le volet de l'épidémiologie du paludisme qui est de loin le mieux exploré. Les chercheurs ont mis au point un certain nombre de méthodologies et d'indicateurs. Les mathématiciens ont étudié les interactions entre ces indicateurs afin de modéliser la transmission « moustique – homme » et de faciliter les prises de décision stratégiques.

3.1.1. Les méthodes de capture

La plupart des méthodes utilisées sont basées sur l'échantillonnage des moustiques adultes sauvages retrouvés dans les habitations, au contact direct avec l'homme. Chaque méthode a ses inconvénients et ses avantages et n'explore qu'une fraction de la population agressive pour l'homme. C'est pour cette raison qu'il faut généralement les associer.

3.1.1.1. Les captures sur appât humain

La méthode de capture sur appât humain est la technique de référence pour échantillonner la population anophélienne dangereuse pour l'homme. Un captureur, dans ou à l'extérieur d'une case de capture, attrape les moustiques qui tentent de le piquer durant la nuit. Après chaque heure, on recueille les échantillons de moustiques capturés, ce qui permet de déterminer l'agressivité horaire de chaque espèce. A la fin de la capture, les moustiques sont identifiés et dénombrés. Ceci permet d'évaluer la densité anophélienne moyenne, par nuit de capture et par case, pour chaque espèce de moustique piqueur.

Cette méthode est d'autant plus efficace que le captureur est adroit et ne s'endort pas. Pour obtenir un reflet valable de l'agressivité anophélienne il faut choisir plusieurs cases de capture, plus ou moins éloignées des gîtes larvaires potentiels. Il faut aussi assurer une

rotation des captureurs entre les cases pour ne pas introduire un biais « captureur ». Enfin il faut répéter les nuits de capture dans le mois pour lisser les variations journalières.

Cette méthode a pour principal inconvénient d'exposer le captureur à des piqûres infectées. On choisit donc des sujets prémunis qui recevront un traitement antipalustre systématique au moindre doute d'accès palustre, au niveau du dispensaire local.

3.1.1.2. Les captures par piège lumineux

Pour mieux standardiser cette méthode assez peu déontologique, les entomologistes ont eu l'idée d'attirer les moustiques par une source lumineuse. A l'aide d'une aspiration incorporée dans le système de piégeage, les moustiques attirés sont automatiquement récoltés et stockés dans le piège. On a récemment amélioré le système de piégeage en l'accouplant à un dormeur sous moustiquaire, utilisé ici comme appât. Théoriquement ce type de capture évite le « biais captureur ». Mais elle possède aussi de nombreux inconvénients. Les moustiques capturés sont desséchés sous l'effet de la ventilation et parfois difficiles à identifier. La technique empêche généralement la détermination de l'âge physiologique du moustique qui se fait sur moustique vivant. D'autre part, certains moustiques non anthropophiles (ne se gorgent pas sur l'homme) peuvent être attirés par la lumière. A l'inverse, certaines espèces vectrices ne sont pas ou peu attirées par ce type de piège. L'estimation de la densité des moustiques agressifs pour l'homme est alors complètement faussée.

3.1.1.3. Les captures en faunes résiduelles matinales

Cette méthode vise à récolter, tôt le matin, les femelles gorgées qui se reposent dans la case. L'un des avantages de cette technique est qu'elle permet de récolter des femelles vivantes chez qui la maturation ovarienne commence. Ceci est important pour certaines études en cytogénétique et pour l'identification des repas sanguins. On peut également l'utiliser pour récolter des moustiques sauvages destinés à l'élevage d'une souche anophélienne en insectarium. Cependant il est très difficile de découvrir ces moustiques au repos et donc le rendement est dérisoire sauf dans quelques cases hyper productives qu'il faut préalablement identifier. Dans ces conditions, la moyenne de la densité anophélienne journalière est obligatoirement biaisée.

Pour augmenter le rendement de capture on peut précéder cette récolte matinale d'une aspersion intradomiciliaire d'insecticides à action rapide. Les moustiques tués qui tombent des murs et du plafond sont récoltés sur des draps blancs étendus dans la pièce. Les

moustiques étant morts, ils ne peuvent servir qu'à une identification des espèces présentes dans la case. Il est difficile de récolter tous les moustiques, notamment ceux se reposant derrière les meubles ou qui restent bloqués dans la toiture. Cette technique ignore complètement la fraction de moustiques qui piquent l'homme dans la case, mais qui s'en échappent pour se reposer à l'extérieur (endophage – exophile).

Il existe encore de très nombreuses variantes de capture. Chacune a ses inconvénients et ses avantages. Aucune n'explore la totalité de la faune agressive pour l'homme. On est parfois obligé d'organiser des captures à l'extérieur des cases pour ne pas manquer la fraction des moustiques anthropophiles (piquant l'homme) mais exophages (piquant l'homme à l'extérieur des maisons). Il est donc nécessaire de bien réfléchir aux objectifs avant de choisir une technique de capture. En fait, c'est la variation de densité au cours de l'année qui a son importance, plutôt que la densité elle-même qui est le plus souvent entachée d'erreur.

3.1.2. Les indicateurs

Un certain nombre d'indicateurs ont été sélectionnés par les entomologistes pour caractériser la population anophélienne, estimer sa densité et déterminer les principales caractéristiques de son comportement.

3.1.2.1. Le taux d'agressivité par espèce (ma)

Une fois les moustiques capturés, ils sont identifiés par un spécialiste et dénombrés à chaque capture. On détermine ainsi le taux d'agressivité moyenne par espèce (ma) en nombre de piqûres par homme et par unité de temps (jour, mois ou année). En comptant les moustiques capturés chaque heure, on peut aussi déterminer le taux d'agressivité horaire et identifier le pic d'agressivité pour chaque espèce. Ceci permettra de mieux cibler les mesures de lutte en fonction du comportement des espèces.

3.1.2.2. L'indice sporozoïtaire par espèce (IS)

Il s'agit d'identifier les femelles infectées, avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Cette identification se fait soit en disséquant les glandes d'un échantillon de moustiques capturés, soit en passant ces moustiques en ELISA.

La première méthode exige du personnel spécialisé toute la nuit de capture et une fourniture en courant pour les loupes et microscopes. On calcul la proportion de moustiques infectés sur les moustiques disséqués. C'est l'indice sporozoïtaire. Il est impossible d'identifier l'espèce de *Plasmodium* en cause avec cette technique, mais l'observation directe du parasite dans les

glandes évite tout faux positif. En général le pourcentage de moustiques positifs dans la nature est très faible. Il faut donc disséquer suffisamment de moustiques pour parvenir à une bonne précision de l'indice sporozoïtaire.

La détection des moustiques positifs peut être faite également par la technique ELISA. Cette technique consiste à broyer le moustique séché et à passer le broyat sur un anticorps monoclonal anti CSP (Circumsporozoite Protein) et adsorbé sur le plastic d'une plaque à microtitration. Si le broyat contient de l'antigène CSP (moustique infecté), il se forme un immun - complexe qui va être révélé dans un deuxième temps en utilisant un autre monoclonal dirigé contre un autre épitope de la CSP et marqué avec un enzyme. La révélation se fait en ajoutant le substrat incolore de l'enzyme. Une réaction colorée a lieu quand le moustique est infecté. La technique a de nombreux avantages. Elle se pratique sur des moustiques secs, le plus souvent à distance de la capture. Elle se prête aux grandes séries. Elle identifie l'espèce plasmodiale en cause dans l'infection du moustique en utilisant différents monoclonaux spécifiques d'espèce. Elle peut être quantifiée et donc estimer la charge moyenne des glandes en sporozoïtes, par comparaison à une courbe étalon (**Burkott et al. 1984 ; Wirtz et al. 1987**). Par contre cette technique a quelques inconvénients comme des problèmes de faux positifs et faux négatifs et un manque de reproductibilité dans son aspect quantitatif de la charge sporozoïtaire. En outre, elle détecte des moustiques infectés (avec de l'antigène CSP dans les tissus du moustique), mais pas forcément infectant (sporozoïtes dans les glandes salivaires) (**Lombardi et al. 1987**). Donc l'indice sporozoïtaire est toujours surévalué avec cette méthode (**Boudin et al. 1988**).

Une variante sur bandelette de nitrocellulose a été récemment mise au point (**Appawu et al. 2003**).

3.1.2.3. Le taux d'inoculation par espèce (h)

Ce taux se calcule par le produit de l'indice sporozoïtaire IS (proportion de moustiques infectés dans la population vectorielle) par l'agressivité anophélienne ma (densité par unité de temps). On obtient donc un nombre théorique de piqûres infectées par homme et par unité de temps ($h = ma * IS$). Cet indicateur reflète le niveau de transmission. Ce n'est pas tellement sa valeur qui est importante, car elle est entachée d'erreurs aussi bien sur ma que sur IS. Mais ce sont ses fluctuations en fonction des saisons qui sont intéressantes.

3.1.2.4. La capacité vectorielle (C)

Cet indicateur très complexe a été mis au point par les modélisateurs de la transmission moustique – homme. La capacité vectorielle se définit comme "le taux quotidien d'inoculations futures, initiées par chaque cas infecté". En fait il y a autant de définitions que d'auteurs. Il est directement calculé par une formule complexe qui fait intervenir : (1) le nombre de piqûres par personne et par jour, (2) l'anthropophilie du vecteur, (3) la longévité du moustique. La capacité vectorielle mesure le potentiel de transmission du paludisme. Son interprétation est souvent difficile et l'indice est basé sur une série d'hypothèses pas toujours vérifiées : (1) le vecteur est parfaitement capable de transmettre l'infection mais n'est en aucune façon affecté par l'infection, (2) le taux de survie du moustique est indépendant de son âge, (3) chaque parasite n'a qu'un seul vecteur et un seul hôte vertébré, (4) les moustiques prennent leur repas sanguin de façon aléatoire et en nombre fixe par unité de temps, quelque soit l'abondance des hôtes et des vecteurs, et (5) Un hôte susceptible va forcément contracter l'infection s'il est piqué par des moustiques infectants. L'immunité non spécifique n'est pas prise en compte.

3.1.2.5. Le taux d'anthropophilie – zoophilie

C'est la proportion de moustiques vecteurs se gorgeant exclusivement sur homme (anthropophilie) ou sur animal (zoophilie). Pour cela il faut identifier la nature des repas sanguins et ne récolter que des moustiques gorgés (faune résiduelle matinale). Les estomacs pleins sont écrasés sur papier buvard. Les échantillons sont ensuite passés en ELISA pour déterminer immunologiquement l'origine animale ou humaine des protéines sanguines (Lombardi & Esposito 1983). On peut ainsi caractériser le degré d'anthropophilie ou de zoophilie d'une population de moustiques. Plus le moustique est anthropophile, plus il a de chance d'être vecteur pour l'homme. Certains vecteurs ont des préférences animales. Ceci est important à connaître car il suffit d'introduire des animaux à proximité des cases pour favoriser la déviation zoophile et diminuer le taux de transmission pour l'homme.

3.1.2.6. Exophilie – endophilie, exophagie – endophagie

Ces termes visent à caractériser le comportement endo (dans les cases) ou exo (à l'extérieur des cases) des moustiques qui piquent (phagie) ou qui se reposent (philie). Pour évaluer ces différentes fractions de la population vectorielle, il faut naturellement réaliser des captures à

l'intérieur et à l'extérieur des cases (endo – exo) ; sous forme de captures par piège ou appât humain (phagie) et par faune résiduelle matinale (phylie).

Il est bien évident que les mesures de lutte seront différentes selon qu'on a affaire à des moustiques endo ou exophages se reposant ou non dans les cases.

Ces indicateurs permettent d'avoir une bonne idée du comportement du vecteur par rapport à l'homme et de suivre les fluctuations de la transmission. Cependant, il est difficile de chiffrer objectivement le niveau de cette transmission moustique - homme et les comparaisons d'une zone à l'autre, ou avant et après une mesure de lutte, manquent de sensibilité. Il faut donc examiner les chiffres avec un certain esprit critique. Les niveaux d'endémie ne peuvent être basés uniquement sur l'intensité de transmission compte tenu des imprécisions importantes de la mesure. Par contre les fluctuations saisonnières sont généralement reproductibles et permettent de focaliser les mesures de lutte sur une période de l'année.

3.1.3. Les études épidémiologiques

La littérature scientifique mondiale rassemble un très grand nombre de ce type d'études, notamment au moment où l'OMS recommandait l'éradication du paludisme. Actuellement la transmission moustique-homme est surtout mesurée pour caractériser une zone ou pour estimer l'impact d'une distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides. La plupart des indicateurs sont étudiés mensuellement et la transmission est estimée par la formule simple du taux d'inoculation entomologique. La capacité vectorielle étant difficile à interpréter, cet indicateur est pratiquement abandonné.

Cependant la fiabilité des résultats dépend du choix des techniques de capture, du choix des captureurs et des cases de capture. Il faut donc être extrêmement critique sur la méthodologie et le plus souvent les résultats d'une étude à l'autre ne sont pas comparables. En outre, le taux d'inoculation varie de manière très significative d'une année à l'autre, même à une même période (**Fontenille et al. 1997**).

De nombreuses études ont été faites au niveau de la zone sahélienne du Sénégal. On distingue 3 grandes strates climatiques au Sénégal : la région sahélienne au nord, la région soudanienne au centre sud et la région sub guinéenne en Séné-Gambie. L'abondance et la durée des pluies vont conditionner la transmission palustre.

Au nord (majeure partie du pays) il s'agit généralement d'un paludisme très saisonnier de type hypoendémique avec peu d'immunité protectrice chez les populations. Le vecteur principal est *An. arabiensis*. Mais il existe des variantes dues à des conditions écologiques très particulières comme : les rizières qui renforcent parfois le niveau et la durée de la

transmission ou les berges du fleuve Sénégal favorables à la transmission de *P. malariae* par *An. Funestus*.

Dans le centre sud, la durée de la transmission est un peu plus longue. Elle peut être permanente dans certaines niches écologiques comme à Dielmo. Les niveaux sont de type mésoendémique à hyperendémique. Les vecteurs sont *An. gambiae* en saison des pluies, suivi de *An. arabiensis* en saison plus sèche. *An. melas* se cantonne au littoral et est un mauvais vecteur ce qui explique les niveaux hypoendémiques de la transmission dans ces zones.

La zone sud de Séné-Gambie a été assez peu explorée du fait des difficultés d'accès et de l'insécurité. Mais on peut admettre que la situation est très voisine de celle de la Gambie.

On voit donc que la situation épidémiologique est extrêmement polymorphe au Sénégal.

3.2. La Transmission Reducing Activity (TRA)

3.2.1. Définitions

Nous avons vu plus haut que le cycle sporogonique était soumis à de nombreux facteurs inhibiteurs dans les conditions naturelles, facteurs d'origine humaine, moustique ou parasitaire. On parle alors d'inhibition globale. Il est possible de mesurer l'inhibition due aux facteurs humains, essentiellement d'origine sanguine. Cette inhibition est rarement un blocage, mais plutôt une simple réduction du rendement parasitaire. On peut donc l'appeler Transmission Reducing Activity (TRA). A l'intérieur de cette TRA il est possible d'individualiser la part qui revient aux facteurs immuns humains appelée Transmission « Blocking » Immunity des anglo-saxons (TBI). En fait, cette inhibition immunologique n'est bloqueuse que dans les conditions expérimentales. Dans la réalité chez l'homme, elle n'est qu'inhibitrice. Aussi, devrait-on parler plutôt de Transmission Reducing Immunity (TRI). C'est donc une immunité spécifique mise en jeu par l'homme et intervenant uniquement chez le moustique pour inhiber ou bloquer le cycle sporogonique. La TRI rassemblerait le rôle des anticorps anti-sexués, des cellules immuno-compétentes, des cytokines, des facteurs inflammatoires et du complément, agissant seuls ou en synergie dans l'estomac du moustique. Il est aussi possible d'y ajouter les anticorps anti-moustiques et anti-sporozoïtes, ingérées aussi par le moustique lors de son repas sanguin. Nous verrons plus loin que les rôles relatifs de l'inhibition globale, de la TRA et de la TRI peuvent être estimés.

3.2.2.L'immunité « bloquant » la transmission (TBI ou TRI)

La TRI est induite par certains antigènes internes du gamétocyte, libérés après phagocytose des hématies parasitées dans la rate ou introduits par vaccination. Certains de ces anticorps spécifiques antisexués sont fonctionnels. Mais ils n'ont aucun rôle sur le gamétocyte et n'interviennent que chez le moustique, sur les stades libres du parasite. On observe une TBI naturelle chez l'individu vivant en zone d'endémie palustre, ou chez les animaux vaccinés avec des gamétocytes (**Carter *et al.* 1988 ; Mendis *et al.* 1990 ; Targett 1990**).

A l'occasion d'un repas sanguin, le moustique absorbe les composants de la TRI, des globules rouges sains et des hématies parasités par tous les stades de développement du parasite. Les gamétocytes résisteront à la digestion du repas sanguin. Ils vont se transformer rapidement en gamètes et zygotes. La transformation morphologique des stades sexués s'accompagne d'un profond remaniement antigénique, mais certains antigènes, communs avec le gamétocyte, demeurent. Les parasites sexués libres vont donc être exposés aux anticorps, complément, facteurs inflammatoires, cytokines et cellules phagocytaires qui ne sont pas immédiatement détruits dans le bol alimentaire. Ces « effecteurs » vont reconnaître les antigènes communs avec ceux des gamétocytes et vont produire des immuns complexes pouvant aboutir à la destruction du parasite en présence du complément ou par phagocytose par exemple. Il est bien évident que la TRI n'a une action inhibitrice que dans les premières heures du cycle sporogonique. Après les enzymes digestifs du moustique digèrent toutes ces protéines sanguines.

3.2.3. L'exploration de la TRA

Pour explorer la TRA, on se sert habituellement de deux techniques dont chacune a ses avantages et ses inconvénients. Ces techniques permettent de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur ou bloqueur d'un sérum sur l'infection du moustique. Il s'agit du « Standard Membrane Feeding Assay » ou SMFA et du « Direct Membrane Feeding Assay » ou DMFA. Il est aussi possible d'explorer le rendement du cycle sporogonique.

3.2.3.1. Le SMFA (Standard Membrane Feeding Assay)

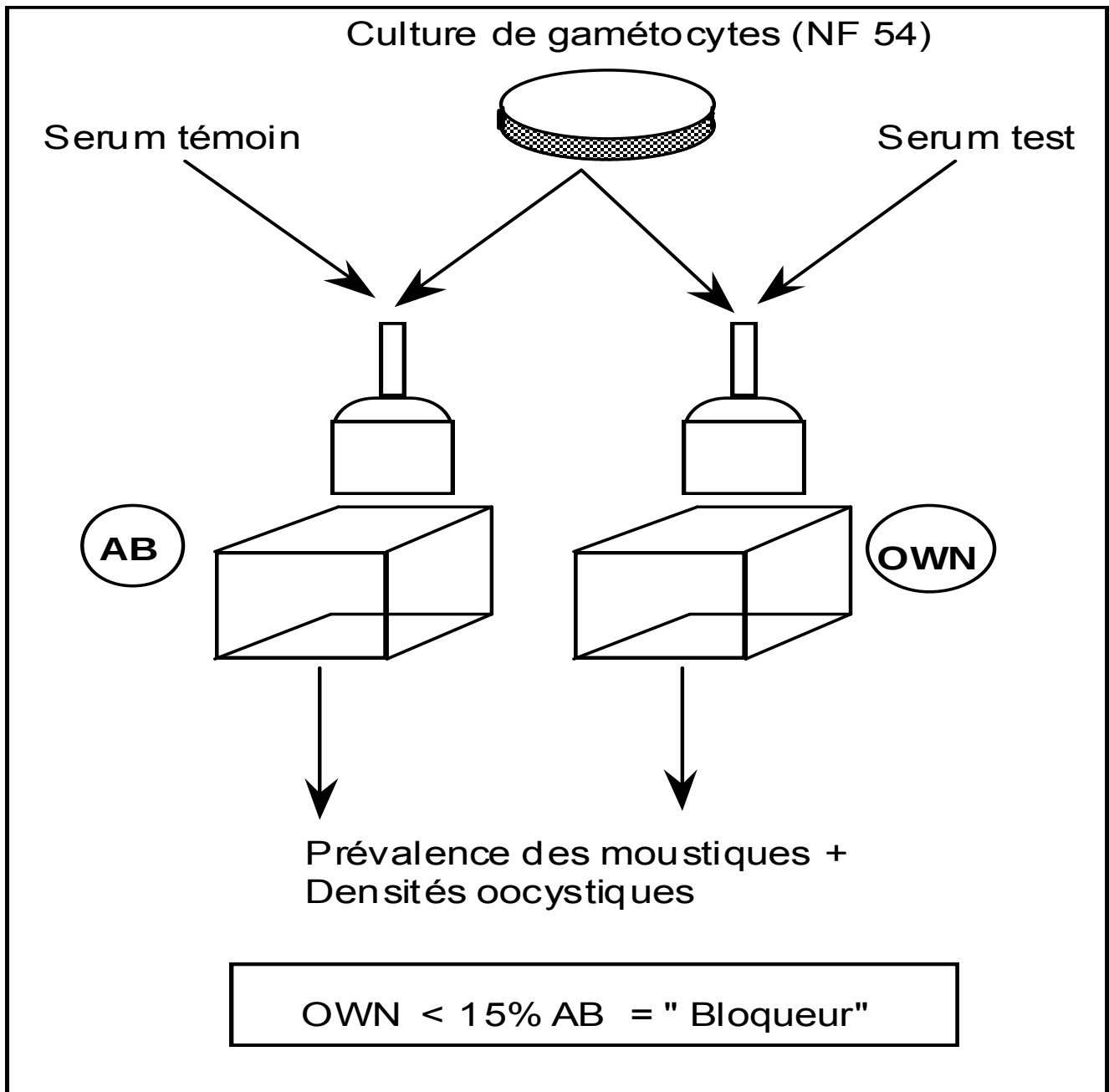


Figure VI: Principe du SMFA

3.2.3.2. Le DMFA classique (Direct Membrane Feeding Assay)

C'est une technique similaire à la première mais qui se réalise à partir d'un prélèvement sanguin chez un porteur de gamétocytes (Mulder *et al.*, 1994). A partir de ce prélèvement, on réalise simultanément trois infections : une infection immédiate (IM) qui sert à vérifier que les gamétocytes sont bien infectants ; et deux infections retardées (à cause de la manipulation du sang). Pour les infections retardées, le reste du sang est aliquoté dans deux tubes (test et témoin). Ces tubes sont centrifugés. Dans le tube témoin, on retire le plasma du porteur pour le remplacer par du sérum AB (groupe sanguin) non immun. Dans le tube test, on retire et on rajoute immédiatement le plasma du porteur. Les moustiques sont gorgés avec les deux sangs reconstitués. La comparaison des taux et des densités d'infection entre lot test et témoin permet d'identifier des plasmas inhibiteurs.

Cependant, cette technique ne permet (1) de tester qu'un seul échantillon de sang par porteur de gamétocytes et (2) le rôle inhibiteur du plasma de ce porteur. Elle n'a été que récemment standardisée (Meurs *et al.*, en préparation). Elle est reproductible. En répétant le test on peut établir la fréquence des sujets inhibiteurs parmi les porteurs de gamétocytes.

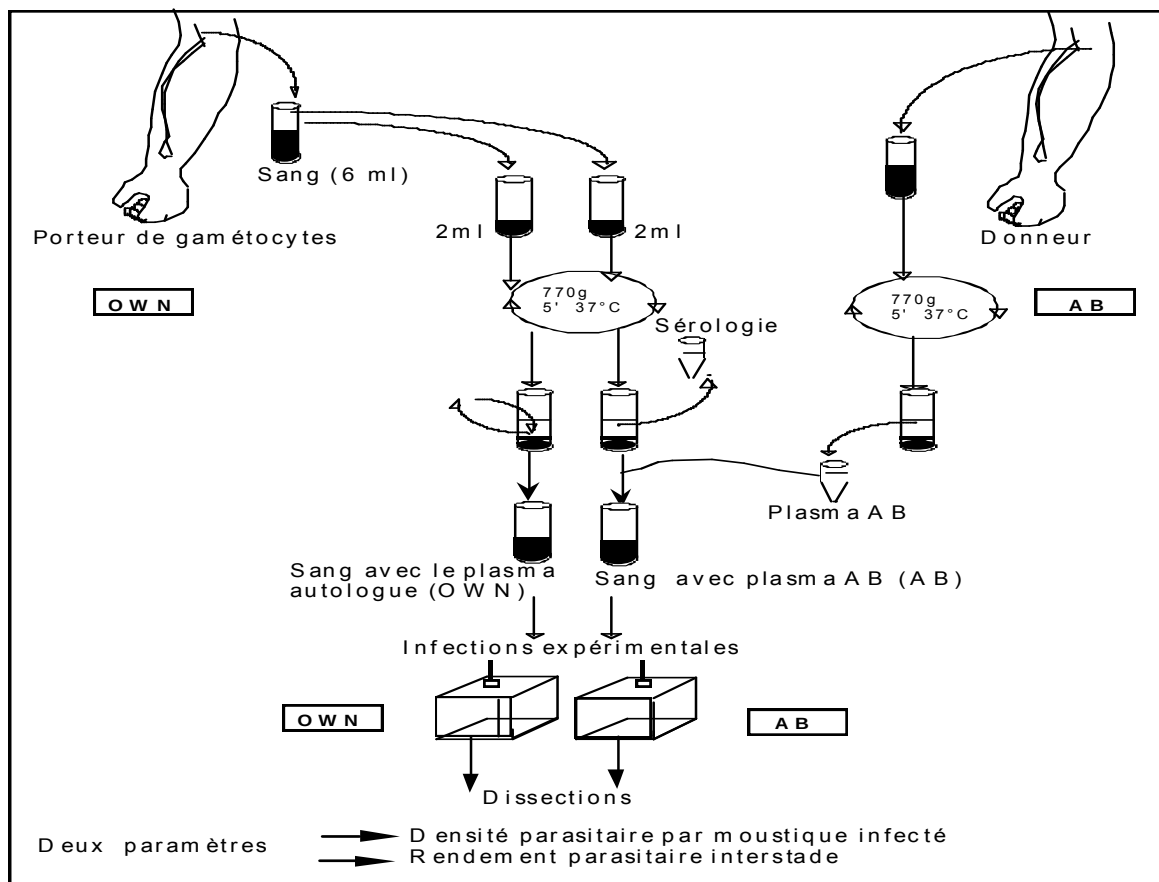


Figure VII : Principe du DMFA classique

3.2.3.3. Exploration du cycle sporogonique

L'étude du rendement sporogonique est longue et coûteuse. Elle n'est donc pas applicable à de grandes séries. Le principe est de quantifier, dans l'estomac du moustique, les différents stades de développement parasites, du gamète à l'oocyste, en fonction du temps. Ce test se fait à partir du sang d'un gros porteur de gamétocytes pour obtenir des densités parasites importantes à tous les stades.

On infecte un gros lot de moustiques d'élevage par gorgement direct ou DMFA. Les estomacs de quelques moustiques sont disséqués à des intervalles de temps variables selon le stade parasite que l'on veut observer. Par exemple, un lot de 5 moustiques gorgés sera disséqué 30 minutes après gorgement pour rechercher et compter les gamètes ingérés. Le temps optimal sera respectivement de 3h, 24h, et 48h pour le zygote, l'ookinète et le jeune oocyste (**Robert et al. 1995 ; Gouagna et al. 1998**). Afin de faciliter le comptage, on fait un pool des 5 bols alimentaires. Ce pool est incubé avec un monoclonal spécifique du gamète (Pfs 48/45) du zygote (Pfs 48/45) de l'ookinète (Pfs 25) ou du jeune oocyste (Pfs 25) et marqué à la fluorescéine. Après incubation, le pool des bols alimentaires est centrifugé et le culot est lavé puis, après étalement il est lu sous microscope à fluorescence. Le nombre d'oocystes mûrs est simplement estimé 7 jours après infection, en disséquant les estomacs d'un lot des moustiques survivants et infectés (**Gouagna et al., 1998**). Le nombre moyen de gamétocytes ingérés se fera par lecture d'un étalement sanguin de 5 bols alimentaires poolés, immédiatement après l'infection.

NB :

Gamétocytes= pool de 5 bols immédiatement après infection,

Gamètes= pool de 5 bols 30 min après infection,

Zygote= pool de 5 bols 3 heures après infection,

Ookinète= pool de 5 bols 24 heures après infection,

Oocyste= pool de 5 bols 48heures après infection

Le rendement du cycle sporogonique peut également être réalisé à partir d'étalements sanguins successifs des bols alimentaires et après coloration au Giemsa (**Vaughan et al., 1992**). Cependant, le stade ookinète est difficile à lire car il est noyé dans le pigment malarique. En outre, il est impossible de visualiser les jeunes oocystes.

La recherche de chaque stade à des heures différentes après gorgement, permet d'établir une sorte de courbe de survie qui caractérise le rendement du cycle sporogonique (**Vaughan et al., 1992**).

L'étude comparative du rendement du cycle sporogonique sur un lot de moustiques infectés à partir d'un sérum immun ou d'un sérum témoin peut fournir des renseignements importants sur les cibles de la TRA naturelle (**Gouagna comm. pers.**). Cependant, la lourdeur de la technique limite le nombre de moustiques disséqués et donc rend peu fiables les comparaisons entre sérum immun et sérum témoin. Il faudrait trouver le moyen de conserver plusieurs jours les lames colorées à la fluorescéine pour pouvoir disséquer plus de 5 moustiques par stade parasitaire.

3.2.4. Les indicateurs potentiels de la TRA

3.2.4.1. L'estimation du niveau de TRA naturelle

Dans le SMFA ou le DMFA, c'est le pouvoir inhibiteur du sérum ou du plasma qui est exploré. On teste donc la TRA naturelle car l'inhibition peut être due à la TBI mais aussi à des substances inhibitrices contenues dans le sérum test, comme des médicaments. On admet qu'un sérum/plasma est inhibiteur quand le taux d'infection est très significativement ($p = 1\%$) inférieur au témoin AB. Il est alors possible d'estimer la proportion de sérums inhibiteurs dans un échantillon de gros porteurs testés en DMFA classique ou dans un échantillon de sérums tout venant en DMFA hétérologue ou SMFA. Ce pourcentage reflète le niveau de TRA naturelle acquise par la population soit des gros porteurs, soit de sujets vivant dans la zone (**Boudin et al., 2005**).

3.2.4.2. L'estimation de l'intensité moyenne de la TRA

L'infection artificielle avec le plasma ou sérum test met en jeu les facteurs inhibiteurs humains sériques mais aussi parasite et moustique. Elle mesure l'inhibition globale du cycle sporogonique. Par contre, l'infection avec le sérum témoin AB met en jeu seulement les facteurs inhibiteurs parasites et moustique. La différence des taux d'infection (AB - test) reflète donc le rôle des facteurs humains sériques ou TRA.

Il est possible de calculer une moyenne de cette différence dans un échantillon de sérums ou plasma test. On obtient ainsi un reflet de l'intensité moyenne de la TRA dans la zone d'étude. Par contre, il est impossible de connaître le rôle spécifique de la TRI dans la TRA. Aussi l'inhibition mesurée ici peut être due aux facteurs immuns humains ou à des médicaments sporontocides par exemple.

3.2.4.3. L'estimation du rôle relatif de la TRA

Le rapport de cette différence (AB - test) sur le taux d'infection test permet d'estimer théoriquement le rôle relatif de la TRA par rapport à l'inhibition globale. Il est possible de calculer la moyenne de ce rapport dans un échantillon de sérums ou plasmas test. On obtient ainsi un reflet du rôle épidémiologique moyen de la TRA par rapport à l'inhibition globale, dans une zone endémique (**Boudin *et al.*, 2005**).

Nous utilisons préférentiellement les taux d'infection plutôt que les charges oocystiques de chaque lot de moustiques parce que ces dernières sont en nombre relativement faible et ont une distribution non gaussienne (**Medley *et al.*, 1993 ; Pichon *et al.*, 1996**), ce qui complique les comparaisons (test et AB) et diminue la sensibilité du test de comparaison.

3.2.4.4. L'estimation du rendement du cycle sporogonique

A la suite de l'exploration du cycle sporogonique en utilisant des anticorps fluorescents, on peut estimer le rendement interstade par le rapport des densités moyennes par moustique, du stade 2 en fonction du stade 1. Par exemple, nous avons observé 40 gamétocytes par estomac, immédiatement après infection et seulement 10 gamètes par estomac 30 minutes après infection. Le rendement interstade (gamétocyte - gamète) est de $\frac{1}{4}$ soit 25%.

Les premiers résultats ont montré que le rendement du cycle sporogonique était particulièrement mauvais, aussi bien dans des conditions expérimentales (**Vaughan *et al.* 1992**) que sur le terrain (**Gouagna *et al.* 1998**). L'estimation comparée du rendement parasite en présence d'un sérum inhibiteur et d'un sérum témoin (AB) n'a pas encore été possible. Nous attendons, pour faire une étude fiable, d'avoir mis au point une technique qui permet la lecture de plus de 5 moustiques par stade.

3.2.5. L'exploration de la TRI

L'exploration de la TRI n'est qu'indirecte. Deux techniques ont été mises au point pour doser les anticorps anti-sexués dans un échantillon de population. Il s'agissait d'une technique peu sensible d'immuno-précipitation (**Graves *et al.* 1988 ; Brakenhoeff *et al.* 1985**) et d'une technique d'ELISA compétition (**Roeffen *et al.* 1995**). Ces études ont démontré l'existence d'une immunité naturelle anti-sexuée dans différentes zones d'endémie. Couplée à un SMFA (**Graves *et al.* 1992 ; Roeffen *et al.* 1996 ; Mulder *et al.* 1999**), ces études ont aussi permis de rechercher une corrélation entre taux d'anticorps anti-sexués et inhibition du cycle

sporogonique par TRA. Les résultats ont été contradictoires, probablement à cause du fait que la TRI n'est pas le facteur explicatif principal de la TRA.

3.3.La transmission homme - moustique (THM)

La transmission homme moustique regroupe tous les facteurs épidémiologiques qui interviennent entre le réservoir humain de gamétocytes et la population anophélienne. On retrouve ici les contacts homme - vecteur que nous avons déjà abordés dans la transmission moustique - homme. Mais ce qui est le plus important c'est le pouvoir infectant du réservoir de gamétocytes pour la population de vecteurs. Le niveau de la gamétocytemie dans la population, l'infectivité des gamétocytes pour le(s) vecteur(s) et le volume sanguin moyen, ingéré par les moustiques, sont des paramètres importants à prendre en compte.

3.3.1. Les indicateurs

Les indicateurs épidémiologiques de la transmission homme - moustique portent sur le réservoir humain infectant pour le moustique ou sur le réservoir infecté des moustiques après gorgement sur un porteur de gamétocytes.

3.3.1.1. Le pourcentage de sujets infectants pour les moustiques (B)

Il s'agit de la proportion de sujets capable d'infecter le moustique à un moment donné. Cet indicateur varie avec la saison de transmission.

3.3.1.2. L'indice gamétocytaire ou la densité gamétocytaire moyenne

L'indice gamétocytaire (IG) est le taux de porteurs de gamétocytes dans une population, à un moment donné. Il varie lui aussi en fonction du niveau de transmission. La densité gamétocytaire moyenne (DGM) est la moyenne géométrique des densités gamétoctaires observées chez les porteurs. On choisit la moyenne géométrique car il existe beaucoup plus souvent de faibles densités que de fortes densités gamétoctaires. Une moyenne arithmétique surévaluerait la densité.

Ces 2 indicateurs peuvent donner un aperçu grossier du niveau de transmission homme - moustique dans une zone. Cependant, tous les porteurs de gamétocytes ne sont pas infectants pour les moustiques. Inversement, il existe des sujets apparemment sans gamétocytes dans une

goutte épaisse lue correctement, et qui, pourtant, infectent les moustiques. Ces deux indicateurs ont donc une portée limitée pour évaluer la THM.

3.3.1.3. Le pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte (PIG)

Il n'y a généralement pas de corrélation positive linéaire entre densité gamétocytaire et infection chez le moustique (**Carter & Gwadz 1980**). Il existe toutefois une certaine relation, avec effet de seuil (**Boudin et al. 1989**). Il faut donc toujours tenir compte de la densité gamétocytaire quand on parle d'infectivité pour les moustiques. Il peut être intéressant de prendre en compte un troisième indicateur qui serait une estimation du pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte (PIG). Cet indicateur se calcule au niveau de chaque porteur par le rapport du pourcentage de moustiques infectés (C) sur la densité gamétocytaire (DG). On peut ensuite établir une moyenne des PIG dans l'échantillon de porteurs de gamétocytes. Une valeur anormalement basse fait suspecter l'existence d'une TRA naturelle non négligeable dans la zone. Cet indicateur (simple moyenne) peut être comparé d'une zone à une autre, d'une tranche d'âge à l'autre (**Boudin et al. 1989**), ou au cours d'un cycle de transmission.

3.3.1.4. Le taux d'inoculation parasitologique (TIP)

Nous avons vu que la transmission moustique - homme pouvait être grossièrement résumée par le taux d'inoculation entomologique (h). Il s'agit du produit de l'agressivité anophélienne pour l'homme (ma) par l'indice sporozoïtaire (IS) ou pourcentage de moustiques infectants. L'unité est le nombre de piqûres infectantes reçues par l'homme en un temps donné.

Pour estimer la transmission homme - moustique on pourrait aussi imaginer un tel indicateur. Il s'agirait de calculer le produit de l'agressivité anophélienne (ma) par la proportion de sujets infectants (B). L'unité serait le nombre de piqûres infectantes pour le moustique et par unité de temps (**Boudin et al., 1993 ; Bonnet et al., 2003**). Pour l'instant nous n'avons aucune idée sur la valeur de cet indicateur.

3.3.1.5. La contribution d'une population au réservoir de moustiques infectés

Cette contribution (P_i) est estimée par le rapport $F_i / \sum F_i$, avec $F_i = A_i * B_i * C_i$ (**Githeko et al. 1992**). Expliquons cette formule barbare. (i) se rapporte à une tranche d'âge de la population. Pour chaque tranche d'âge, on calcule 3 paramètres : (1) A_i qui est la proportion d'une tranche d'âge dans la population générale, obtenue à partir d'un recensement récent. (2)

Bi est la proportion de sujets infectant dans cette tranche d'âge. (3) Ci est la proportion de moustiques infectés par des oocystes, 7j après gorgement, sur les sujets infectants de cette tranche d'âge. Pour chaque tranche d'âge on calcule le produit F_i . La contribution d'une tranche d'âge est aisément déduite en calculant $F_i / \sum F_i$. Ce sont généralement les enfants qui ont le plus fort indice gamétocytaire et qui infectent le plus les moustiques. Mais dans certaines zones, la responsabilité des adultes peut ne pas être négligeable (Carter & Gwadz 1980 ; Githeko *et al.* 1992) et il faudra en tenir compte dans les indications des moyens de lutte.

Ces 5 indicateurs donnent un aperçu global de l'infectivité d'une population pour les moustiques. Nous allons voir maintenant les indicateurs qui donnent un aperçu de l'infection chez le moustique.

3.3.1.6. La proportion de moustiques infectés sur sujets infectants (Ci)

C'est aussi un paramètre intéressant. Il estime le pourcentage moyen de moustiques positifs après gorgement sur un sujet infectant. Lorsque nous testons l'infectivité d'un échantillon de population pour les moustiques (voir le § 3.3.2.) nous avons, pour chaque individu testé, la proportion de moustiques infectés par des oocystes, 7 jours après gorgement. Nous sélectionnons uniquement les sujets infectants (porteurs de gamétocytes ou apparemment non porteurs) et nous calculons le pourcentage moyen de moustiques infectés sur cet échantillon. Plus ce pourcentage est faible par rapport à la DGM, plus il indique un rôle épidémiologique probable de la TRA.

3.3.1.7. La probabilité d'un repas sanguin infectant (K)

Il existe trois manières différentes d'estimer cet indicateur.

- (K1) est le produit du pourcentage moyen de sujets porteurs de gamétocytes (IG) par le pourcentage moyen de moustiques infectés sur ces porteurs (C").
- (K2) est le produit du pourcentage moyen de sujets infectants pour les moustiques (B) par le pourcentage moyen de moustiques infectés sur sujets infectants (C). Cet indicateur est plus exacte que le précédent puisqu'un certain nombre de porteurs de gamétocytes ne sont pas infectants et que certains « non porteurs » peuvent infecter. Cet indicateur (K2) semble intuitivement avoir une valeur épidémiologique, bien qu'il ait été rarement utilisé (Graves *et al.* 1988)

- Enfin le **modèle mathématique de Lines** (Lines *et al.* 1991) permet d'estimer la proportion de repas infectants, mais l'estimation est beaucoup plus complexe *et aléatoire*.

On ne connaît pas pour l'instant la validité du modèle de Lines. Il sera toutefois difficile de comparer statistiquement ces indicateurs composites entre différentes zones.

3.3.2. Les méthodologies

Une fois les indicateurs potentiels de la transmission homme - moustique passés en revue, il faut maintenant aborder la façon de les obtenir.

3.3.2.1. L'estimation de la gamétocythémie

Pour estimer la densité gamétocytaire on utilise généralement la numération en goutte épaisse. Le frottis n'est pas indiqué car il concentre les gamétocytes dans la frange de l'étalement sanguin, au milieu des globules blancs, et il est impossible d'estimer correctement une densité. En goutte épaisse ils sont plus régulièrement répartis et on les compte en fonction du nombre de globules blancs lus. Mais attention, en goutte épaisse, les gamétocytes sont souvent déformés, ce qui rend leur comptage plus difficile. Ils peuvent même s'activer si la goutte épaisse sèche lentement, comme c'est généralement le cas en saison des pluies sur le terrain. Il ne faut alors pas les confondre avec du *P. malariae*. On sait d'autre part qu'une certaine fraction des formes asexuées se décolle lors de la coloration des gouttes épaisses. En est-il de même avec les gamétocytes ? Ce problème ne semble pas avoir été étudié. Il pourrait fausser l'estimation exacte des densités individuelles.

Pour estimer l'indice gamétocytaire dans une population, il faut veiller à choisir un échantillon représentatif de cette population, notamment représentatif de la proportion de chaque tranche d'âge. Si ce n'est pas le cas, on peut apporter une certaine correction par standardisation sur l'âge.

3.3.2.2. L'infectivité des gamétocytes pour le vecteur local

Nous avons vu que tous les porteurs n'étaient pas infectants et que des « non porteurs » pouvaient infecter les moustiques. Donc le choix d'un échantillon de population de porteurs de gamétocytes n'est pas forcément judicieux. On peut choisir un échantillon représentatif de

la population globale. Mais nous allons réaliser de très nombreux gorgements qui seront négatifs (surcroît important de travail de dissection). Donc le choix de la méthodologie va dépendre du degré de précision que nous voulons donner à (B).

Pour une estimation précise, nous pouvons choisir un échantillon de population globale par tirage au sort ou, plus simplement, nous pouvons décider de choisir des familles nucléaires volontaires (**Bonnet et al. 2003**). Ce dernier échantillon va respecter la proportion de chaque tranche d'âge. Mais il est aussi possible de choisir un échantillon de porteurs de gamétocytes représentatif et suffisamment grand pour avoir toutes les tranches d'âge et toutes les densités gamétocytaires représentées (**Graves et al. 1988**). Ce dernier choix est toutefois plus difficile à réaliser et va demander de très nombreuses enquêtes de dépistage. Pour notre part, nous préférons le choix d'un échantillon de familles volontaires.

L'infectivité pour le moustique, des sujets sélectionnés, peut s'estimer par deux techniques : (1) un gorgement direct de quelques moustiques sains d'élevage (DIR), sur la peau d'un sujet (porteur de gamétocytes ou volontaire) ; ou (2) un gorgement artificiel à travers une membrane et à partir du sang capillaire (500 µl) de ce même sujet (équivalent de l'infection immédiate dans le DMFA). Cependant, le prélèvement capillaire de 500 µl exige du temps, même si on utilise des vaccinostyles à guillotine. Ceci entraîne l'exflagellation de certains gamétocytes qui ne sont plus infectants. Les résultats seront donc certainement moins bons en DMFA qu'en DIR. C'est pour cette raison que nous préférons la méthode d'infection DIR. Sept jours après gorgement les moustiques seront disséqués et les oocystes recherchés. Compte tenu du grand nombre de moustiques négatifs, il est généralement préférable de faire sécher ces moustiques gorgés et de les passer à grande échelle en ELISA CSP pour définir les moustiques positifs.

Ce type d'enquête ne donne qu'une image instantanée de ce qui se passe dans la population. Il vaut mieux répéter l'étude à différents moments du cycle de transmission (avant, au maximum, et après le pic de transmission) pour établir une image fiable de ce qui se passe dans la réalité. Comme le nombre de porteurs de gamétocytes et de porteurs infectants est relativement faible, il faut choisir un grand échantillon de population pour avoir un effectif suffisant dans chaque tranche d'âge, surtout chez les adultes (environ 200 personnes). Il faut d'autre part disséquer suffisamment de moustiques après gorgement pour être sûr que le sujet n'est pas infectant. Nous adoptons 20 moustiques disséqués au minimum, avant d'affirmer qu'un sujet n'infecte pas les moustiques.

3.3.2.3. L'estimation du volume sanguin ingéré par les moustiques

C'est un paramètre épidémiologique qui semble important, car il va déterminer la densité de gamétocytes ingérés donc l'infection du moustique. En fait nous n'avons pas besoin de cette donnée pour le calcul de nos indicateurs. En outre, la distribution du volume du repas sanguin est de type binomiale négative (**Boudin, comm pers**). Il y a beaucoup de moustiques qui ingèrent une faible quantité de sang (1 μ l) et très peu qui ingèrent plus d'1 μ l, aussi bien en DIR qu'en DMFA.

3.3.3. Les études épidémiologiques

Les études épidémiologiques se comptent sur les doigts d'une main. Différentes zones endémiques ont été ciblées, mais des méthodologies et des indicateurs différents ont été utilisés, ce qui fait que les comparaisons sont difficiles.

L'infectivité d'un échantillon de population a été utilisée comme principale méthodologie au Liberia (**Muirhead-Thomson, 1957**), Kenya (**Githeko et al. 1992**) et Burkina (**Boudin et al., 1993**). En Gambie et Tanzanie (**Drakeley et al. 2000**), un échantillon de porteurs de gamétocytes a été préféré, sans que l'on sache comment il a été sélectionné. Au Kenya, Liberia, Cameroun et en Papouasie Nouvelle Guinée, l'infection directe sur la peau (DIR) a été la méthode de choix, tandis qu'en Gambie, Tanzanie et Burkina c'est le DMFA (IM) qui a été utilisé, après une prise de sang intraveineuse. Dans la plupart des zones, l'étude a été menée sur 1 à 2 ans, tandis qu'au Kenya elle s'est déroulée pendant la saison du maximum de transmission. Les études ont aussi présenté des différences sur la technique de lecture des gouttes épaisses, sur le nombre de moustiques disséqués et sur l'origine géographique de ces moustiques.

Nous avons tout de même essayé de faire quelques comparaisons en ne tenant compte que des très grandes différences. Les observations sont résumées dans le tableau suivant. Quelques indicateurs ont pu être estimés par nous à partir des données des auteurs et nous les signalons par un astérisx sous toute réserve.

Zones	Niveau d'endémicité	Eff	B %	b %	C %	K %
LIBERIA	Intense permanent	347	9.2	ND	21.0	1.9*
TANZANIE	Intense permanent	117	3.9*	41.9	ND	ND
CAMEROUN	Intense permanent	798	7.0	43.4	29.9	2.1
KENYA	Intense permanent	383	11.2*	ND	9.0*	1.0*
PAPOUASIE	Modéré permanent	201	4.0	45.2	37.9	1.5*
GAMBIE	Intense saisonnière	134	5.7*	58.2	ND	ND
BURKINA	Intense saisonnière	322	48.4	ND	11.5	5.5*

Tableau 1 : Transmission home – moustique dans différentes zones endémiques

Eff = effectif

B = proportion de sujets infectants (** dans cette étude l'estimation a été faite par calcul $IG \times b$)

b = proportion de porteurs de gamétocytes infectants

C = proportion de moustiques infectés sur sujets infectants

K = proportion de repas sanguin infectants

* Estimation à partir des observations des auteurs

Zone de forêt



Zone de savane



Le plus souvent, la proportion de sujets infectants (B) à un moment donné est faible ($< 12\%$), sauf dans le cas particulier du Burkina. Il ne semble donc pas y avoir de différence notable entre zones de forêt et zones de savane. Le cas particulier du Burkina n'a pas encore reçu de confirmation. La proportion des porteurs de gamétocytes infectants (b) est proche de 50%. Donc le pourcentage de porteurs non infectants est loin d'être négligeable dans les conditions naturelles. Les proportions de moustiques infectés sur sujets infectants (C) semblent très variables d'une zone à l'autre. Mais le nombre de moustiques disséqués étant lui-même très variable, il faut rester prudent dans cette comparaison. Si cette diversité s'avère vraie, il y a probablement une forte disparité de la TRA naturelle dans ces zones. Il ne semble pas y avoir de relation linéaire entre B (pourcentages de sujets infectants) et K (probabilité d'un repas sanguin infectant). On remarque toutefois que K est relativement voisin de l'indice sporozoïtaire, bien qu'inférieur dans la plus part des cas. Ceci serait peut être dû au mode d'estimation de ces 2 indices.

La difficulté d'interprétation dans ces quelques exemples montre bien la nécessité de standardiser la méthodologie dans les prochaines études.

Conclusion

Au terme de cette revue bibliographique très ciblée, on se rend compte que malgré le nombre imposant d'études de terrain, nous sommes encore incapables d'explorer correctement la transmission dans une zone. Le plus souvent nous ignorons le rôle de la prémunition et de la TRA naturelle, et presque toujours un seul aspect de cette transmission est exploré par les entomologistes. Dans ces conditions on comprend bien qu'il est impossible de comprendre les relations qui existent entre TMH, morbidité, gamétocytémie, TRA et THM.

Au Sud Cameroun, en zone de transmission permanente forestière et urbaine, une étude a été menée pour tenter de comprendre ces relations. Cette étude a intégré des renseignements sur la gamétocytémie, la TRA naturelle, la morbidité, la parasitémie asexuée, la transmission moustique-homme et homme-moustique (**Bonnet *et al.* 2002 ; Bonnet *et al.* 2003 ; Boudin *et al.* 2004**). Des relations intéressantes ont été observées.

En zone de forêt la transmission moustique - homme est plus forte qu'en ville, l'acquisition de la prémunition est probablement rapide, comme l'indique l'absence quasi complète de morbidité chez l'adulte et la rareté des accès graves après 5 ans. Cette prémunition limite la morbidité donc la gamétocytémie dans la population. Comme il y a théoriquement une relation entre présence de gamétocytes et anticorps antigamète, on s'attend à une TRI modérée. Dans ces conditions, la transmission homme - moustique devrait être élevée. Cependant l'immunité antisexuée (TRI) n'est pas le seul facteur limitatif de la transmission locale. La circulation de certains médicaments antipalustres doit être aussi prise en compte pour expliquer les niveaux de TRA mesurée. Dans la zone rurale étudiée, seule la chloroquine est largement utilisée. Elle n'a pas d'incidence sur la TRA.

En zone urbaine, la transmission moustique - homme est faible au moins dans les quartiers centraux. La morbidité est forte comme l'atteste la fréquence des consultations pour paludisme dans les dispensaires. La gamétocytémie est plus importante qu'en zone rurale. La TRI devrait donc être plus forte qu'en zone rurale. On observe cependant en ville une forte utilisation de la sulfadoxine-pyriméthamine qui pourrait encore augmenter la TRA mesurée. C'est justement ce qu'on observe, bien que la différence entre zones rurale et urbaine ne soit pas significative. La transmission homme - moustique n'a pas été étudiée dans ce faciès urbain difficile à sensibiliser à notre méthodologie.

L'hypothèse de travail pourrait donc être la suivante. Plus la transmission est faible, moins il y a d'acquisition d'une immunité protectrice au sein de la population et plus il y a de morbidité, donc de gamétocytémie. Par voie de conséquence, la TRI naturelle ou la TRA

mesurée devraient être fortes et la transmission homme – moustique faible. C’est cette hypothèse que nous allons tenter de vérifier. Nous allons mener au Sénégal rural, dans une zone sahélienne à transmission courte et faible, le même type d’étude qu’au Cameroun et nous comparerons les résultats afin d’en déduire une certaine logique relationnelle entre les différents éléments de la transmission palustre.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons eu 3 objectifs différents : l'étude de la morbidité, de la THM et de la TRA dans une zone sahélienne du Sénégal ; afin d'identifier les relations entre ces 3 entités. Pour ce faire, nous allons décrire dans un premier temps les méthodes d'études communes, puis nous rentrerons dans les détails méthodologiques de chacun des objectifs.

1. Zone d'étude

L'étude s'est déroulée dans la région de Thiès, situé à 90 km au nord de Dakar. La zone d'étude proprement dite se situe à 20 km à l'est de Thies sur la route de Diourbel et comprends 32 villages répartis autour des dispensaires de Hanène, et de Pout Diack. Plus de 60% de la population de la région vit en milieu rural où la culture du mil et de l'arachide et un peu d'élevage représente l'activité principale. Les ethnies principales sont le wolof et le Sérère. Le climat est de type sahélien et comporte deux saisons : une courte saison des pluies allant de Septembre à Novembre avec moins de 400 millimètres de pluies et une longue saison sèche, allant de Décembre à Août. L'humidité relative est en moyenne de 15% en saison sèche et de 75% en milieu de saison humide. La transmission du paludisme est donc saisonnière courte de Septembre à Décembre comme dans la plus part des régions septentrionales du Sénégal. Le vecteur principal est *Anopheles arabiensis*. Pas de vecteur secondaire comme *A. gambiae* ss et *A. funestus*. Les gîtes larvaires sont généralement/uniquement alimentés par les pluies (**Robert et al., 1998**). Le traitement des accès palustres simples se fait au niveau des dispensaires ou de la famille. Ces accès ont été traités le plus souvent par le mépris ou du paracétamol, comme bien souvent en Afrique. Le gouvernement a décidé de préconiser l'association sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine de 2004 à 2005, avec en pratique, prescription de sulfadoxine-pyriméthamine seule, faute d'approvisionnement en amodiaquine. Ensuite une association amodiaquine + artémisinine a été recommandée en 2006. Ces principales molécules ont un rôle non négligeable sur la gamétocytémie.

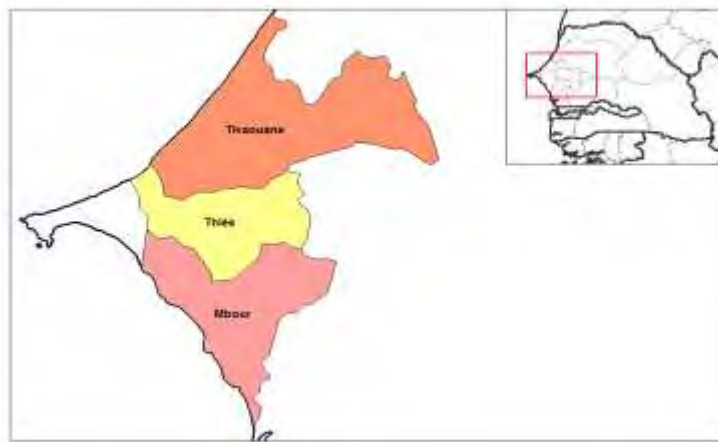


Figure VIII: Carte de la zone de Thiès

2. Dépistage des sujets infectés

Des enquêtes transversales ont été réalisées, pendant la saison de transmission de 2002 à 2006, dans les villages et les écoles de la zone d'étude. Seules des personnes volontaires, préalablement sensibilisées par nos enquêteurs sur place, ont été incluses pour réaliser des gouttes épaisses (GE) systématiques lors des différents passages et éventuellement des infections artificielles de moustiques chez les porteurs de gamétocytes.



Figure IX : dépistage des porteurs de gamétocyte par gouttes épaisses

Les gouttes épaisses ont été faites à partir de trois gouttes de sang capillaire prélevé au bout du doigt. Après séchage, l'étalement a été coloré verticalement pendant 20 minutes avec une

solution de Giemsa diluée à 10% dans de l'eau tamponnée à pH 7,2. La détermination des espèces parasitaires et la détection des fortes charges parasitaires ont été réalisées sur le terrain, avec une lecture semi-quantitative au microscope optique (photo).



Figure X : Détection des porteurs degametocyte au microscope

Il est assez facile de détecter plus d'un parasite asexué de *Plasmodium* par champs et de nombreux gamétocytes en banane de *P. falciparum* avec une lecture rapide sur le terrain (50 lames par lecteur dans l'après-midi). Cette méthode nous a permis d'identifier les accès palustres probables qui ont été systématiquement traités selon les recommandations du programme national de lutte. Parallèlement, nous avons identifié aussi des « gros » porteurs de gamétocytes (plus de 5 gamétocytes par traversée d'une GE) pour réaliser le lendemain des infections expérimentales de moustiques d'élevage dans le cadre de l'étude sur la TRA. Les GE ont été ensuite relues au laboratoire central de Dakar pour détecter toutes les infections avec faibles densités parasite. Le seuil de lecture des formes asexuées et sexuées du parasite a été respectivement de 6 et 2 parasites par microlitre de sang.

3. Les infections expérimentales

L'infectivité d'individus volontaires ou de « gros » porteurs de gamétocytes a été analysée à l'aide de deux méthodes de gorgement que nous décrivons plus loin.

Dans les deux cas, des femelles de moustiques, âgées de trois jours et maintenues à jeun de jus sucré depuis près de 12 heures ont été placées dans des gobelets fermés par un voile de moustiquaire. Tous les gorgements ont été réalisés sur le terrain dans une pièce d'un dispensaire ou d'une villa louée, nous servant de laboratoire et de dortoir (photo).



Figure XI : Laboratoire de terrain

Après chaque gorgement les moustiques ont été relâchés dans une petite cage moustiquaire et seules les femelles franchement gorgées ont été conservées. Les moustiques non ou mal gorgés ont été tués. Les petites cages ont été maintenues pendant 7 jours dans les conditions d'élevage précédemment décrites. Après une semaine d'incubation des moustiques gorgés, les estomacs ont d'abord été disséqués sous loupe binoculaire dans une goutte de solution de mercurochrome diluée à 3% en tampon PBS. Puis les oocystes ont été recherchés et dénombrés par observation microscopique ($\times 40$) (photo).

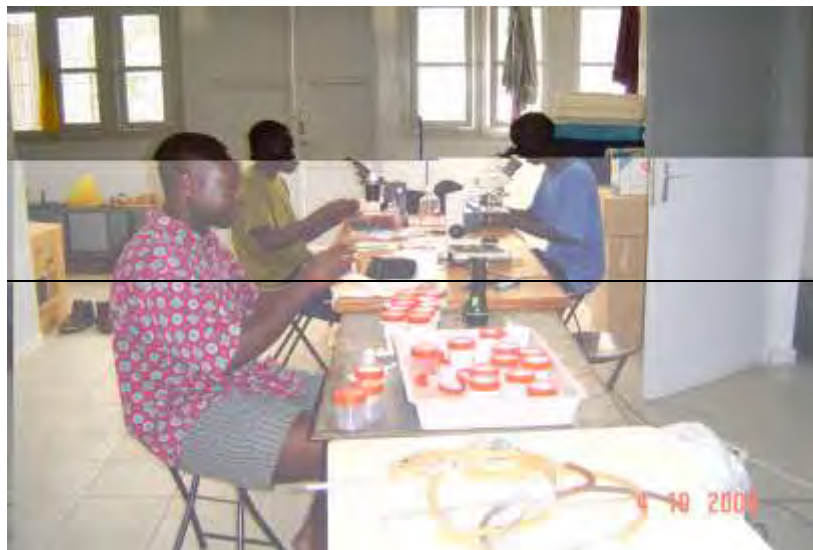


Figure VII : Recherche des oocystes au microscope et preparation des gobelets de moustiques

Deux paramètres d'évaluation de l'infection ont été établis: le pourcentage de moustiques infectés parmi les moustiques survivants disséqués et le nombre moyen d'oocyste par tube digestif infecté pour chaque lot. Pour avoir une précision suffisante du pourcentage et de la densité oocystique moyenne, seuls les lots ayant au moins 20 anophèles survivants au septième jour ont été disséqués.

Deux techniques de gorgement artificiel ont été utilisées : le gorgement direct des moustiques sur la peau d'un individu (DIR) et le gorgement artificiel avec manipulation du sang (OWN-AB).

3.1. Gorgement direct (DIR)

Le but de cette technique est de savoir si un individu porteur ou non de gamétocytes est infectant pour les moustiques, à un moment donné.

Un gobelet contenant un lot de 30 femelles agressives et saines a été appliqué sur le bras ou la cuisse du patient pendant une dizaine de minute (photo). Pour une bonne réussite du gorgement, il est important que le sujet évite de bouger. Ceci peut être obtenu chez le jeune enfant en l'occupant et en lui distribuant des sucettes. Après le gorgement, une désinfection à l'alcool et un étalement de pommade antihistaminique ont été réalisés.



Figure XIII : gorgement direct des moustiques sur la peau (au niveau du bras)

Cette technique est bien supportée par les sujets de plus de 5 ans et à condition d'avoir fait une démonstration préalable sur nous-même et de ne pas dépasser 30 femelles par gobelet.

3.2. Gorgement sur membrane de parafilm®

Le but ici est de savoir si le plasma des porteurs de gamétocytes contient des « substances » inhibitrices de l'infection chez le moustique. Pour cela nous avons utilisé le test du DMFA classique. Un appareillage de gorgement artificiel en verre, fermé par une membrane de Parafilm ® et chauffé à 37°C par un courant d'eau chaude provenant d'un bain marie (Rutledge *et al.*, 1964). Ce courant d'eau chaude à 37°C a permis de retarder l'exflagellation des gamétocytes et donc de sauver leur infectivité. Le sang a été introduit dans l'appareil et déposé à sa base, sur la membrane. Les moustiques ont piqué à travers cette membrane pour aspirer le sang.



Figure XIV : Gorgement artificiel des moustiques à travers une membrane de parafilm

Nous avons réalisé une prise de sang hépariné au pli du coude dans un vacutainer de 5 ml préalablement chauffés à 37°C. Immédiatement après le prélèvement 1 ml de sang a été déposé dans une des cellules de gorgement en verre pour réaliser une infection immédiate (IM) avec le sang total, afin de savoir s'il est infectant. Le reste du sang (4 ml) a été aliquoté dans 2 tubes de 2 ml préchauffés à 37°, puis centrifugé à 37°C pendant 5 minutes à 2500 trs/min, dans une centrifugeuse à l'intérieur d'une étuve bactériologique. Après centrifugation, le plasma a été aspiré dans les 2 tubes et conservé à 37°C dans le bain-marie. Dans le premier tube (OWN), 1 ml du plasma a été rapidement rajouté au culot globulaire. Dans le deuxième tube (AB) c'est 1 ml de sérum AB (témoin sain) préchauffé à 37°C, qui a été rajouté au culot globulaire. Le tube AB est un témoin sans substance sérique inhibitrice.

Ainsi avons nous obtenu une série de 3 cellules de gorgement remplies respectivement de sang total non manipulé (IM) de sang reconstitué (OWN) et de sang témoin (AB).

Les gobelets contenant les moustiques ont alors été placés sous les cellules et les anophèles se sont gorgées à travers la membrane de parafilm® pendant une période de 15 minutes.

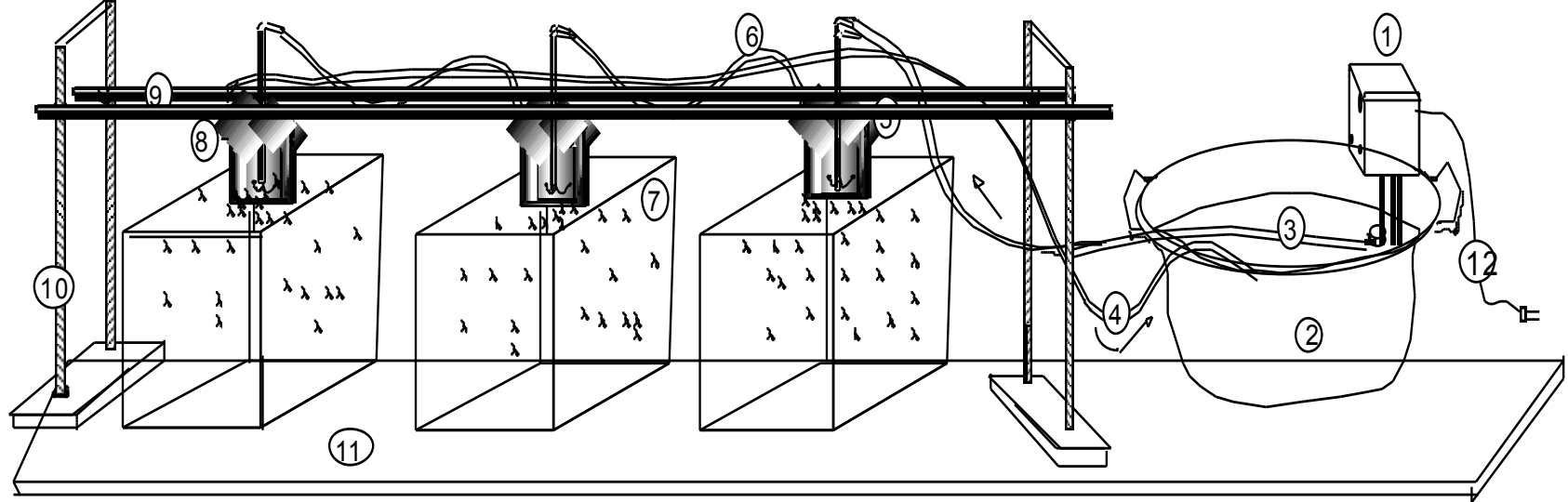


Figure XV: Série de gorgement sur membrane (Technique d'infection expérimentale)

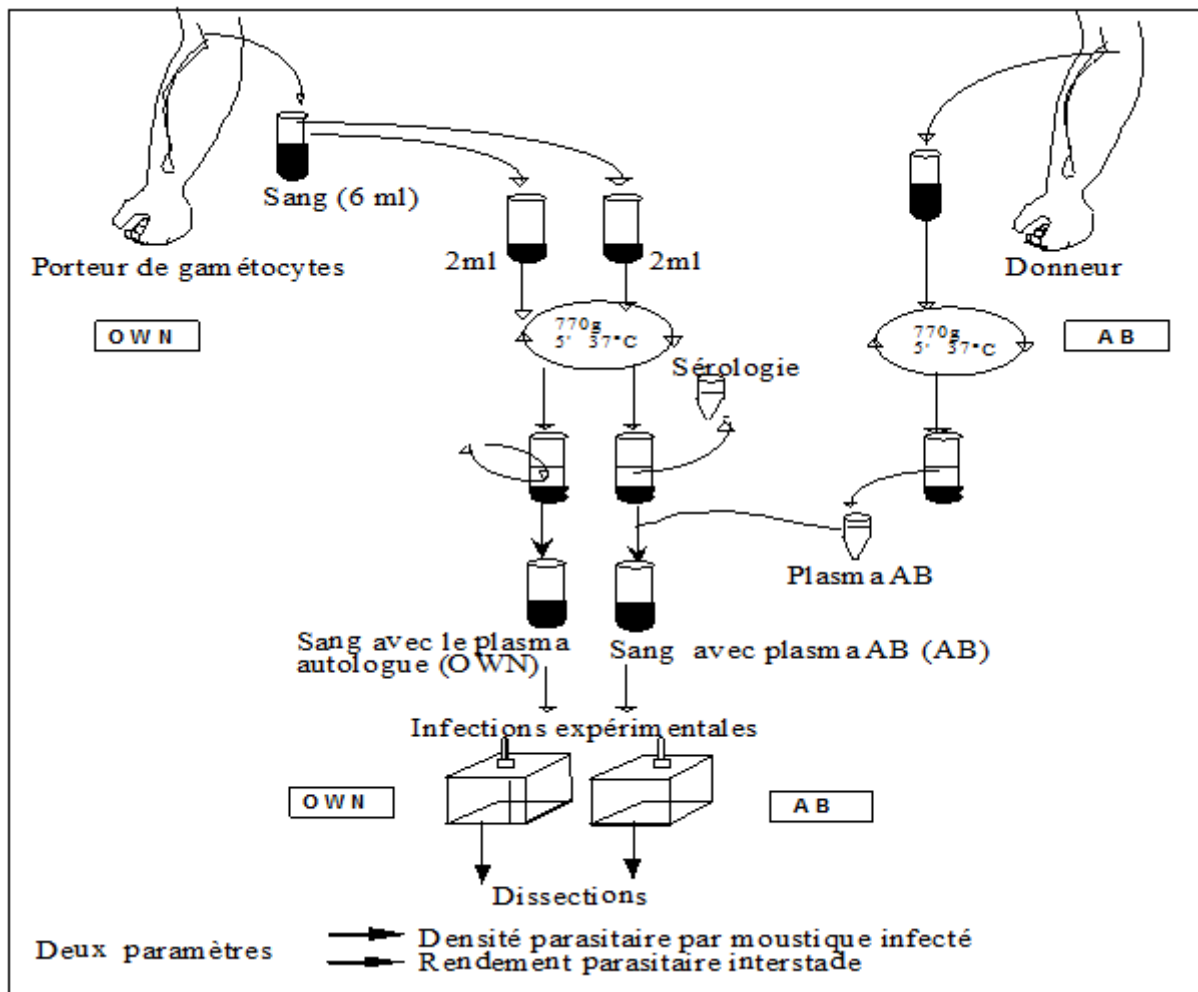


Figure XVI : Principe du Gorgement OW-AB

A cause des risques d'exflagellation, diminuant l'infection chez le moustique et du mauvais rendement du cycle sporogonique dans les conditions naturelles :

- ◆ Il n'y a généralement pas de corrélation linéaire entre densité gamétocytaire et infectivité pour le moustique.
- ◆ Il faut utiliser des gros porteurs de gamétocyte pour multiplier les chances d'obtenir des infections positives. Un « gros » porteur présente plus de 5 gamétocytes sur une traversée de goutte épaisse.
- ◆ Il faut manipuler à 37°C et éviter au maximum le contact avec l'air, donc travailler rapidement.
- ◆ Les moustiques doivent être affamés avant gorgement pour augmenter la quantité de sang ingéré.
- ◆ Il ne faut pas manipuler les moustiques gorgés qui sont très fragiles

- ◆ Un repas sanguin complémentaire n'est pas nécessaire chez ces moustiques infectés pour accroître la maturation oocystique.

Sept jours après gorgement artificiel, les moustiques survivants ont été disséqués et les pourcentages d'infection entre les lots OWN et AB ont été comparés. Nous n'avons pas utilisé la moyenne des charges oocystiques comme paramètre de comparaison, car elle est généralement faible et de distribution hétérogène. Si le % OWN est significativement inférieur à celui de AB, c'est que le plasma du sujet testé contient des substances inhibitrices. On utilise un degré de signification de 1% pour avoir une différence suffisamment grande et donc reproductible entre OWN et AB. Il faut disséquer au moins 20 moustiques dans chaque lot pour avoir une bonne sensibilité de la comparaison.

4. Etude de la morbidité

Une étude sur la morbidité palustre et la chimiorésistance des parasites locaux à différents antipaludiques a été menée sur l'année 2004 dans le plus gros village de la zone (Hanène, 1500 habitants). Le principe était de détecter tous les accès palustres dans une population, au cours de l'année, afin de déterminer l'incidence palustre par tranches d'âge et le portage de gamétocytes après traitement.

Nous avons formé des enquêteurs chargés de passer tous les jours, de case en case, pour interroger les gens, le matin avant le départ aux champs. L'interrogatoire a porté sur les quelques symptômes évocateurs de l'accès palustre simple ou grave. Devant tout signe de gravité, l'enquêteur envoyait directement le malade au dispensaire du village pour prise en charge. Devant tout accès fébrile rapporté, l'enquêteur effectuait une prise de température le matin tôt et en fin d'après midi, avec une goutte épaisse systématique. Celle-ci était alors colorée et lue par un responsable l'après-midi et les résultats et l'éventuel traitement antipalustre étaient donnés au malade lors de la deuxième prise de température. Pour toute autre maladie, le sujet était envoyé au dispensaire. La lecture des gouttes épaisses se faisait en semi-quantitatif comme décrit plus haut et un accès palustre était défini par l'association d'une fièvre avec une charge parasitaire de plus d'un tréphozoïte par champ de goutte épaisse.



Figure XVII : Coloration des gouttes épaisse au Giemsa

L'efficacité du traitement était contrôlée à J3, J7 et J14 après absorption contrôlée du médicament. La sulfadoxine-pyriméthamine a été utilisée.

A la fin de l'enquête nous avons pu déterminer l'incidence palustre par tranche d'âge et le nombre moyen d'accès palustres par an et par tranche d'âge. Parallèlement le niveau de chimiorésistance a été estimé par les taux de résistances de niveau I, II et III selon les critères de l'OMS, sur la tranche d'âge des sujets non ou peu prémunis (6 mois à 12 ans). Enfin nous avons pu estimer le pouvoir gamétocytochrome de la sulfadoxine pyrimethamine.

5. Etude de la transmission homme-moustique (THM)

Le principe a été de dépister les sujets infectant les moustiques dans un échantillon représentatif de la population, à un moment donné. L'étude n'a porté que sur la période de transmission de septembre à novembre 2010. En effet, les porteurs de gamétocytes sont exceptionnels, les vecteurs du paludisme sont absents et la transmission peut être considérée comme nulle en saison sèche.

Nous avons recensé la totalité de la population de trois villages dans la zone, en attribuant un numéro d'identification à chaque famille et à chaque individu. Ces villages ont été choisis sur la taille de la population (> 300 individus), sur la diversité relative des faciès écologiques dans la zone et sur l'autorité des notables. Une forte sensibilisation a été faite par nous-même et nos enquêteurs, afin d'expliquer aux villageois les buts de notre étude, ses avantages et ses contraintes. Après sensibilisation, nous avons sélectionné environ 25 familles (nucléaires) volontaires de plus de 5 personnes, afin d'avoir un échantillon représentatif sur l'âge. Une

goutte épaisse systématique et un gorgement direct ont été réalisés chez chaque individu inclus. L'infection a été faite sans tenir compte de la gamétocytemie des individus. Les familles ont été récompensées avec des moustiquaires imprégnées et les fortes charges parasitaires asexuées ont été traitées avec l'association sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine.

Après infection des moustiques, des gouttes épaisses ont réalisées sur chaque sujet testé. Les moustiques ont été dissequés 7 jours plus tard. Vingt moustiques ont été disséqués pour chaque individu. Nous avons pu ainsi établir un certain nombre de paramètres sur l'infectivité d'une population humaine et sur l'infection d'une population de moustiques. Ces paramètres ont été précédemment décrits dans le § 3.3.1. Il s'agissait :

- du pourcentage de sujets infectants pour les moustiques pendant la période d'étude (B)
- de l'indice gamétocytaire (IG) ou la densité gamétocytaire moyenne (DGM) en moyenne géométrique.

de la contribution d'un groupe de population au réservoir de moustiques infectés : $F_i / \sum F_i$, avec $F_i = A_i * B_i * C_i$ (Githeko *et al.* 1992). Expliquons cette formule. (i) se rapporte à une tranche d'âge de la population. Pour chaque tranche d'âge, on calcule 3 paramètres : (1) A_i qui est la proportion d'une tranche d'âge dans la population générale, obtenue à partir d'un recensement récent. (2) B_i est la proportion de sujets infectant dans cette tranche d'âge. (3) C_i est la proportion de moustiques infectés par des oocystes, 7j après gorgement, sur les sujets infectants de cette tranche d'âge.

- de la proportion moyenne de moustiques infectés sur sujets infectants (C).
- de la proportion de repas sanguins infectants (K).

6. Etude de la « Transmission Reducing Activity » (TRA)

L'étude sur la TRA a été réalisée dans la plupart des villages et écoles de la zone entre 2003 et 2006. Le principe a été de dépister les sujets dont le sérum est inhibiteur de l'infection des moustiques. Le test d'infection artificielle utilisé ici a été le « direct membrane feeding assay » (DMFA classique). Comme il était nécessaire d'avoir de fortes infections, aussi bien en OWN qu'en AB, malgré les exflagellations de gamétocytes pendant la manipulation du sang, ou l'inhibition d'infection due au sérum, nous n'avons sélectionné que des « gros » porteurs (plus de 40 gamétocytes/mm³). Ainsi la TRA n'a été étudiée que dans un échantillon de gros porteurs de gamétocytes. Pour des raisons de facilité des prises de sang intraveineux, nous n'avons retenu que des porteurs de plus de 5 ans.

Après les infections, des moustiquaires imprégnées ont été distribuées aux sujets inclus. Aucun traitement anti-gamétocyte n'a été donné à cause des risques de toxicité avec les amino-8-quinoléines.

Un sujet a été considéré comme inhibiteur quand l'infection en OVN a été significativement (risque 1%) inférieure au lot AB. Nous avons pu ainsi déterminer un certain nombre de paramètres épidémiométriques qui ont été précédemment expliqués (voir § 3.2.3). Il s'agissait de :

- La proportion de sujets inhibiteurs
- L'intensité moyenne de la TRA.
- Le poids de la TRA sur l'inhibition totale.

Au terme de cette étude, nous avons obtenu un certain nombre d'indicateurs de morbidité, de THM et de TRA, que nous allons maintenant analyser dans le chapitre suivant.

RESULTATS

Dans ce chapitre sont exposés les principaux résultats obtenus. Tout d'abord nous donnons une image de l'infection parasitaire dans la population. Puis nous décrivons la morbidité palustre dans le plus gros village de la zone, suivi pendant 1 an. Dans un troisième temps nous abordons la gamétocytenèse post-thérapeutique. Enfin, sont successivement abordés la description de la TRA et de la THM dans cette zone.

1. Niveaux de la parasitémie dans la population

Au cours des enquêtes transversales répétées, pour dépister des porteurs de gamétocytes, nous avons réalisé un grand nombre de gouttes épaisses, pendant la saison de transmission de Septembre à Décembre. Les principaux résultats sont analysés dans le premier paragraphe.

Lors de l'étude de la morbidité sur 1 an dans le plus gros village de la zone, nous avons aussi obtenu un profil parasitaire de la population. Mais l'échantillon était différent puisqu'il s'agissait de sujets se plaignant d'une pathologie évocatrice d'accès palustre. Cependant il a permis une analyse sur 1 an.

1.1. La parasitémie globale dans la zone d'étude

De 2001 à 2006, des gouttes épaisses ont été collectées et lues en semi-quantitatif.

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau 2:

Classes d'âge	Effectif	IP (%)	IG (%)	% (≥ +++)	% « gros » porteurs
0-5	1473	15,7	5,9	8,7	0,8
6-10	3923	10,6	4,4	5,8	0,5
11-15	1513	15,0	4,9	7,9	0,8
16-30	946	8,9	4,4	5,2	0,3
>30	1098	11,9	3,2	6,1	0,4
2-9 ans	4100	12,8	5,3	7,1	0,6

Tableau 2 : Répartition des indices parasitaires dans la zone en fonction des classes d'âge

Lecture des gouttes épaisses en semi-quantitatif sur 1 diamètre de l'étalement (environ 600 globules blancs, donc seuil de lecture approximative de 10 parasites/mm³)

(≥ +++) fortes charges parasitaires (un ou plus d'un parasite par champs de goutte épaisse)

« gros » porteur = plus de 4 gamétocytes par traversée d'une goutte épaisse

Les résultats montrent que les prévalences asexuées sont généralement faibles en période de transmission, avec un indice plasmodique observé de 12,8% chez les 2-9 ans, ce qui confirme bien le niveau hypoendémique de la zone. L'indice gamétocytaire est aussi assez faible avec en moyenne 5,3% seulement chez les 2-9 ans. Mais la lecture semi-quantitative sous estime les faibles charges gamétocytaires et donc l'indice gamétocytaire. Il y a une prévalence relativement importante des fortes charges parasitaires asexuées, avec 7,1% en moyenne chez les 2-9 ans (plus du double de l'indice plasmodique global). La fréquence des « gros » porteurs (plus de 4 gamétocytes / traversée de goutte épaisse) est relativement faible, puisque nous n'observons en moyenne que 6 « gros » porteurs pour 1000 gouttes épaisses.

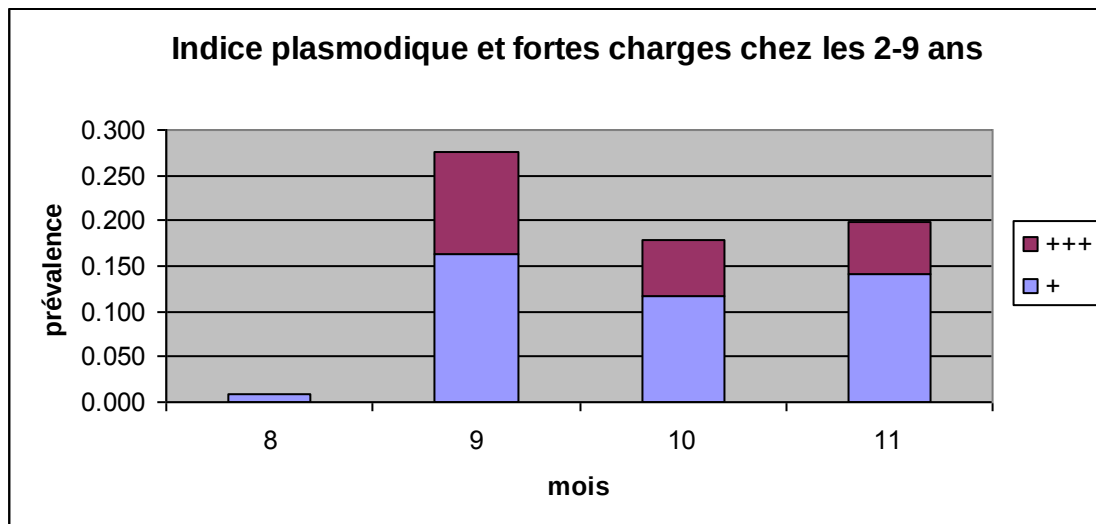


Figure XVIII : Répartition des indices plasmodiques et fortes charges parasitaires pendant les 4 mois de transmission chez les 2-9 ans.

+++ fortes charges parasitaires asexuées (> 1 parasite/champs de goutte épaisse)

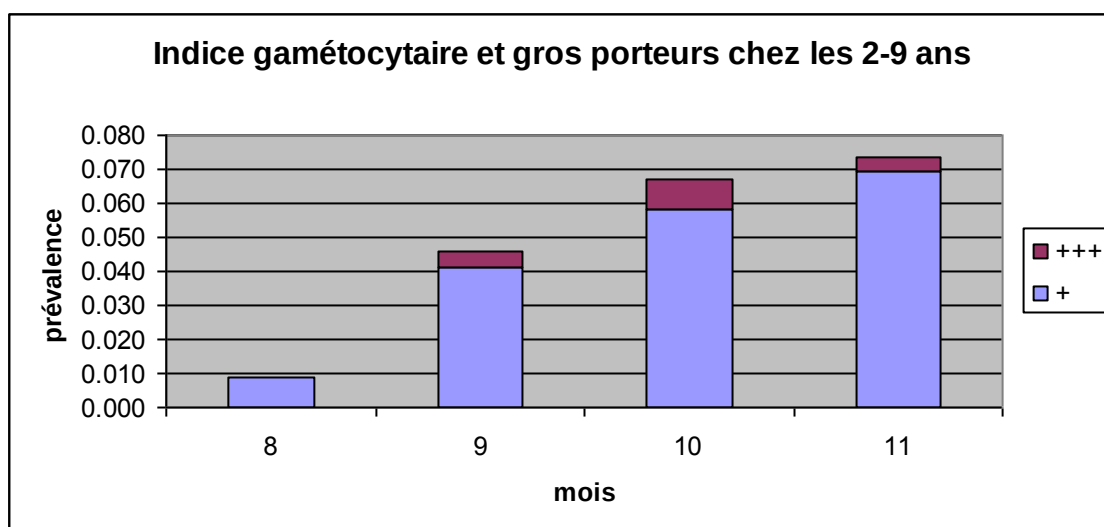


Figure XIX : Répartition des indices gamétocytaires et « gros » porteurs pendant les 4 mois de transmission chez les 2-9 ans.

+++ « gros » porteurs de gamétocytes (> 4 par traversée de la goutte épaisse)

La répartition des indices parasitaires en fonction des 4 mois de transmission montre que les prévalences asexuées deviennent importantes à partir d'Octobre, soit 2 mois après le début de la saison des pluies. D'autre part, il existe encore des porteurs de gamétocytes au tout début de la saison de transmission (1%), ce qui explique la rapide montée des indices plasmodiques dès Septembre quand les populations anophéliennes deviennent véritablement vectrices.

1.2. Parasitémie dans l'échantillon de morbidité.

Durant l'année d'étude de la morbidité un total de 1300 gouttes épaisses a été confectionné. L'observation microscopique de ces gouttes épaisses a révélé la présence d'hématozoaire chez 544 sujets, soit un indice plasmodique d'environ 42% et un indice gamétocytaire de seulement 1,5%.

Classes d'âge	Effectif	IP (%)	% (≥ +++)
0-5	291	38,0	25,1
6-10	284	52,9	32,4
11-15	215	46,6	30,7
16-30	255	37,2	19,5
> 30	255	36,3	19,0
Total	1300	42,1	25,5

Tableau 3 : Répartition de la parasitémie de *P.falciparum* en fonction de l'âge

(≥ +++) fortes charges parasitaires (un ou plus d'un parasite par champs de goutte épaisse)

IP = indice plasmodique

IG = indice gamétocytaire

Le tableau 3 ne montre pas de différence importante entre les indices plasmodiques chez les enfants et les adultes. Plus de 35% de ces derniers sont porteurs de parasites sur 1 an de suivi. Ceci traduit probablement deux choses : un manque d'immuno-protection ou/et un échantillonnage biaisé par le recrutement de « malades ». On doit aussi noter que dans cet échantillon biaisé on observe 25% de fortes charges asexuées, au lieu des 7% observés dans un échantillon tout venant (Tableau 1).

L'IP est « surévalué » par rapport aux enquêtes dans la zone, probablement parce que nous nous sommes adressés à des sujets « malades », mais aussi parce que les classes d'âge de moins de 16 ans dominent dans cet échantillon.

L'intérêt du suivi annuel est qu'il permet de suivre l'évolution de la parasitémie en fonction du cycle de transmission.

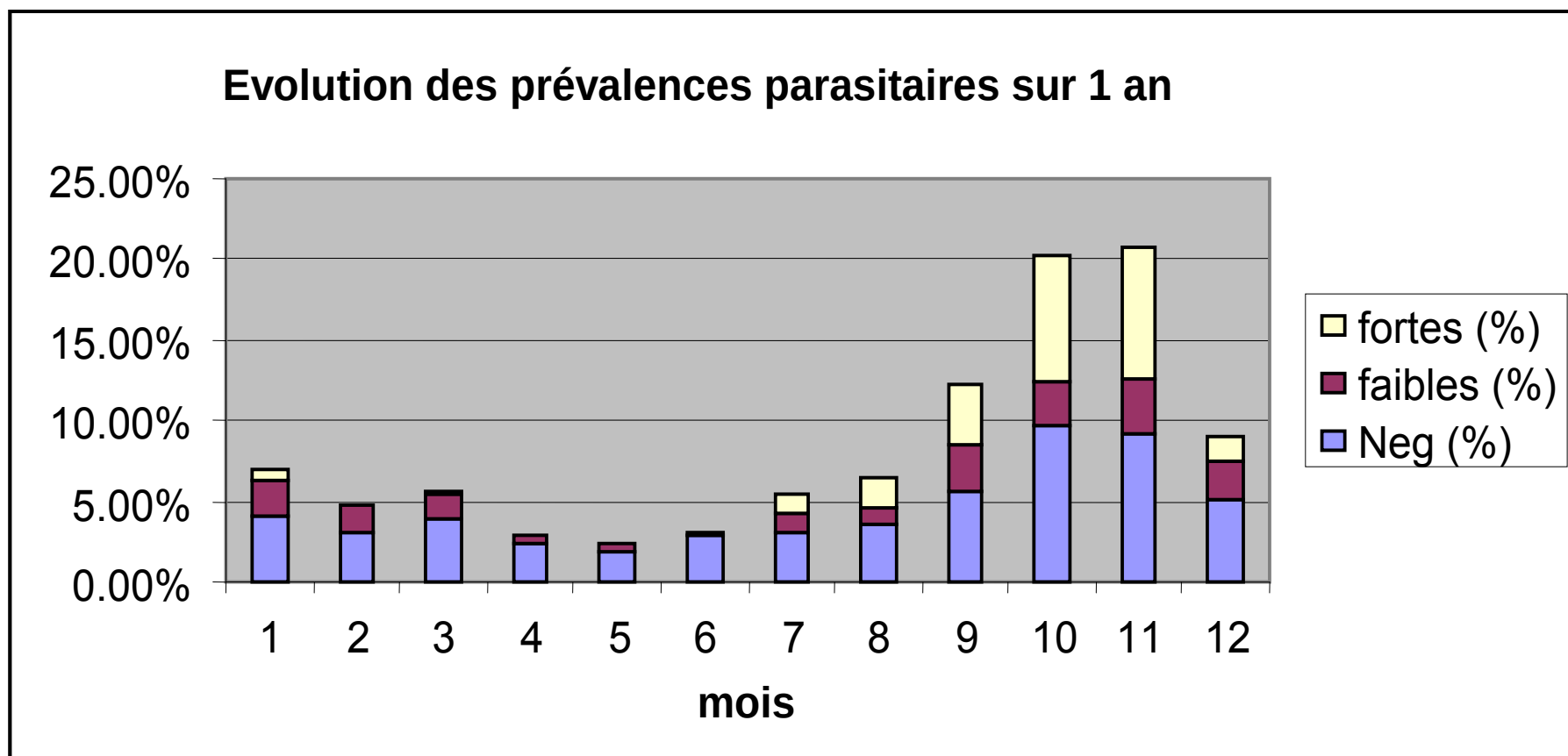


Figure XX : Evolution des prévalences parasitaires sur 1 an

Fortes = fortes parasitémies (≥ 1 parasite/champs)

Faibles = faibles parasitémies (< 1 parasite/champs)

Neg = sujets négatifs

Les prévalences et charges parasitaires sont faibles de février à juin (en général < 5%). Dès le mois de juillet, les fortes charges (accès palustres potentiels) commencent à apparaître, pour atteindre un maximum en Octobre – Novembre et disparaître en fin janvier. Mais la prévalence globale reste inférieure ou égale à 20%. Nous sommes donc bien en zone hypoendémique, et la période de transmission probable s'étale de Juillet à Janvier.

2. La morbidité palustre

La morbidité palustre a été étudiée dans la population de Hanéne, le plus gros village de la zone (1500 habitants) pendant l'année 2004. Cette étude a été effectuée sur 12 mois, afin de tenir compte des fluctuations saisonnières de la transmission. Elle a permis de déterminer l'incidence palustre et le nombre moyen d'accès palustres par individu et par an, dans la zone. Toute la population sédentaire était suivie quotidiennement.

2.1. Les fébriles parmi les consultants

C'est un paramètre important à déterminer dans le cadre santé publique. Ceci va permettre d'estimer la surestimation de la morbidité, notamment pendant la période de très faible transmission.

Au total 420 accès fébriles ont été observés par nos enquêteurs sur les 1242 sujets suivis en permanence dans le village chaque jour. La répartition mensuelle est résumée dans le graphique XXI.

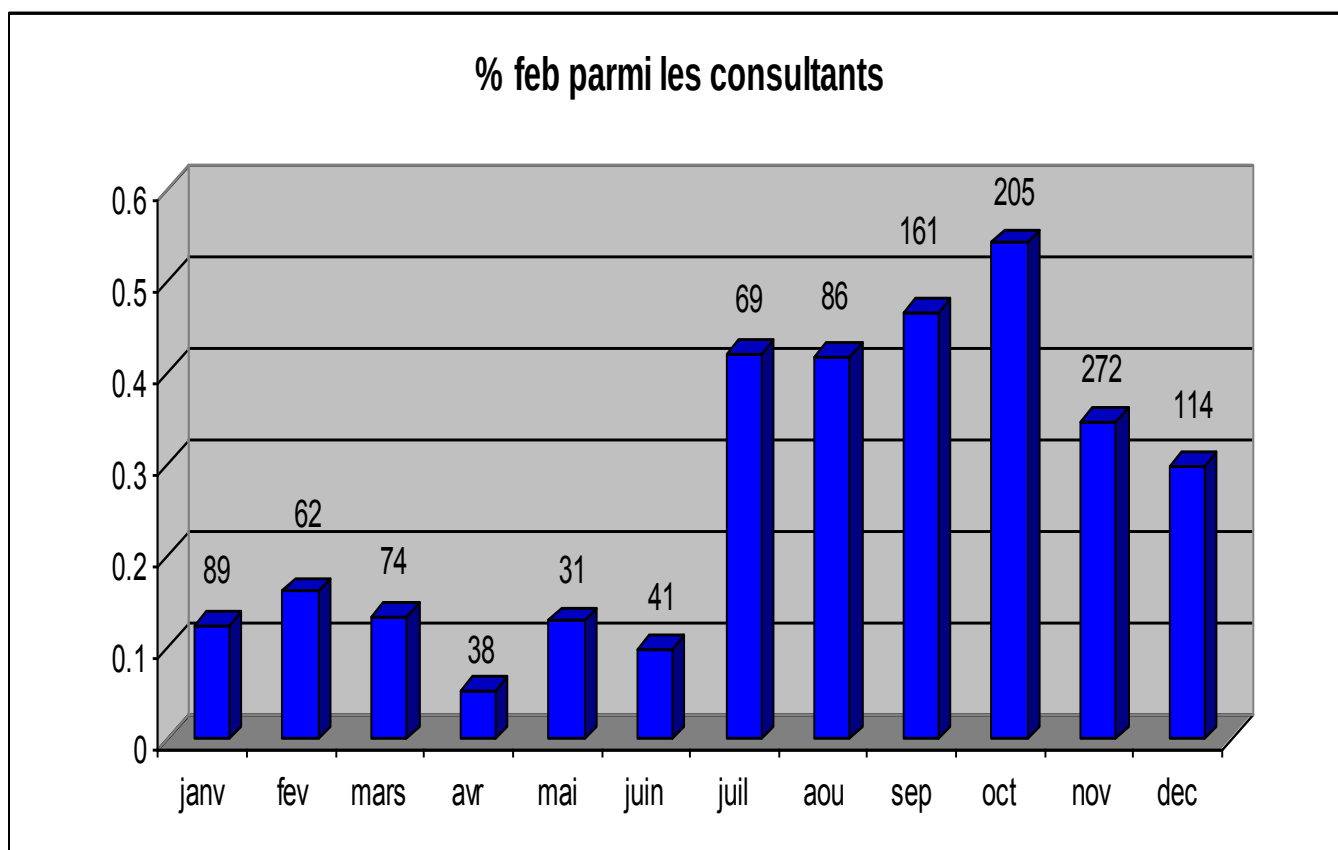


Figure XXI : Répartition mensuelles des accès fébriles

Les chiffres en haut des barres correspondent à l'effectif des consultations.

Comme attendu, le maximum des accès fébriles est observé pendant la saison de transmission (Juillet à Décembre). Le pourcentage des fébriles parmi les consultants atteint en moyenne 40% à cette période. Mais nous remarquons qu'une petite proportion de sujets fébriles est considérée comme accès palustres pendant la saison de très faible transmission (Février à Juin) alors que la morbidité est nulle à cette période, comme nous le verrons plus loin (voir Figure XXIII). A l'absence d'un test de diagnostic rapide, seulement 30 accès fébriles sur 420 (7%) seraient indûment traités.

2.2. Taux d'incidence palustre

Nous rappelons que le taux d'incidence exprime la proportion (en millième) d'individus malades parmi les sujets examinés, en un temps bien déterminé. Nous rappelons aussi qu'un accès palustre se définit comme une association de fièvre ($> 37,5^{\circ}\text{C}$) et une forte parasitémie

arbitrairement fixée à au moins 1 parasite par champs de la goutte épaisse (sur le terrain) ou 1000 parasites/mm³ après lecture différée des gouttes épaisses. Dans ces conditions, l'incidence palustre mensuelle a pu être estimée (figure XXII).

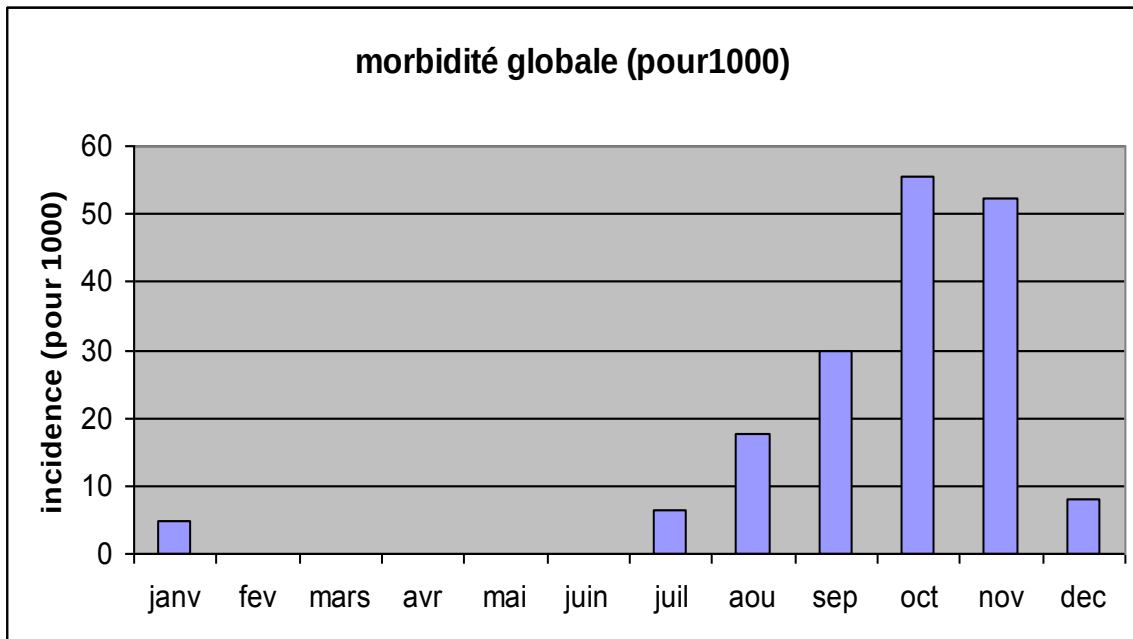


Figure XXII : Evolution du taux d'incidence mensuelle sur 1 an de surveillance

Ce graphique montre que la période classique de morbidité palustre s'échelonne entre Juillet (début de la saison des pluies) et Janvier, avec un maximum en Octobre et Novembre qui dépasse les 50 cas d'accès palustres sur 1000 individus examinés.

2.3. Proportion d'accès palustres fébriles et non fébriles

L'infirmier ne considérait que les accès fébriles comme potentiellement des accès palustres. La définition d'un accès palustre associe à la fois une fièvre et une forte parasitémie. Mais la fièvre palustre est de courte durée et souvent nocturne. Il est donc possible de passer à côté d'un accès palustre, même avec 2 prises de température par jour. Nous avons donc voulu connaître la proportion de fortes charges parasitaires (> 1000 parasites/mm³) parmi les sujets non fébriles, charges parasitaires qui auraient dues être aussi traitées dans cette population partiellement prémunie (figure XVI).

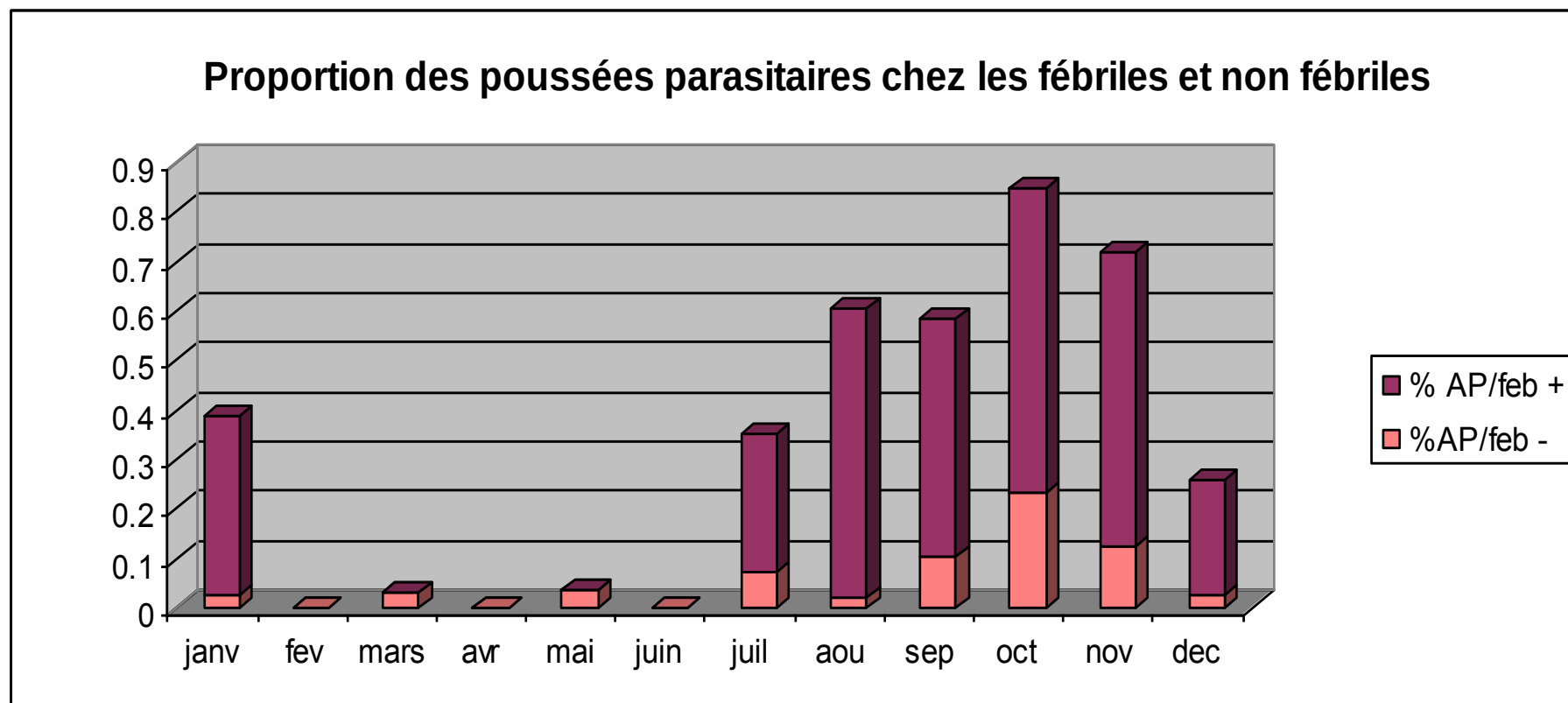


Figure XXIII : Proportion des poussées parasitaires chez les fébriles et non fébriles.

Ici, AP signifie accès palustre potentiel.

Nous remarquons qu'environ 5,6% des fortes charges parasitaires ne déclenchent pas de fièvre. Mais cette proportion peut aller jusqu'à 20% au pic de morbidité. Ce pourcentage de fortes charges parasitaires non prises en charge n'est donc pas négligeable dans une population peu prémunie, surtout en saison de transmission. Cependant on peut s'attendre à ce que ces fortes charges finissent par déclencher un accès fébrile dans les heures ou les jours suivants.

2.4. La densité d'incidence palustre

Nous rappelons qu'il s'agit du rapport du nombre de nouveaux cas en un temps donné, sur le total des durées d'exposition au risque (ou la somme du temps d'observation de chaque individu non malade). La densité d'incidence par classe d'âge est illustrée dans la figure XXIV.

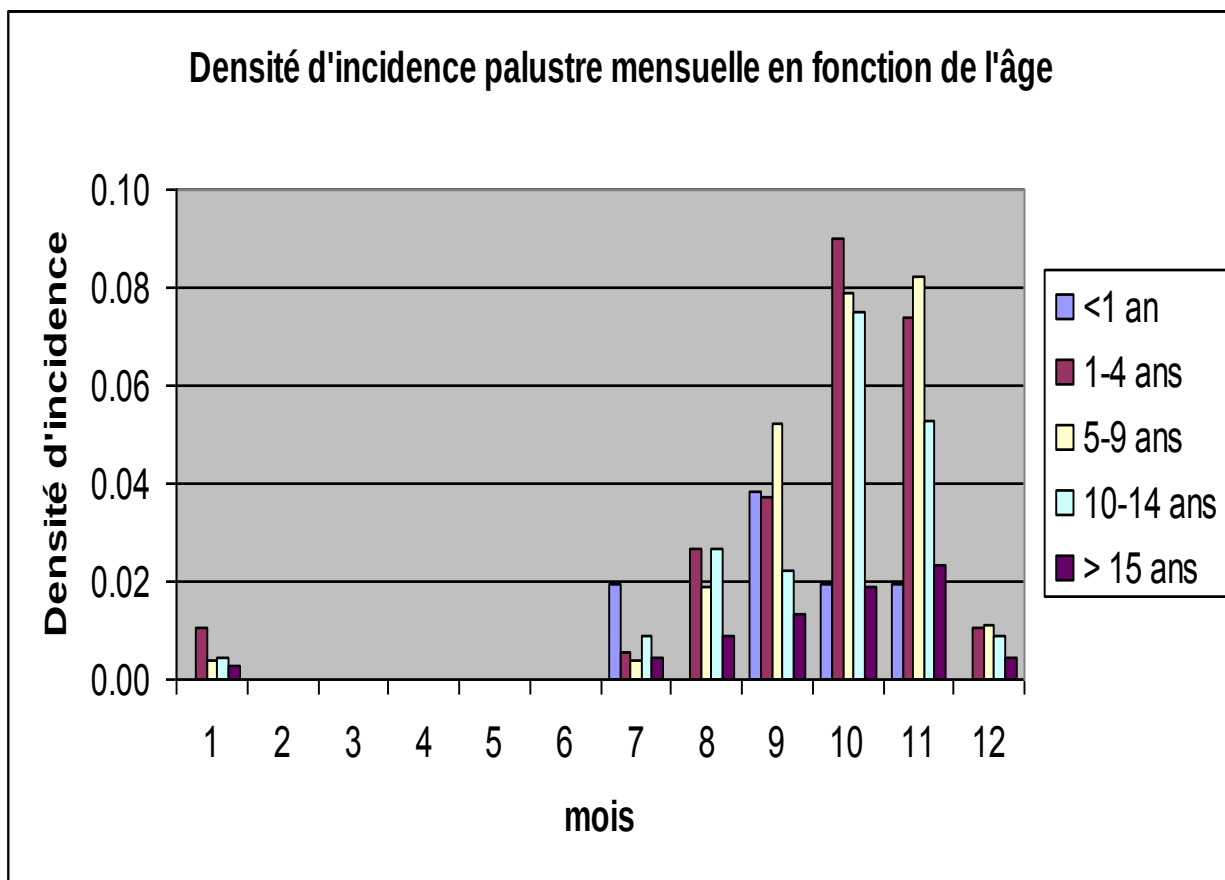


Figure XXIV : Densité d'incidence par classes d'âges

Nous obtenons la même allure évolutive de la morbidité que dans le graphique du taux d'incidence. Ce sont les classes des 1-4 et 5-9 ans qui payent le plus lourd tribut à la morbidité palustre. Bien que l'incidence soit faible chez les adultes, les accès palustres sont encore possibles, ce qui traduit une inefficacité partielle de l'immunité antipalustre.

2.5. Le nombre moyen d'accès palustres par individu et par an

Ce paramètre pourrait illustrer le « poids » du paludisme « maladie » dans la population. C'est une simple fréquence des accès palustres que nous donnons pour chaque classe d'âge.

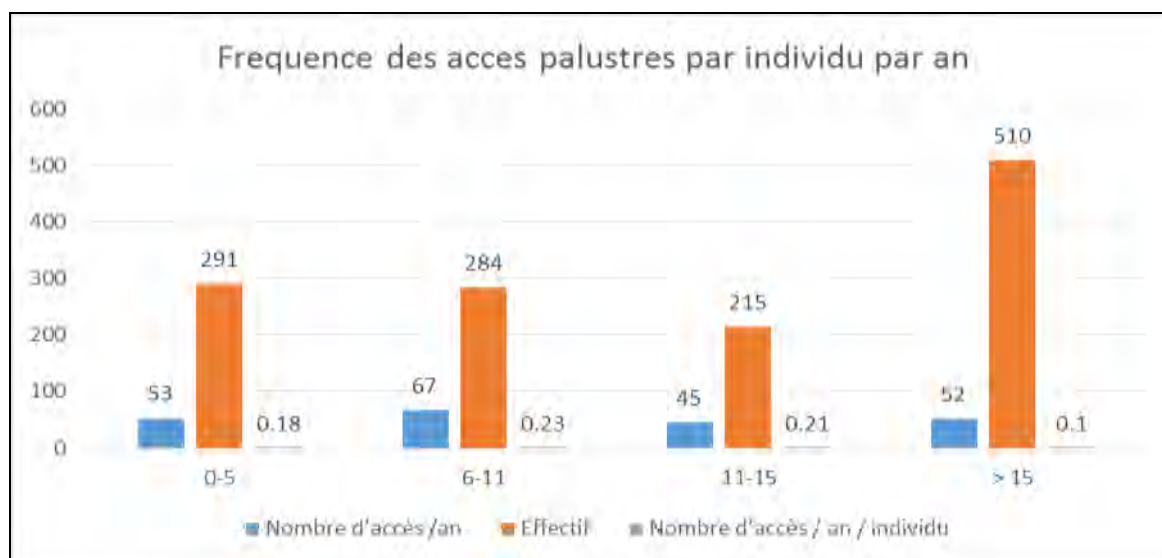


Figure XXV : Fréquence théorique des accès palustres par individu et par an en fonction de l'âge.

Le maximum des accès palustres est enregistré chez les 6-10 ans avec près de 0,25 AP/personne/an donc environ 1 accès palustre/personne tous les 4 ans. Par ailleurs, les adultes font encore en moyenne 1 accès palustre tous les 10 ans !

En fait, ce ne sont que quelques personnes qui font la quasi-totalité des accès palustres.

Nous résumons dans le tableau 4 la réalité des chiffres.

Classes d'âge	Nombre d'accès /an	Effectif (*)	Nombre d'accès / an / individu
0-5	53	45	1,1
6-10	67	59	1,1
11-15	45	40	1,1
> 15	52	47	1,1

Tableau 4 : Fréquence observée des accès palustres par individu et par an.

(*) effectif des sujets faisant véritablement un accès palustre.

On peut donc voir que les sujets exposés au paludisme maladie font un peu plus d'un accès palustre par an, même en ce qui concerne les adultes.

2.6. Densité parasitaire chez les accès palustres

Nous avons pu observer 217 accès palustres. Ici nous étudions la répartition des densités parasitaires moyennes de ces accès palustres pour chaque tranche d'âge (tableau 5).

Classes d'âge	Effectif	Nombre d'AP	Nombre de +++ (%)	Nombre de ++++ (%)	Nombre de +++++ (%)
0-5	291	53	24 (45,3)	21 (39,6)	8 (15,1)
6-10	284	67	26 (38,8)	28 (41,8)	13 (19,4)
11-15	215	45	17 (37,7)	21 (46,6)	7 (15,5)
> 15	510	52	29 (55,7)	19 (36,5)	4 (7,6)
TOTAL	1300	217	96 (44,2)	89 (41)	32 (14,7)

Tableau 5 : Répartition des densités parasitaires moyennes chez les accès palustres en fonction des classes d'âge.

Sur les 217 accès palustres, 14% ont une densité de 5 croix, ce qui correspond à une densité parasitaire moyenne de 75823 p/mm³. 41% ont une densité de 4 croix, soit 20586 p/mm³. 44% ont une densité de 3 croix, soit 5155 p/mm³. Les densités parasitaires sont donc relativement fortes chez ces accès palustres, même chez les adultes.

On ne remarque pas de diminution franche de la fréquence des 3, 4 ou 5 croix en fonction de l'âge. Ceci peut évoquer une absence presque complète d'immuno-protection dans toutes les tranches d'âge.

3. Chimiorésistance aux antipaludiques

Dans cette partie la résistance des souches a été déterminée selon 2 méthodologies différentes. La première a estimé la chimiorésistance sur le suivi post-thérapeutique de la parasitémie résiduelle (RI, RII et RIII). La deuxième méthodologie a estimé l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la parasitémie post-thérapeutique et de la fièvre résiduelle. Cette dernière méthode explore l'efficacité thérapeutique chez des malades.

3.1. Chimiorésistance à la sulfadoxine pyriméthamine (SP)

La sulfadoxine pyriméthamine (SP) a été testée *in vivo* chez 89 porteurs de plus de 1000 parasites/mm³, fébriles ou non. Les résultats ont donné une résistance globale 4,5% (89). Il n'y a pas eu de résistance RIII dans la zone. La répartition des taux de résistance en fonction des classes d'âge est donnée dans le tableau 6

Classes d'âge	Sensibles	Résistance R1	Résistance R2	% de résistants
0-5	33	0	1	2,9
6-10	35	3	0	7,9
11-15	24	2	0	7,7
> 15	26	2	0	7,1

Tableau 6 : Répartition des SP résistances en fonction des classes d'âge

Il n'y a pas de diminution progressive des taux de résistance en fonction de l'âge. Finalement nous allons retenir un taux de chimiorésistance à la SP d'environ 7% dans la zone.

Après avoir étudié la chimiorésistance de la sulfadoxine pyriméthamine sur un suivi uniquement parasitologique, nous allons maintenant explorer l'efficacité thérapeutique à la SP en tenant compte aussi de la clinique. Ici nous avons à faire avec des sujets malades.

3.2. Efficacité thérapeutique à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP)

Vingt sept sujets de moins de 6 ans ont été testés. On a observé seulement un cas d'échec thérapeutique tardif, soit un pourcentage de 96,3% de guérisons cliniques apparentes. Ce test confirme donc les bons résultats observés en chimiorésistance.

4. Gamétocytogénèse et antipaludiques

La gamétocytogénèse est le processus par lequel, se forment les gamétocytes, après une « souffrance » parasitaire. Ce processus est parfois influencé par la chimiorésistance qui fait souffrir le parasite sans le tuer ou par l'action de certains médicaments comme la SP. Mais elle peut aussi résulter d'une forte poussée asexuée accompagnée d'une poussée inflammatoire, comme dans l'accès palustre, et qui fait souffrir le parasite, entraînant une déviation vers la gamétocytogénèse.

4.1. Gamétocytogénèse et résistance à la SP

On a cherché à comparer le pouvoir gamétocytogène des souches SP sensibles et résistantes et parmi les souches résistantes, comparer la gamétocytogénèse en fonction du niveau de résistance. Théoriquement, plus le niveau est élevé plus la souffrance devrait être importante, donc plus il devrait y avoir de poussées gamétocytaires.

Les principaux résultats sont donnés dans le tableau 7

	Sujet Résistant	Sujet Sensible
Effectif	8	118
% Pgam	62,5%	58,5%

Tableau 7 : Fréquence des poussées gamétocytaires en fonction de la SP-résistance

L'effectif de souches SP résistante est insuffisant pour estimer la gamétocytogenèse de la souche.

4.2. Relation entre traitement à la SP et poussée gamétocytaire

Ici nous comparons les fréquences des poussées gamétocytaires post-thérapeutiques après traitement à la CQ, qui va servir de gold standard et après traitement à la SP (tableau 8). Nous rappelons que les poussées gamétocytaires prises en compte ici ne sont que des néo-poussées avec J0 et J3 négatifs et que nous ne tenons compte que des souches parasitaires sensibles pour éviter toute interférence de la chimiorésistance sur la gamétocytogénèse.

	Sujets sensibles traités à la CQ	Sujets sensibles traités à la SP
Effectif	74	84
% Pgam	13,5%	58,3%

Tableau 8 : Fréquence des poussées gamétocytaires chez les souches CQ ou SP sensibles.

Nous observons une différence significative entre les fréquences des poussées gamétocytaires post-CQ et post-SP. Donc la SP est nettement plus gamétocytogène que la CQ choisie comme gold standard.

4.3. Relation entre densité parasitaire asexuée et poussée gamétocytaire

Ici nous cherchons à analyser la relation pouvant exister entre la parasitémie asexuée à J0 et la parasitémie sexuée 7 jours après traitement à la CQ. Pour clarifier le graphique nous n'avons retenu que les sujets ayant présenté une poussée gamétocytaire patente.

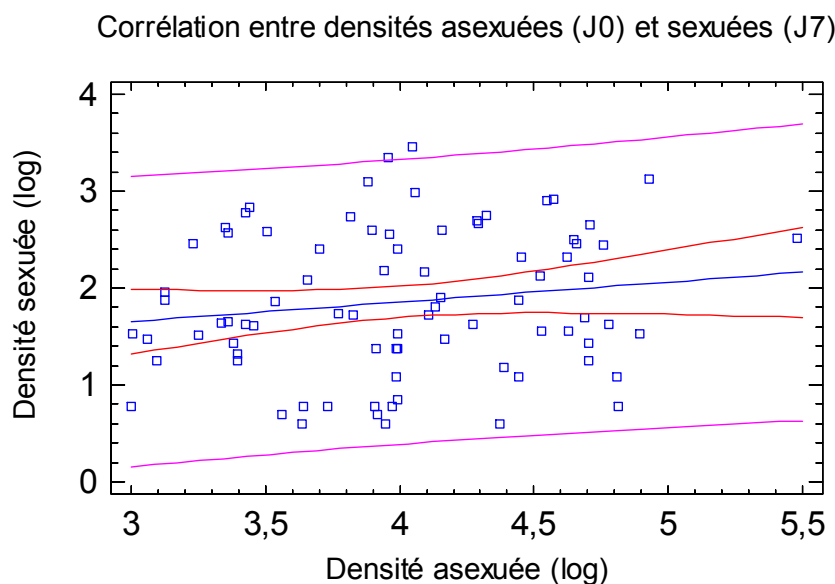


Figure XXVI : Corrélation linéaire entre densités asexuées et sexuées 7 jours après traitement de l'accès palustre

Cette figure montre globalement qu'il n'y a pas d'alignement du nuage de points le long d'un axe linéaire, donc qu'il n'y a pas de corrélation entre la densité asexuée à J0 et la densité sexuée à J7 (coefficient de corrélation $r = 0,15$; $F = 1,9$; $p = 0,17$).

4.4. Infectivité des gamétocytes post-thérapeutiques

Si certains médicaments antipalustres sont gamétocytogènes, il n'est pas certain que tous ces gamétocytes post-thérapeutiques soient infectants pour les moustiques. L'étude de l'infectivité des gamétocytes post CQ a été largement décrite dans la littérature. Nous nous intéresserons donc uniquement au Fansidar, pour qui les résultats sont encore contradictoires. Pour étudier ce problème, il faut tenir compte d'un certain nombre d'impératifs.

- L'infection du moustique dépend grossièrement de la densité gamétocytaire, même si certains facteurs inhibiteurs du cycle sporogonique sont connus. Donc il faut utiliser des densités sexuées suffisantes pour affirmer ou non que les gamétocytes sont infectants.
- Seuls nous intéressent ici les gamétocytes post-thérapeutiques. Il faut donc éliminer tous les individus ayant déjà des gamétocytes à J0 ou J3.
- Il faut prévoir 2 jours de maturation infectante lors des néo-poussées gamétocytaires qui apparaissent 7 jours après traitement. Donc nous avons infecté à J9.
- Enfin il faut un nombre suffisant de moustiques disséqués pour pouvoir affirmer que les gamétocytes ne sont pas infectants.

Tous ces impératifs expliquent pourquoi l'effectif des infections post-SP est relativement faible par rapport aux poussées gamétocytaires post-SP.

Les principales observations sont notées dans le tableau 9

N°	Age	Densité gamétocytaire J9	Moustiques disséqués	Prévalence d'infection	Charge oocystique
1	14	2250	20	0.740	42.0
2	8	390	44	0.410	3.4
3	10	70	25	0.400	2.9
4	7	2500	23	0.350	5.8
5	15	250	36	0.330	1.9
6	17	108	57	0.250	2.1
7	13	160	48	0.210	1.9
8	17	53	26	0.120	1.7
9	13	520	22	0.090	2.5
10	8	50	37	0.050	2.0
11	10	220	47	0.040	2.5
12	5	160	40	0.030	1.0
13	5	95	47	0.000	0.0
14	13	270	44	0.000	0.0
15	21	230	42	0.000	0.0
16	8	163	41	0.000	0.0
17	5	1010	40	0.000	0.0
18	12	390	40	0.000	0.0
19	14	380	40	0.000	0.0
20	7	3000	32	0.000	0.0
21	6	220	32	0.000	0.0
22	25	410	25	0.000	0.0
23	22	250	23	0.000	0.0
24	15	800	21	0.000	0.0
25	10	500	21	0.000	0.0
26	8	130	20	0.000	0.0

Tableau 9 : Infections des moustiques post-thérapeutiques au Fansidar®

Au total, 26 porteurs ont été testés. La moyenne des densités gamétocytaires a été de 561 gamétocytes/mm³, avec un écart de 50 à 3000. Ceci nous permet de penser que toutes les infections devaient être théoriquement positives. Le nombre de moustiques disséqués a été constamment supérieur ou égal à 20. Ceci nous permet de penser qu'en cas d'infection

négative, le résultat n'était pas dû à un effectif trop faible de moustiques disséqués. Douze « gros » porteurs ont infecté les moustiques (46,1%), ce qui montre qu'environ un porteur sur 2, traité au Fansidar® est capable d'infecter les moustiques.

Cette observation nous enseigne que l'utilisation du Fansidar® pour le traitement des accès palustres simples, devrait être faite avec beaucoup de précaution, (1) à cause de son pouvoir gamétocytogène, mais aussi (2) à cause du pouvoir infectant de ces amétocytes pour les moustiques.

5. *Transmission Reducing Activity (TRA)*

Nous rappelons que la TRA est due à des facteurs inhibiteurs de l'infection du moustique, d'origine humaine. Parmi ces facteurs on peut différencier les facteurs immunologiques couramment appelés TBI ou TRI (Transmission Blocking/Reducing Activity) et les facteurs non sériques comme les médicaments sporontocides.

Pour estimer la TRA dans la zone, 30 DMFA interprétables (voir M & M) ont été pratiqués sur de « gros » porteurs de gamétocytes âgés de 6 à 55 ans. Nous donnons dans ce paragraphe les principaux résultats concernant le niveau de TRA et la relation pouvant exister entre TRA et densité gamétocytaire ou âge des sujets. En effet, la TRA est théoriquement à majorité immunologique. On doit donc observer une relation entre la réponse immunologique anti-sexuée et la densité gamétocytaire, principal stimulus antigénique ; mais aussi entre la TRA et l'âge des sujets, s'il y a accumulation progressive de cette immunité en fonction de l'expérience palustre.

5.1. Pourcentage de sujet inhibiteur de l'infection chez le moustique

Sachant que les facteurs bloquants sont dans le sang et sont absorbés au cours du repas sanguin du moustique avec les gamétocytes. On peut donc estimer le pourcentage de sujet inhibiteur en comparant le degré d'infection chez le moustique avec le sérum du sujet (OWN) par rapport à un sérum témoin certainement non inhibiteur (AB).

Les résultats de nos infections artificielles en DMFA classique (OWN/AB) sont donnés dans le tableau 10

NUM	AGE	GCT	IM prev (n)	OW prev (n)	AB (n)	TBI 1%
3CM	10	365	0.000 (20)	0.100 (20)	0.650 (20)	1
59-9	6	171	0.040 (25)	0.000 (20)	0.667 (21)	1
8CP	7	220	0.050 (20)	0.050 (20)	0.500 (20)	1
127		221	0.091 (44)	0.054 (34)	0.714 (21)	1
124	14	505	0.133 (30)	0.000 (31)	0.750 (32)	1
61	8	48	0.200 (20)	0.000 (20)	0.652 (23)	1
13	14	1066	0.250 (20)	0.000 (20)	0.550 (20)	1
112	9	122	0.263 (38)	0.179 (28)	0.605 (38)	1
15	11	6600	0.286 (28)	0.243 (37)	0.886 (44)	1
5	8	216	0.300 (20)	0.000 (20)	0.700 (20)	1
85	13	292	0.447 (38)	0.400 (20)	0.955 (22)	1
38	12	1880	0.611 (36)	0.354 (48)	0.870 (23)	1
120	35	641	0.700 (20)	0.250 (20)	0.733 (30)	1
69-6	7	643	0.724 (29)	0.500 (20)	0.870 (23)	1
78	55	42	0.000 (48)	0.060 (50)	0.100 (30)	0
32	7	51	0.000 (53)	0.000 (28)	0.125 (24)	0
93-6	8	495	0.000 (28)	0.000 (29)	0.167 (30)	0
18	20	74	0.000 (36)	0.125 (32)	0.077 (39)	0
5	33	328	0.032 (31)	0.020 (49)	0.081 (37)	0
117-5	6	69	0.050 (20)	0.000 (20)	0.200 (20)	0
96	10	61	0.063 (32)	0.065 (31)	0.048 (21)	0
45	8	60	0.086 (35)	0.077 (52)	0.139 (36)	0
18		210	0.132 (38)	0.362 (47)	0.606 (33)	0
62	10	966	0.286 (28)	0.185 (27)	0.280 (25)	0
55-16	16	304	0.391 (23)	0.400 (20)	0.619 (21)	0
100	12	2625	0.417 (24)	0.250 (24)	0.429 (21)	0
77-18		808	0.535 (43)	0.500 (20)	0.200 (20)	0
24	15	124	0.583 (24)	0.333 (27)	0.545 (33)	0
82-6	14	1125	0.643 (24)	0.667 (27)	0.800 (20)	0
45		329	0.700 (20)	0.750 (20)	0.900 (20)	0
1CI	6	769	0.750 (20)	0.750 (20)	1.000 (20)	0
93		1177	0.762 (21)	0.950 (20)	1.000 (21)	0

Tableau 10 : Résultats des DMFA classiques sur de gros porteurs de gamétocytes

(n) effectif des moustiques disséqués.

En gras les sujets bloqueurs

TBI (1%) = 1 quand il y a inhibition significative ($p = 1\%$) de l'infection chez le moustique

Au total 32 DMFA réussis ont pu être analysés. La densité gamétocytaire moyenne des porteurs était de 706 gamétocytes/mm³ avec des valeurs extrêmes de 42 et 6600

gamétocytes/mm³. Au moins 20 moustiques ont été disséqués dans chaque infection. Ceci nous permet d'espérer une sensibilité suffisante pour comparer OWN et AB. Nous avons observé 14 sujets inhibiteurs sur les 32 sujets testés (43,7%). Autrement dit, à peu près, un gros porteur de gamétocyte sur deux, est potentiellement inhibiteur de l'infection chez les moustiques. Nous avons aussi observé 5 sujets bloqueurs parmi les 14 inhibiteurs, c'est-à-dire ne donnant aucune infection en OWN, avec AB significativement plus élevé.

5.2. Intensité moyenne de la TRA chez les porteurs de gamétocytes

Nous rappelons que l'intensité moyenne de la TRA naturelle est obtenue par le calcul de la moyenne des différences entre pourcentages OW et AB. Les principaux résultats sont résumés dans la figure XXVII

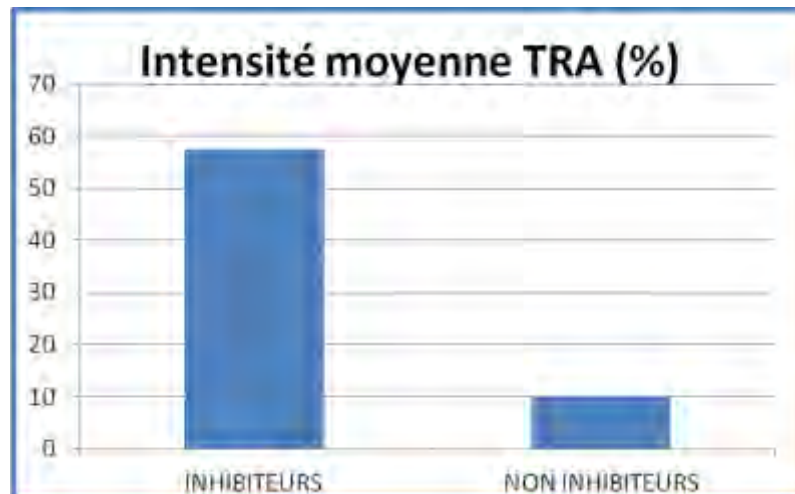


Figure XXVII : Intensité moyenne de la TRA naturelle dans un échantillon de gros porteurs de gamétocytes.

Cette figure montre que l'inhibition moyenne est environ 6 fois plus importante chez les inhibiteurs par rapport aux non inhibiteurs. Il montre aussi qu'on peut observer un certain degré d'inhibition chez certains plasmas des sujets non inhibiteurs. Cette observation montre bien qu'il faut toujours tester les sérums témoins AB que nous utiliserons dans le DMFA, pour s'assurer qu'ils n'ont pas une activité inhibitrice, même minime.

Il existe donc bien, des facteurs sériques inhibant le développement du plasmodium chez le moustique chez certains sujets vivant en zone d'endémie.

5.3. Rôle relatif de la TRA par rapport à l'inhibition globale

Il s'agit d'estimer ici le poids de l'inhibition sérique naturelle par rapport à l'inhibition totale (voir matériel et méthode).

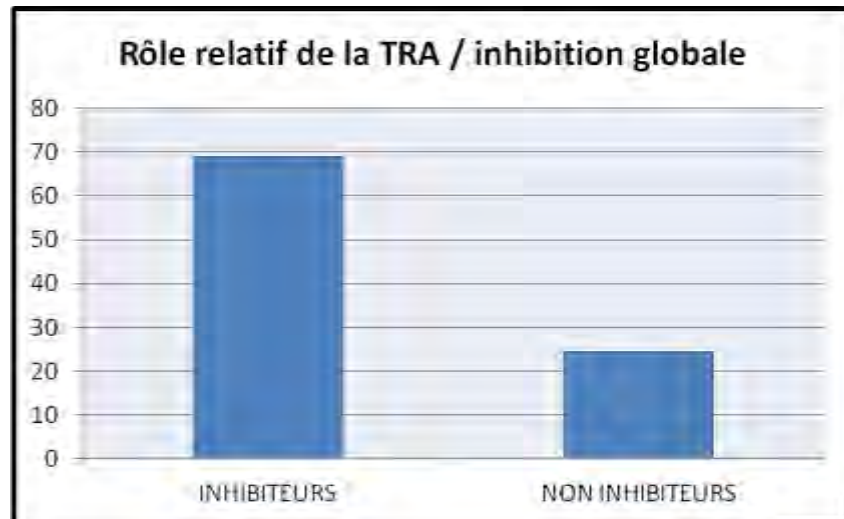


Figure XXVIII : Rôle relatif de la TRA par rapport à l'inhibition globale

La TRA sérique chez les sujets inhibiteurs représente près de 70% de l'inhibition globale due aux facteurs humains, moustiques et parasites. Ce pouvoir inhibiteur sérique peut être dû à la TRI naturelle ou à des substances inhibitrices dans le sérum. Le test du DMFA ne permet pas de faire la part des 2.

5.4. Relation entre TBI/TRA et densité gamétocytaire

Il est toutefois logique de penser que la TRA est constituée pour une grande part par des facteurs immunologiques. Elle pourrait donc être liée au stimulus antigénique, c'est-à-dire la densité gamétocytaire. C'est ce que nous avons voulu étudier ici.

Pour cette étude nous avons regardé s'il existait une relation entre l'intensité de TRA et la densité gamétocytaire. La figure XIX tente d'illustrer cette relation. Mais nous avons aussi calculé la moyenne des intensités de TRA par tranches de gamétocytémie (tableau 11)

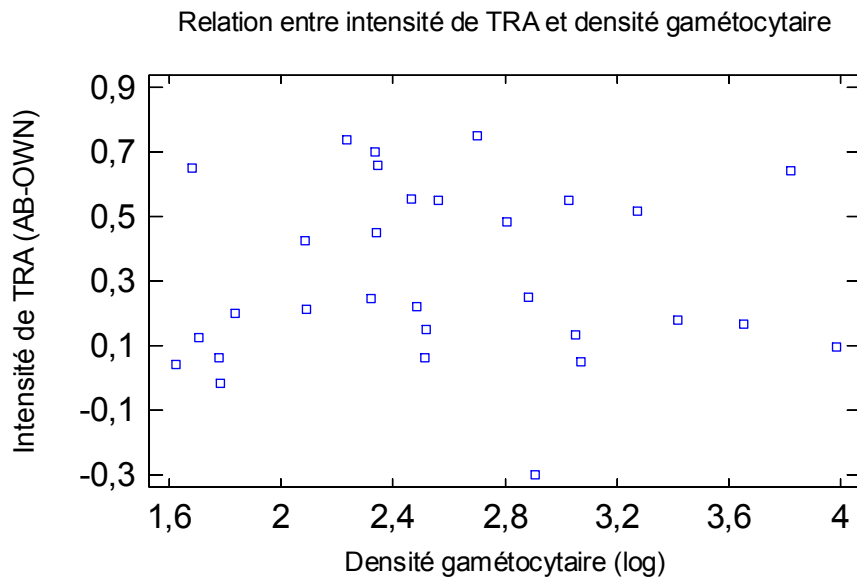


Figure XIX : Relation entre TRA naturelle et densité gamétocytaire.

Le nuage de points ne s'aligne ni sur une droite évidente, ni sur une toute autre courbe (exponentielle, parabolique). Il ne semble donc pas y avoir de relation évidente entre ces 2 paramètres.

Classes de densités gamétocytaires	Effectif	Moyenne de l'intensité de TRA
42 – 74	7	0,145
122 – 495	13	0,395
505 – 966	6	0,275
1066 – 6600	6	0,345

Tableau 11 : Relation entre TRA naturelle et densité gamétocytaire.

Il n'y a pas de croissance progressive de l'intensité de TRA en fonction de la densité gamétocytaire. Il n'y a pas non plus de maximum pour une certaine classe de densité gamétocytaire. Donc les résultats du tableau confirment le graphique précédent.

Relation entre TRA et âge des porteurs de gamétocytes

L'immunité protectrice s'accumule avec l'expérience palustre donc avec l'âge. Mais nous savons aussi que certaines immunités spécifiques, notamment anti-maladie ou anti-sporozoïtaire, ne semblent pas s'accumuler progressivement. Nous allons donc voir s'il y a une relation entre TRA et expérience palustre (âge).

La figure XXX illustre ce propos. On ne peut pas faire de tableau parce que la grande majorité des âges se situe entre 5 et 15 ans, ce qui rend impossible un découpage en classes.

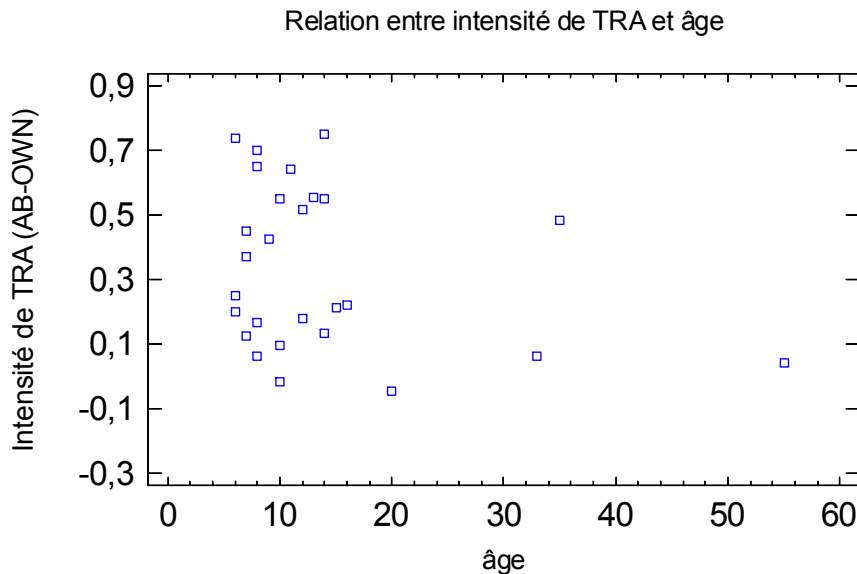


Figure XXX : Relation entre l'âge et l'intensité de TRA

On ne remarque pas de relation linéaire ou exponentielle ou parabolique entre l'âge et l'intensité de TRA.

Conclusion

L'étude de la TRA a montré qu'il existait chez les gros porteurs de gamétocytes de la zone, une certaine capacité du plasma à inhiber le développement du *Plasmodium* chez le moustique. La proportion de sujets vraiment inhibiteurs est de 43%. L'intensité moyenne de la TRA ou la différence d'infection entre les lots OWN et AB est d'environ 57% chez les sujets inhibiteurs. La part de la TRA due aux facteurs sériques humains, par rapport à l'inhibition globale (inhibition due aux facteurs humains, parasite et moustique) est de 70%. Par contre, on ne trouve pas de relation évidente entre l'intensité de TRA et l'âge ou la densité gamétocytaire.

6. La Transmission Homme moustique (THM)

L'étude de la THM s'est déroulée dans une zone rurale du Sahel, au Sénégal. La méthodologie utilisée a été volontairement identique à celle précédemment décrite dans la

littérature pour une étude similaire au Cameroun rural en zone équatoriale. Ceci nous permettra des comparaisons faciles.

L'analyse va porter sur la représentativité de notre échantillon de population, puis sur certains indicateurs de l'infectivité du réservoir humain de parasites et l'infection chez le moustique.

6.1. Caractéristique de l'échantillon de la population

Toute la fiabilité de l'estimation de la THM repose sur la représentativité de notre échantillon par rapport à la population totale. Nous avons donc comparé les proportions de chaque tranche d'âge, entre cet échantillon et le recensement national dans la zone d'étude (tableau 12).

Groupe d'âge	Proportion dans l'échantillon (n)	Proportion dans la population (recensement)	Comparaison
0-4	ND	19,3	ND
5-9	24,5 (47)	17,0	Sur-représenté
10-14	21,3 (41)	12,3	Sur-représenté
15-24	16,1 (31)	17,3	DNS
25-44	19,8 (38)	20,3	DNS
> 44	18,2 (35)	13,8	Sur-représenté
Total	(192)		

Tableau 12: Représentativité de notre échantillon de population.

Conclusion

Notre échantillon (192 sujets) ignore les très jeunes enfants de moins de 5 ans, mais favorise les enfants de 5 à 14 ans et les adultes âgés. Il faut donc le corriger en standardisant nos observations sur l'âge.

6.2. Caractéristiques de l'échantillon des porteurs de gamétocytes

Sur les 192 sujets inclus, nous n'avons pu interpréter la goutte épaisse que chez 187 individus. Les résultats d'IG et de DG moyenne sont donnés dans le tableau 13

	Groupe d'Age				
	5-9	10-14	15-24	25-44	≥ 45
N	45	44	31	38	34
Prevalence asexuée, % (n/N)*	53.3 (24/45)	63.6 (28/44)	45.2 (14/31)	34.2 (13/38)	44.1 (15/34)
Densité asexuée, MG	418.4 (90.5-2192.5)	500.3 (94.5-5052.0)	176.7 (76.0-198.0)	83.8 (65.0-119.0)	129.2 (56.0-195.0)
Gametocyte prevalence, % (**n/N)	28.9 (13/45)	11.4 (5/44)	9.7 (3/31)	5.3 (2/38)	8.8 (3/34)

Tableau 13 : Caractéristiques de la population étudiée

N: Proportion de chaque groupe d'âge dans l'échantillon de population

**n*: Nombre d'individu avec des parasitemies asexuées

***n*: Nombre de porteurs de gametocytes dans chaque groupe d'âge.

MG: Moyenne Géométrique

Dans cette étude 192 individus âgés de 5 à 65 ans ont été enregistrés et examinés. La prévalence parasitaire était de 49,0% (94/192). La prévalence gamétocytaire était de 13,5% (26/192). Quant à la densité gamétocytaire (en moyenne géométrique), elle était de 53,7 gamétocytes par millilitre de sang. Très peu de lames positives en gamétocytes ont été observées en microscopie pour permettre des analyses statistiques plus robustes pour ce qui concerne la relation densité gamétocytaire et âge. En outre nous pouvons observer que la densité gamétocytaire moyenne est nettement plus forte chez les enfants par rapport aux adultes.

6.3. Contribution au réservoir humain infectant et probabilité de repas sanguine infectant

Cent quatre vingt douze individus ont été exposés à la piqûre de moustiques sains d'élevage. Seulement 187 infections DIR ont pu être analysables. Nous résumons dans les 2 tableaux (14 et 15) en dessous, les indicateurs de l'infectivité d'un échantillon de population :

	Proportion des individus dans la population (n)	Indice Gametocytaire	Proportion des individus dans la population recensement (%) = (A)	Proportion des individus infectant au moins 1 mosquito, % (n/N) = B	Proportion des moustiques infectés, % (n/N) = (C)	Contribution relative au réservoir infectant (P)
<5 ans	ND	ND	19.3	ND	ND	ND
5-9	23.0 (43)	18.2	17.0	11.6 (5/43)	1.6 (14/860)	19.7%
10-14	23.5 (44)	15.0	12.3	13.6 (6/44)	2.3 (20/880)	19.9%
15-24	16.6 (31)	12.9	17.3	6.5 (2/31)	3.5 (22/620)	43.7%
25-44	19.8 (37)	5.1	20.3	2.7 (1/36)	0.4 (3/740)	5.9%
≥ 45	17.1 (32)	15.1	13.8	12.5 (4/32)	1.1 (7/640)	10.8%
Total	(187)	13.3	100.0	9.6% (18/187)	1.8% (66/3740)	100%

Tableau 14 : Contribution au groupe d'âge au réservoir humain infectant

ND = Non Déterminé; P = contribution au réservoir infectant estimé par la formule:

Ce tableau montre que seulement 9,6% des individus de l'échantillon testés sont infectants alors qu'il y a environ 13% des porteurs de gamétocytes. Dans cette situation, on peut conclure qu'il y'a une disproportion entre les sujets infectants et les porteurs de gamétocytes.

La contribution des différents groupes au réservoir humain infectant pour le paludisme a été estimée en incluant les récentes données démographiques de la zone étudiée. La validité des estimations de la transmission palustre de l'homme au moustique dépend de la représentativité de notre échantillon de population. Nous avons comparé les proportions de chaque groupe d'âge de notre échantillon de population et les données démographiques nationales de notre zone d'étude. Il y'avait une différence significative entre l'échantillon de population et le recensement national. La sous-représentativité des groupes d'âge 5-14 ans et ceux au dessus de 44 ans étaient dues à l'absence de certains élèves du village durant l'échantillonnage. L'absence des adultes au fait que la plupart travaille en dehors de la zone d'étude. En standardisant nos observations sur l'âge par rapport à la population totale. On observe que 51,5% de l'ensemble des moustiques infectés sont issus de repas sanguins provenant des individus âgés au moins de 5 ans, précisément ceux ayant 5-14 ans. Les jeunes adultes âgés de 15-24 ans contribuent 33,3% du total des moustiques infectés. Le reste des moustiques infectés, 15,5% (10/66) a été contribué par les individus âgés d'au moins 25 ans.

Il y a 2 manières d'estimer la proportion d'individus infectants dans une population. (1) Ce peut être la proportion d'individus infectants (B1) observée à partir d'un échantillon de population, en effectuant des gorgements directs sur la peau. (2) Ce peut être le produit de l'indice gamétocytaire par la proportion de porteurs de gamétocytes infectants (B2). Cette manière est moins exacte car tous les porteurs ne sont pas infectants (13% de porteurs et 9% de sujets infectants).

Nous avons déterminé B2 à partir des infections réalisées sur les sujets de l'étude. L'indice gamétocytaire est de 13% et la proportion de porteurs infectants est de 70,8%. Donc B2 est égal à 9,2%. Ici les deux estimations des sujets infectants à un moment donné sont très voisines.

6.4. Probabilité de repas sanguin infectant

Groupe d'âge (ans)	Proportion des moustiques infectés, % (n/N) = (C)	Pourcentage de sujets infectants (%) = B	Probabilité d'un repas sanguin infectant = K (B*C)
5-9	1.6 (14/860)	11.6 (5/43)	0.0018
10-14	2.3 (20/880)	13.6 (6/44)	0.003
15-24	3.5 (22/620)	6.5 (2/31)	0.002
25-44	0.4 (3/740)	2.7 (1/36)	0.0001
> 44	1.1 (7/640)	12.5 (4/32)	0.0013
TOTAL	1.8% (66/3740)	9.6% (18/187)	0.0017

Tableau 15 : Probabilité qu'un repas sanguin soit infectant

C : pourcentage de moustiques infectés sur sujets infectants

K : probabilité qu'un repas sanguin soit infectant

B : proportion de sujets infectants

La proportion de moustiques infectés sur sujets infectants a été faible (1.8%), en rapport semble-t-il avec la faible moyenne des densités gamétocytaires (7 gamétocytes/mm³).

La probabilité qu'un repas sanguin soit infectant (K) a été estimée à partir des sujets infectants (0,0017). Ceci signifie que 0,1% des repas sanguins dans la nature seraient infectants pour le moustique dans notre zone d'étude.

Ce sont les enfants qui infectent le plus les moustiques. Les adultes de plus de 24 ans ont une responsabilité marginale au réservoir infectant de 7,2% (voir tableau 16).

Pour tous les indicateurs, on ne trouve pas de diminution progressive avec l'âge, comme ce à quoi nous pourrions nous attendre. On retrouve notamment une forte proportion de sujets infectants chez les adultes âgés.

6.5. Relation entre densité gametocytaire et pourcentage de moustiques infecté

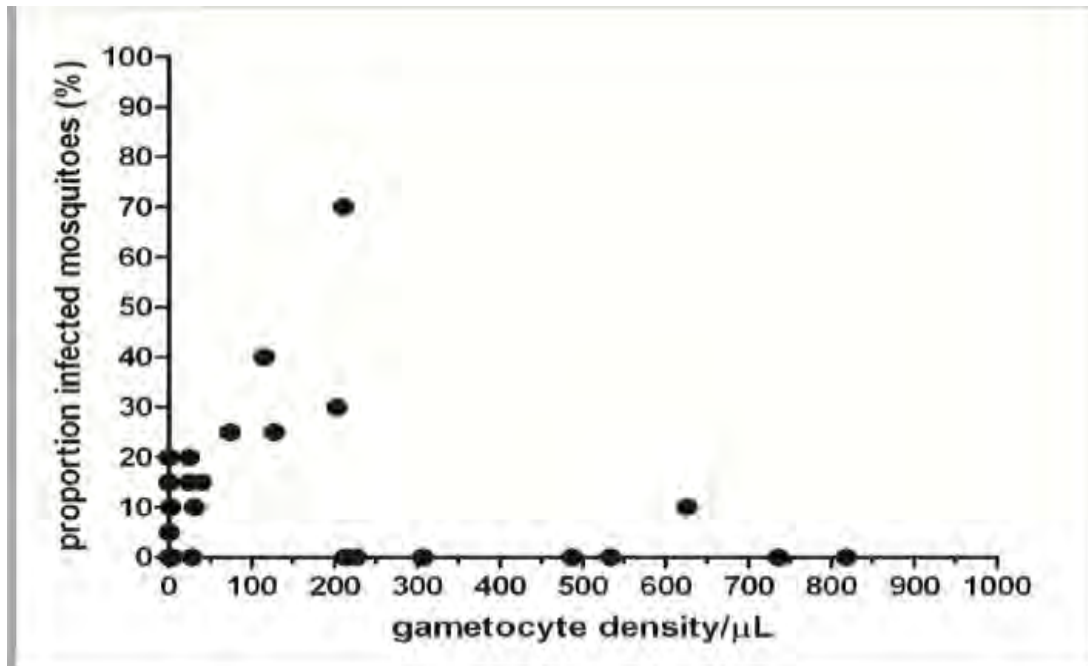


Figure XXXI : Relation entre densité gamétocytaire et pourcentage de moustique infecté

Cette figure montre une corrélation positive entre la densité gametocytaire et le pourcentage de moustiques infectes ($r = 0.47$, $P < 0.0001$). Cette relation apparaît non linéaire et elle montre des individus ayant de fortes densité gametocytaire et qui n'infectent aucun moustique.

6.6. Différence d'infectivité entre les individus selon le statut gametocytaire

Théoriquement, les porteurs de gamétocytes infectent les moustiques et tous les sujets infectants sont porteurs de gamétocytes. En pratique il n'en n'est pas toujours ainsi. Certains porteurs n'infectent pas, notamment ceux qui ont de très faibles densités ou beaucoup de TRA/TRI ou les porteurs traités avec un médicament sporontocide ; et certains sujets infectants n'ont apparemment pas de gamétocytes en goutte épaisse malgré un seuil de lecture correct de 2 gamétocytes/mm³.

Nous avons donc examiné ces deux populations. Les résultats sont résumés dans le tableau 16

Groupe d'âge (ans)	Status gametocytaire	Nombre d'expérience	Proportion d'individus infectant au moins 1 moustique (n/N)	Proportion de moustique infectés, % (n/N)
5-9	Positive	12	25.0 (3/12)	5.0 (12/240)
	Negative	31	6.5 (2/31)	0.3 (2/680)
10-14	Positive	5	80.0 (4/5)	15.0 (15/100)
	Negative	39	5.1 (2/39)	0.6 (5/780)
15-24	Positive	3	66.7 (2/3)	36.7 (22/60)
	Negative	28	0.0 (0/28)	0 (0/500)
25-44	Positive	2	50.0 (1/2)	7.5 (3/40)
	Negative	35	0.0 (0/35)	0 (0/700)
≥ 45	Positive	3	33.3 (1/3)	3.3 (2/60)
	Negative	29	10.3 (3/29)	0.9 (5/580)
Total		187	9.6 (18/187)	1.8 (66/3740)

Tableau 16: Relation entre statut gamétocytaire et infectivité des individus en fonction de groupes d'âge

Le gorgement des moustiques en fonction du statut gametocytaire a montré que les individus ayant des gametocytes visibles à la microscopie sont beaucoup plus infectants pour les moustiques ($P < 0.001$) et ces individus infectent plus de moustiques ($P < 0.001$). De tous les individus ayant des gametocytes positifs et détectés au microscope, 44.4 % (25) ont infecté au moins 1 moustique et 10.8% (500) des moustiques sont infectés. Par ailleurs, tous les individus ayant des gametocytes négatifs par la méthode microscopie, 4,3% (162) ont infecté au moins un moustique et 0.4 % (3240) des moustiques ont été infectés.

Dans notre étude 18,2% (12/66) des moustiques infectés résultent de l'infection à partir d'individus de très faibles densités gamétocytaires voire négatives au niveau microscopique.

Parmi les individus infectants dans notre échantillon, 7 n'avaient apparemment pas de gamétocytes dans leurs gouttes épaisses. Le seuil de lecture étant de 2 gamétocytes/mm³, on peut donc admettre qu'en fait ces porteurs avaient au moins 1 gamétocyte male et 1 femelle par mm³, ce qui a suffi pour déclencher une infection.

DISCUSSION

Dans l'étude de l'épidémiologie du paludisme, la fiabilité des estimations dépend du choix de la méthodologie et des indicateurs. Nous avons abordé succinctement cet aspect dans la dernière partie des généralités. Nous avons montré qu'il existait de nombreuses façons de mesurer certains aspects de l'épidémiologie du paludisme et que les indicateurs étaient souvent trop nombreux, redondants et de fiabilité inconnue. Le problème est tellement complexe qu'il est difficile, après 100 ans d'études épidémiologiques sur le paludisme de dégager des concepts clairs. C'est la multiplication des méthodes et des indicateurs utilisés qui rend impossible la comparaison des études entre elles. Il devient temps d'harmoniser et c'est un des buts de ce travail que de dégager les avantages d'une comparaison structurée pour mieux cerner les interactions entre les différentes composantes de l'épidémiologie du paludisme.

La morbidité, l'effet gamétocytoène ainsi que la transmission homme – moustique (THM) et la « Transmission Reducing Activity » (TRA) ont été analysées dans une zone sahélienne du centre, au Sénégal. Le niveau de transmission moustique – homme (TMH) a lui, été extrapolé à partir d'observations faites dans une zone voisine très ressemblante. Cet ensemble de données va être comparé à celui observé dans une zone de transmission permanente et intense, au Sud Cameroun, où la même méthodologie a été utilisée par un des membres de notre équipe, quelques années avant nous.

Le but de cette étude est de mieux comprendre les interactions entre les différentes composantes de l'épidémiologie du paludisme. Cette première comparaison va nous permettre de vérifier ou non une hypothèse de travail que nous avons émise au début de notre manuscrit. Cependant, il faudra ensuite la vérifier dans d'autres faciès épidémiologiques et tenter de modéliser les différentes interactions, à la façon dont Mac Donald a modélisé la TMH il y a plus de 50 ans. Ainsi nos connaissances sur l'épidémiologie de la transmission du paludisme et ses répercussions, ne seront plus cantonnées au seul aspect entomologique de la transmission moustique – homme.

La transmission moustique-homme a été principalement étudiée par **Robert *et al.*, (1998)** dans plusieurs villages d'une zone voisine de celle de notre étude avec des faciès écologiques très semblables à ceux observés dans notre zone. C'est pour cette raison que nous n'avons pas jugé nécessaire de répéter cette étude. D'autant plus que les estimations chiffrées varient du simple au double en fonction des années (**Fontenille *et al.*, 1997**) et donc qu'une quantification précise sur un an n'a pas beaucoup d'intérêt pour une étude qui englobe plusieurs années d'observations. Au Cameroun, la TMH de la zone qui servira à la

comparaison a été principalement étudiée par **Meunier et al., 1999** dans un village de forêt dégradée et un autre de forêt ombrophile, deux faciès écologiques typiques de cette zone.

Nous pouvons retenir de ces deux études que la transmission moustique-homme est très saisonnière en zone sahélienne (Juillet à Décembre) et permanente en zone de forêt, avec des fluctuations corrélées aux pluies. Elle est pourtant assez hétérogène dans les deux zones selon : (1) la présence de gîtes larvaires plus durables dans les bas fonds argileux en zone sahélienne ou (2) la déforestation en zone équatoriale qui renforce les niveaux de transmission à cause d'un ensoleillement important des gîtes larvaires. Les niveaux de TMH oscillent entre 9 à 26 piqûres infectées par homme et par an au Sénégal et 17 à 170 piqûres infectées/homme/an au Cameroun. Les vecteurs principaux sont essentiellement *A. arabiensis* en zone sahélienne et *A. gambiae s.s* et *A. moucheti* en zone de forêt équatoriale. L'indice sporozoïtaire est proche de 1,6 à 1,8% en zone sahélienne, alors qu'il est voisin de 2 à 3% en zone équatoriale. Le niveau de l'indice sporozoïtaire est important à connaître car il va servir de « gold standard » à un des indices de la transmission homme-moustique, la probabilité qu'un repas sanguin soit infectant pour le moustique. Encore faut-il tenir compte de la méthodologie qui a permis de mesurer cet indice sporozoïtaire. Au Cameroun, il a été obtenu par dissection des glandes salivaires. Au Sénégal il a été déterminé par ELISA CSP, qui a tendance à surévaluer cet indice (**Esposito et al., 1986 – Boudin et al., 1988 – Robert et al., 1988**).

Ces observations confirment bien qu'il y a une étroite relation entre TMH et faciès écologique, déterminant l'abondance des gîtes larvaires. Plusieurs équipes étudient actuellement le risque d'impaludation en fonction de différents faciès écologiques en Afrique, pour tenter de modéliser les interactions et pour définir après une simple analyse géographique par satellite le niveau d'endémie probable ou de mortalité palustre dans une zone (**Snow et al. 1999, Machault et al, 2012**).

Nous avons profité de nos enquêtes de dépistage des « gros » porteurs de gamétocytes pour dresser un profil parasitologique des populations locales. Dans chacune des 2 zones, de nombreux villages et écoles ont été choisis d'une année sur l'autre. Mais il faut tenir compte de deux biais de méthodologie dans cette analyse : (1) les groupes d'adultes et d'adolescents ont été moins explorés que le groupes des enfants ; (2) la lecture des gouttes épaisses sur le terrain a été faite rapidement en semi-quantitatif, ce qui signifie que les faibles charges parasitaires asexuées ou sexuées ont été sous-estimées. La correction des observations par standardisation sur l'âge a permis de contourner le problème de la sous représentation des adultes et des adolescents. Mais il reste impossible de compenser la sous-estimation probable des faibles charges parasitaires.

Les prevalences et densites parasitaires

Le niveau de transmission relativement stable au Cameroun (zone equatoriale), laisse supposer de faibles repercussions sur l'homme mais l'acquisition d'une immunité relativement precocce. Cependant, la diminution des prevalences parasitaires à *P.falciparum* en fonction de l'âge des individus, ainsi que de fortes charges à *P.falciparum* indiquent l'existence d'une immunité non sterilisante qui s'acquiert avec l'âge.

Les prévalences parasitaires du Sénégal sont généralement inférieures à celles observées au Cameroun. Ceci reflète vraisemblablement la différence de niveau de transmission moustique-homme, en piqûres infectées/homme/an, plus faible au Sénégal qu'au Cameroun. Les indices plasmodiques chez les 2-9 ans confirment bien que la situation épidémiologique est hypoendémique au Sénégal et hyperendémique au Cameroun. Une relation linéaire a été démontrée entre l'indice plasmodique et le taux d'inoculation entomologique (h) en log (**Beier et al., 1999**). Il faut théoriquement une grande variation du taux d'inoculation pour que celle-ci se répercute sur l'indice plasmodique. Cette « règle » a reçu une confirmation avec l'application de moustiquaires imprégnées d'insecticides, utilisées comme moyens de lutte en campagne de masse (**Graves et al. 1987**). Elle semble aussi se confirmer dans l'étude du Cameroun puisque **Bonnet et al., (2002)** ont montré que les indices plasmodiques étaient très peu différents alors que les niveaux de TMH variaient de 1 à 10. Voilà encore une « règle » qui semble valable sur les interactions THM et parasitémie.

Les densités moyennes sont paradoxalement équivalentes entre les 2 zones pour les formes asexuées. Mais on peut douter de la sensibilité de notre indicateur grossier. On note par ailleurs des densités gamétocytaires et des prévalences de gros porteurs, nettement plus importantes au Sénégal qu'au Cameroun. La fréquence des « gros » porteurs au Sénégal est 6 fois supérieure à celle du Cameroun. Pour expliquer cette différence, on ne peut, pour l'instant qu'avancer l'hypothèse de souches parasitaires plus gamétocytogènes au Sénégal. Cette observation a été confirmée au Burkina, un autre pays sahélien (**Boudin et al., 1993**).

Morbidité palustre

Le dépistage des accès palustres pendant un an de transmission a été fait avec la même méthodologie au Sénégal et au Cameroun. Cependant, nous n'avons sélectionné qu'un très gros village de la zone sahélienne ; tandis qu'au Cameroun nous avons fait la moyenne des observations entre un village de forêt ombrophile et de forêt dégradée. Pour définir un accès palustre nous avons adopté la méthodologie de **Armstrong-Schellenberg et al.** en (1994) qui mesure le risque de faire une fièvre pour un certain niveau de parasitémie. Au Cameroun, nous avons défini le seuil pyrogénique à partir de 1500 parasites/mm³ chez les enfants de moins de 5 ans, puis nous avons estimé arbitrairement celui des adultes à 1000 parasites/mm³. En effet, **Rogier et al.** (1996) ont montré que le seuil pyrogénique, déclenchant un accès palustre, diminuait avec l'âge. Au Sénégal ce seuil pyrogénique a été fixé empiriquement à 1500 parasites/mm³, aussi bien chez l'enfant que l'adulte peu prémuni. Dans cette zone, nous n'avons pas eu assez d'accès palustres pour permettre le calcul du risque de fièvre en fonction du niveau parasitaire dans chaque tranche d'âge.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu définir un accès palustre comme une forte parasitémie (supérieure au seuil pyrogénique théorique) associée à une fièvre constatée. Cette définition sous-estime certainement les niveaux de morbidité, car la fièvre palustre est le plus souvent transitoire et nocturne et peut donc passer inaperçue.

Dans notre zone d'étude, la morbidité attribuée au paludisme est relativement faible (1 accès palustr, tous les 5 ans). En general, en zone de faible transmission, on observe un léger pic de morbidité chez les 6-10 ans et globalement le nombre d'accès palustre ne diminue que très progressivement que chez les tranches d'âge supérieures (**Trape and Rogier 1996**). Dans ces conditions, la transmission est sans doute trop faible pour que les individus puissent acquérir rapidement une protection immunitaire.

On note une diminution progressive des densités parasitaires moyennes (moyenne géométrique après lecture quantitative), au cours des accès palustres au Cameroun, ce qui pourrait traduire l'acquisition progressive d'une immunité protectrice. Au Sénégal cette tendance n'est pas retrouvée.

L'importance des charges parasitaires asexuées au Sénégal pourrait expliquer l'importance des densités sexuées qu'on a rapportée précédemment à un pouvoir gamétocyto-gène renforcé. En effet, la gamétocyto-génèse est secondaire à une souffrance du parasite asexué. Lors des accès palustres à forte parasitémie asexuée, il y a des phénomènes inflammatoires qui apparaissent, avec une abondante sécrétion de cytokines. Cette inondation cytokinique pourrait faire souffrir le parasite et dévier son cycle vers la gamétocyto-génèse (**Chen et al., 2000**) ; ce d'autant plus que le niveau de la densité asexuée est élevé.

L'incidence est nettement supérieure dans cette zone par rapport au Cameroun. La diminution progressive de l'incidence palustre en fonction de l'âge est bien observée au Cameroun (**Bonnet *et al.*, 2002**), tandis que ce n'est qu'après la classe d'âge 0-10 ans qu'elle devient nette au Sénégal. Ceci peut traduire le retard d'acquisition de l'immunité protectrice au Sénégal, ou sa perte partielle pendant la longue saison sèche, sans stimulus antigénique.

On a pu démontrer précédemment une relation de type exponentielle entre le niveau d'incidence palustre et celui de la transmission moustique-homme (**Charlwood *et al.*, 1998 – Smith *et al.*, 1998**). La relation exponentielle existante entre le taux d'inoculation entomologique (EIR) et la prévalence parasitaire ou la morbidité explique pourquoi il faut atteindre une forte décroissance de l'EIR pour espérer une faible variation de morbidité ou de prévalence parasitaire. La modélisation de certaines interactions permet ainsi d'extrapoler certaines conséquences en cas de modification de l'un des deux paramètres de l'interaction. Quand les interactions sont multiples il faut s'attendre à des perturbations plus ou moins graves et surprenantes.

Nous avons observé que les enfants de 0-10 ans faisaient au Sénégal 0,2 accès palustres par an (1 tous les 5 ans) ; alors qu'au Cameroun, ils faisaient plus d'un accès par an (**Bonnet *et al.*, 2002**). Ceci est contraire aux observations précédentes qui montraient un niveau de morbidité supérieur au Cameroun, et pourrait refléter une mauvaise fiabilité de cet indicateur classique de la morbidité. Il est classique de voir les accès palustres se concentrer chez certaines personnes qui font 1 à 3 accès au Sénégal et 1 à 6 accès au Cameroun. On comprend donc pourquoi l'indicateur du nombre d'accès palustre rapporté à l'effectif du groupe examiné n'a probablement pas d'intérêt.

Chimiorésistance

L'étude de l'inefficacité thérapeutique en fonction des tranches d'âge montre que la fréquence des résistances diminue avec l'âge au Cameroun, tandis que ce phénomène n'est pas retrouvé au Sénégal. Ceci peut s'expliquer par l'installation progressive d'une immunoprotection qui compense l'inefficacité du traitement en tuant les parasites résistants (**Bjorkman & Philipps-Howard 1990**).

On sait que plus le niveau de chimiorésistance augmente, plus le risque de poussée gamétocytaire post-thérapeutique augmente (**Robert & Trape, 1998 – Sokhna *et al.*, 2001**). Cette observation pourrait expliquer le plus fort indice gamétocytaire enregistré au Cameroun, par rapport au Sénégal. Parallèlement, nous connaissons aussi l'effet gamétocytogène ou gamétocytocide de certains antipaludiques. Il y aurait donc des facteurs qui pourraient renforcer la densité sexuée moyenne (pouvoir gamétocytogène des souches et intensité des densités asexuées chez les accès palustres) ; et d'autres facteurs qui joueraient sur les

prévalences gamétocytaires (chimiorésistance, stratégie médicamenteuse et niveaux d'immunoprotection acquise). On comprend mieux pourquoi les indicateurs de la parasitémie sexuée soient aussi variables d'une zone d'étude à l'autre ; avec une forte prévalence au Cameroun, mais une forte densité au Sénégal.

Transmission Reducing Activity

L'étude de la TRA a été faite avec la même méthodologie (DMFA classique) dans les deux zones. Les porteurs de gamétocytes testés provenaient de toute la zone d'étude, aussi bien au Sénégal qu'au Cameroun. Nous rappelons que la TRA n'a été mesurée que dans un échantillon de « gros » porteurs de gamétocyte.

L'analyse des différents indices d'évaluation de la transmission appliquée aux différentes zones étudiées montre que les individus sont plus infectants au Cameroun qu'au Sénégal. L'explication de cette différence d'infectivité des gamétocytes entre les deux zones de niveaux d'endémie différentes reste incertaine mais l'hypothèse la plus probable est l'existence d'une immunité naturelle susceptible de bloquer la transmission du plasmodium de l'homme au moustique, stimulation antigénique plus importante au Sénégal.

La TRA est plus importante au Sénégal qu'au Cameroun (**Boudin et al, 2004**) et ceci pour les 3 indicateurs utilisés. Cette observation pourrait s'expliquer par les différences de densité gamétocytaire ou de prévalence des « gros » porteurs, plus importantes au Sénégal qu'au Cameroun. Il y aurait donc une plus grande stimulation de la TBI naturelle. Cependant nous sommes incapables de déterminer le rôle relatif de la TBI dans la TRA. Ce que nous déterminons c'est le rôle relatif de la TRA (facteurs inhibiteurs humains) par rapport à l'inhibition globale de l'infection chez le moustique (facteurs inhibiteurs moustique, homme et parasite).

Pour mettre en évidence, l'hypothèse d'immunité bloquant la transmission, des infections expérimentales (OWN / AB) ont été faites dans notre zone d'étude.

Les résultats ont montré que 44% des porteurs des gamétocytes sont capables d'agir négativement sur le développement du *plasmodium* chez le moustique.

Premawansa et al., 1994 ont aussi observé une différence de niveau de TRA entre des sérums provenant du Sri Lanka et d'autres de Papouasie Nouvelle Guinée. Le test utilisé ici était le SMFA avec une seule souche parasitaire ne correspondant pas à l'origine géographique des sérums. En outre les auteurs ne tenaient pas compte d'un seuil d'inhibition, mais considéraient comme sujet inhibiteur toute différence $OWN < AB$, quelque soit le nombre de moustiques disséqués. Enfin les auteurs étudiaient des sérums de convalescents d'accès palustre récent. Quoi qu'il en soit, ils ont aussi observé une différence de pourcentage de sujets inhibiteurs entre les 2 zones. Cependant, ils n'ont pas trouvé de différence

significative entre les niveaux de TBI, mesurée indirectement en dosant des anticorps antisexués. Donc la différence de TRA était probablement due à des facteurs non immunologiques inconnus.

Comme on peut le voir l'interprétation des résultats du DMFA est difficile à cause de l'intrication de nombreux autres facteurs sériques inhibiteurs, non pris en compte dans l'analyse, et qui peuvent agir sur l'infection du moustique. Parmi ces facteurs on peut citer notamment l'effet de certains médicaments sporontocides comme le Fansidar® qui inhibe le cycle sporogonique chez le moustique. Tout sujet ayant ingéré récemment du Fansidar va présenter dans son sérum des substances inhibitrices de l'infection du moustique. Donc OWN sera inférieur à AB pour des raisons non immunologiques. Ceci n'est pas le cas dans nos deux zones d'étude. Au Cameroun, seule la chloroquine a été utilisée pendant toute la durée de l'enquête. Au Sénégal, il y a d'abord eu la chloroquine (2001-2004) puis le Fansidar-amodiaquine (2005) puis l'amodiaquine-artémisine (2006). Donc la TRA dans les deux zones a probablement été due principalement à la TBI.

Quelque soit la substance inhibitrice, on peut se demander si le DMFA ou le SMFA sont des tests adaptés pour mesurer la TBI chez l'homme dans les conditions naturelles. L'association du DMFA et d'un dosage de certains anticorps antisexués peut permettre d'estimer le rôle relatif de la TBI dans la TRA, mais le dosage d'une seule ou de deux catégories d'anticorps sexués (Pfs 48/45 ou Pfs 230) ne reflète probablement pas la totalité de la TBI qui dépend aussi d'autres facteurs comme les cellules immuno-compétentes et le complément.

La Transmission Homme Moustique

L'étude de la transmission homme-moustique a été menée avec la même méthodologie, dans 3 villages de chaque zone, représentatifs des faciès écologiques rencontrés localement. Nous avons adopté le choix de familles volontaires, car il était difficile d'expliquer aux populations, pourquoi nous allions récompenser uniquement des personnes tirées au hasard dans les familles (traitement antipalustre, vitamines, fer, moustiquaire). Ce faisant, nous avons légèrement biaisé nos résultats, mais ils restent comparables d'une zone à l'autre. L'autre méthodologie, qui consiste à sélectionner des porteurs de gamétocytes, n'a pas été retenue. D'abord il est très difficile d'obtenir un échantillon représentatif des porteurs de gamétocytes. Ensuite, un certain nombre de sujets infectants ne sont apparemment pas porteurs de gamétocytes. Et d'autres sont non infectants tout en hébergeant des gamétocytes. Ces proportions sont variables selon les zones. C'est ainsi que nous avons pu en observer environ 5% d'infectants « sans » gamétocytes et 56% de porteurs non infectants au Sénégal, tandis que ces proportions étaient respectivement de 21% et 65% au Cameroun rural (**Bonnet et al., 2003**). Donc dans les zones où la proportion de sujets infectants sans gamétocytes est

importante, on peut s'attendre à des résultats complètement faussés si on s'adresse à un échantillon de porteurs seulement. C'est le cas de toutes les zones à forte transmission et forte immunité qui donnent beaucoup de porteurs de gamétocytes, mais avec de faibles densités incapable d'infecter les moustiques, comme au Cameroun.

Les parametres de la transmission homme moustique

Il est tres imprtant aujourd'hui d'apparier les moyens de lutte actuelles contre le paludisme avec une bonne connaissance du pouvoir infectieux d'une population pour les vecteurs. Ceci est une condition sine qua none pour une lutte visant à bloquer la transmission du plasmodium de l'homme au moustique.

Quelques études de terrain ont pourtant abordé le problème de la THM en proposant des méthodologies et des indicateurs différents (**Githeko et al, 1992 ; Bonnet et al 2003 ; Muirhead-Thomson, 1957**). En effet, le manque de standardisation de ces methodologies rend les comparaisons de ces études très délicates. Cependant, une tendance semble se degager avec des niveaux de transmission homme moustiques comparables entre les zones de savane a transmission tres saisonnieres ou des zones transmission permanentes. Il est donc urgent de standardiser ces differents outils affin de définir des moyens de lutte plus efficace.

L'indice gamétocytaire standardisé n'est pas très éloigné de celui observé sur l'échantillon des enquêtes pour dépister les « gros » porteurs de gamétocytes ; ceci aussi bien au Sénégal qu'au Cameroun. Ceci illustre le bien fondé de nos choix de lieux d'enquête. Par ailleurs, l'indice gametocytaire n'est pas un bon marqueur de l'infectivité d'une population pour les moustiques. Cet indice ne permettrait donc pas d'évaluer l'efficacite de moyens de lutte visant à bloquer ou inhiber la transmission chez le vecteur. En effet, au cours de nos études, un certains nombre de porteurs de gametocytes se sont revelés incapables d'infecter les moustiques alors que des individus identifiés comme non porteurs de gamétocytes ont conduit à une infection des vecteurs.

Les densités moyennes des porteurs sont plus faibles au Cameroun qu'au Sénégal pour les raisons indiquées dans les paragraphes précédents.

Paradoxalement, nous observons les mêmes proportions de sujets infectants à un moment donné, dans les 2 zones. Cette observation peut paraître paradoxale alors que le niveau de TBI est nettement plus élevé au Sénégal. Mais, nous avons fait notre enquête au Sénégal, au moment de la décroissance de la transmission (Novembre-Décembre), alors qu'au Cameroun, nous avons tenu compte des résultats observés en saison de faible (Mars) et de forte transmission (Juin-Juillet). Il y a donc peut être une légère sous-estimation de l'indicateur Bs au Cameroun. D'autre part, la prévalence gamétocytaire est plus faible au Sénégal qu'au

Cameroun, mais les densités moyennes sont nettement supérieures. Ainsi l'effet d'un stimulus antigénique probablement renforcé avec une TBI inhibitrice plus forte, aboutiraient au Sénégal, à une proportion de sujets infectants du même niveau qu'au Cameroun. Quoi qu'il en soit, il y aurait un effet épidémiologique évident de la TRA sur la THM et c'est la première fois qu'il est mis en évidence.

La proportion de moustiques infectés sur sujet infectant est nettement plus faible au Sénégal qu'au Cameroun. Ceci peut s'expliquer par le plus important niveau de TRA observé au Sénégal par rapport au Cameroun. Il en est de même pour le K qui prend en compte la proportion de moustiques infectés. Nous pouvons observer que la probabilité d'un repas sanguin infectant pour le moustique (K) est très voisine de l'indice sporozoïtaire au Sénégal (1,3% pour 1,6% en ELISA CSP; voir **Robert et al., 1998**) et au Cameroun (2% pour 2,1% en moyenne ; voir **Meunier et al., 1999**). Ceci montre bien la fiabilité de cet indicateur qui fait pourtant double emploi avec l'indice sporozoïtaire.

Ce sont les enfants qui forment la grande majorité du réservoir de sujets infectants pour les moustiques dans les 2 zones. C'est logique, puisque ce sont eux qui ont les plus grandes prévalences et densités gamétocytaires. Mais il faut toutefois noter que les adultes contribuent aussi pour environ à près de 60% des infections des moustiques. Donc un vaccin anti-transmission devra aussi s'adresser aux adultes si on veut vraiment interrompre la transmission.

Au total, les indicateurs utilisés ici, pour caractériser différents aspects de la transmission palustre et ses conséquences sont fiables. Certains indicateurs sont toutefois redondants ou superflus et il faudra choisir les plus représentatifs. La plus part sont toutefois nécessaires pour disséquer la complexité de la réalité épidémiologique.

Les méthodologies que nous avons utilisées ici semblent pertinentes, bien que parfois assez lourdes à mettre en place. Elles permettent de vérifier certains résultats. Il n'y a que pour l'exploration de la TRA qu'il faudra changer de méthode. Nous aurons intérêt à nous focaliser sur un échantillon de sérums tiré au hasard dans la population. Ces sérums devront être testés ensuite en DMFA hétérologue, une fois la technique standardisée. On aura ainsi un reflet plus réaliste de la situation dans la population générale. Une première étude menée dans la zone sahélienne et à Dielmo (Sud Sénégal), a montré que la proportion de sujets inhibiteurs était du même ordre de grandeur dans la population générale et dans un échantillon de « gros » porteurs de gamétocytes. Ceci nous permettra de ne travailler que sur un nombre relativement restreint de sérums pour avoir un pourcentage fiable d'inhibiteurs. Il faudra coupler à l'étude de la TRA une méthodologie qui permette d'avoir une estimation précise du niveau de TBI. Pour l'instant cette méthodologie n'est pas encore définie.

Il reste très important de choisir différents villages d'étude, représentatifs des différents faciès écologiques que l'on peut rencontrer dans la zone d'étude. Ceci améliore la qualité des résultats. Parallèlement, il est tout aussi important d'inclure toutes les tranches d'âge. S'il existe un déséquilibre entre les proportions de chaque tranche d'âge dans la population générale (recensement) ou dans les échantillons, on peut corriger les pourcentages observés par standardisation sur l'âge et les moyennes en comparant tranches d'âge par tranche d'âge. Il faudra toujours garder à l'esprit que la représentativité des échantillons est essentielle à la fiabilité des résultats et donc à la possibilité d'extrapoler les observations.

Nous pouvons constater qu'en zone équatoriale, la transmission moustique-homme est forte et permanente, ce qui explique les niveaux de la morbidité et des parasitémies dans les populations locales. Mais un haut degré d'immunoprotection se développe progressivement, ce qui limite les charges parasitaires asexuées et sexuées, surtout chez les adolescents et adultes. La TRA/TBI est relativement faible, ce qui explique que les moustiques s'infectent bien sur les sujets infectants. Du coup, certains indicateurs de la transmission homme-moustique sont relativement élevés. Au Sénégal, la transmission moustique-homme est faible et très saisonnière, ce qui explique les faibles niveaux de morbidité et de parasitémie. L'immuno-protection se développe assez peu dans la population et est probablement en partie perdue pendant la longue période de saison sèche. Ceci explique les fortes densités asexuées et sexuées rencontrées dans cette zone. La TRA/TBI est beaucoup plus élevée qu'au Cameroun, les moustiques s'infectent assez mal sur sujet infectant. Certains indicateurs de la transmission homme-moustique sont donc logiquement faibles. Notre hypothèse de travail est donc vérifiée. Mais il n'est pas certain que la situation soit toujours aussi simple à comprendre dans certaines zones où des facteurs inhibiteurs non immunologiques et inconnus vont compliquer l'analyse des comparaisons entre zone.

CONCLUSION

- 1) En dehors de la morbidité, l'étude a été réalisée uniquement pendant la saison de transmission. Il faudra en tenir compte pour les comparaisons futures avec les autres études.
- 2) La parasitémie chez les 2-9 ans confirme qu'il s'agit d'une zone hypoendémique. L'indice gaméocytaire est faible (5%), mais en lecture semi-quantitative rapide qui ignore une grande partie des faibles gaméocytemies. En outre, 0,6% de ces porteurs étaient de « gros » porteurs.
- 3) La morbidité était très saisonnière et faible, avec un accès palustre tous les 3 ans chez l'enfant et tous les 10 ans chez l'adulte. Cependant la densité moyenne des parasites asexués au cours des accès palustres était relativement forte. En fait la morbidité était concentrée chez quelques sujets seulement, qui faisaient en moyenne un accès palustre par an, sans diminution de cette fréquence en fonction de l'âge.
- 4) La TRA ou inhibition sérique était importante puisque 40% des « gros » porteurs inhibaient significativement l'infection chez le moustique. On ne connaît toutefois pas la part relative de la TBI vraie dans cette TRA. Mais l'inhibition sérique (TRA) représentait près de 70% de l'inhibition globale rassemblant les facteurs moustique, parasite et humain.
- 5) 9% des sujets tout venant pouvaient infecter les moustiques sauvages à un moment donné. Seulement 20% des moustiques gorgés sur sujet infectant étaient positifs. Les adultes âgés de 15-24 ans étaient responsables de 33,3% (22/66) des infections des moustiques dans les conditions naturelles. La probabilité qu'un repas sanguin soit infectant était de l'ordre de 1,8%, ce qui la rapprochait de l'indice sporozoïtaire couramment observé en zone sahélienne du Sénégal (1,6 à 1,8%).

PERSPECTIVES

Les perspectives ultérieures de recherche s'avèrent passionnantes. Il faudra régler la question de la part relative de la TBI vraie dans la TRA pour mieux comprendre les différences entre zones et pouvoir éliminer le rôle inhibiteur de certaines substances sériques non immunologiques. Le dosage concomitant de certains anticorps anti-transmission ne nous paraît pas refléter correctement l'intégralité de la TBI, encore faudra-t'il le vérifier. Le problème n'est probablement pas simple à résoudre et pourra faire l'objet d'un véritable programme de recherche. En outre, nous pouvons répéter ce type d'étude dans différents autres faciès épidémiologiques. L'ensemble des résultats va permettre de modéliser les interactions entre les différentes composantes de l'épidémiologie du paludisme. Cet aspect de la recherche en paludologie commence à être abordé, notamment avec les études sur la relation entre morbidité et TMH (**Snow *et al.*, 1997**) ou parasitémie et TMH (**Beier *et al.*, 1994**) ou le calcul d'un risque d'infection palustre en fonction de critères environnementaux (**Snow *et al.*, 1999**) ou la détermination du seuil pyrogénique en fonction du faciès épidémiologique (**Rogier *et al.*, 2002**). Pour notre part, nous aimerions continuer notre étude sur la relation entre TRA et THM. Un vaste champ d'investigations originales s'ouvre donc aux chercheurs et étudiants intéressés par l'épidémiologie ou les statistiques.

Références bibliographiques

- Abu-Shakra, M; Buskila, D and Shoenfeld, Y. "Molecular Mimicry between Host and Pathogen: Examples from Parasites and Implication." *Immunology Letters* (1999) **67**(2): 147-152.
- Ahlborg, N; Nardin, Eh; Perlmann, P; Berzins, K and Andersson, R. "Immunogenicity of Chimeric Multiple Antigen Peptides Based on Plasmodium Falciparum Antigens: Impact of Epitope Orientation." *Vaccine*.(1998) **16**(1): 38-44.
- Allouche, A; Milligan, P; Conway, Dj; Pinder, M; Bojang, K; Doherty, T; Tornieporth, N; Cohen, J and Greenwood, Bm. "Protective Efficacy of the Rts,S/As02 Plasmodium Falciparum Malaria Vaccine Is Not Strain Specific." *Am J Trop Med Hyg*.(2003) **68**(1): 97-101.
- Angulo, I and Fresno, M. "Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against Malaria." *Clin Diagn Lab Immunol*.(2002) **9**(6): 1145-1152.
- Appawu, Ma; Bosompem, Km; Dadzie, S; Mckakpo, Us; Anim-Baidoo, I; Dykstra, E; Szumlas, De; Rogers, Wo; Koram, K and Fryauff, Dj. "Detection of Malaria Sporozoites by Standard Elisa and Vectesttm Dipstick Assay in Field-Collected Anopheline Mosquitoes from a Malaria Endemic Site in Ghana." *Trop Med Int Health*.(2003) **8**(11): 1012-1017.
- Armstrong-Schellenberg, J. R. M., T. Smith, et al. (1994). "What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas." *Parasitology Today* **10**: 439-442
- Ballou, W. R., K. E. Kester, et al. "Pre-erythrocytic malaria vaccines to prevent Plasmodium falciparum malaria." *Chemical Immunology* (2002).**80**: 253-61.
- Baruch, Di; Gamain, B; Barnwell, Jw; Sullivan, Js; Stowers, A; Galland, Gg; Miller, Lh and Collins, We. "Immunization of Aotus Monkeys with a Functional Domain of the Plasmodium Falciparum Variant Antigen Induces Protection against a Lethal Parasite Line." *Proc Natl Acad Sci U S A*.(2002) **99**(6): 3860-3865.
- Baruch, Di; Gormely, Ja; Ma, C; Howard, Rj and Pasloske, Bl. "Plasmodium Falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Is a Parasitized Erythrocyte Receptor for Adherence to Cd36, Thrombospondin, and Intercellular Adhesion Molecule 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.(1996) **93**(8): 3497-3502.
- Baruch, Di; Rogerson, Sj and Cooke, Bm. "Asexual Blood Stages of Malaria Antigens: Cytoadherence." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 144-162.
- Beier, J.C. Oster, C. N.Koros, J. K.Onyango, F. K.Githeko, A. K.Rowton, E.Koech, D. K.Roberts, C. R (1989) "Effect of human circumsporozoite antibodies in Plasmodium-infected Anopheles (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* **26**(6): 547-53
- Beier, Jc; Killeen, Gf and Githure, Ji. "Short Report: Entomologic Inoculation Rates and Plasmodium Falciparum Malaria Prevalence in Africa." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1999) **61**(1): 109-113.

Beier, J. C., C. N. Oster, et al. (1994). "Plasmodium falciparum incidence relative to entomologic inoculation rates at the site proposed for testing malaria vaccines in Western Kenya." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**(5): 529-536

Berzins, K. "Merozoite Antigens Involved in Invasion." *Chem Immunol.*(2002) **80**: 125-143.

Bidwell, De and Voller, A. "Malaria Diagnosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays." *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*.(1981) **282**(6278): 1747-1748.

Billker, O; Lindo, V; Panico, M; Etienne, Ae; Paxton, T; Dell, A; Rogers, M; Sinden, Re and Morris, Hr. "Identification of Xanthurenic Acid as the Putative Inducer of Malaria Development in the Mosquito." *Nature*.(1998) **392**(6673): 289-292.

Bonnet, S; Gouagna, Lc; Paul, Re; Safeukui, I; Meunier, Jy and Boudin, C. "Estimation of Malaria Transmission from Humans to Mosquitoes in Two Neighbouring Villages in South Cameroon: Evaluation and Comparison of Several Indices." *Trans R Soc Trop Med Hyg.*(2003) **97**(1): 53-59.

Bonnet, S; Paul, Re; Gouagna, C; Safeukui, I; Meunier, Jy; Gounoue, R and Boudin, C. "Level and Dynamics of Malaria Transmission and Morbidity in an Equatorial Area of South Cameroon." *Trop Med Int Health.*(2002) **7**(3): 249-256.

Boudin, C; Bonnet, S; Tchuinkam, T; Gouagna, Lc; Gounoue, R and Manga, L. "[Levels of Malaria Transmission: Methods and Parameters]." *Medecine Tropicale.*(1998) **58**(1): 69-75.

Boudin, C; Diop, A; Gaye, A; Gadiaga, L; Gouagna, C; Safeukui, I and Bonnet, S. "Plasmodium Falciparum Transmission Blocking Immunity in Three Areas with Perennial or Seasonal Endemicity and Different Levels of Transmission." *Am J Trop Med Hyg.*(2005) **73**(6): 1090-1095.

Boudin, C; Lyannaz, J; Bosseno, M; Chaize, J and Carnevale, P. "Production De Sporozoïtes De Plasmodium Humains À Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)." *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale.*(1989) **69**: 3-23.

Boudin, C; Olivier, M; Molez, Jf; Chiron, Jp and Ambroise-Thomas, P. "High Human Malarial Infectivity to Laboratory-Bred Anopheles Gambiae in a Village in Burkina Faso." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*(1993) **48**(5): 700-706.

Boudin, C; Robert, V; Verhave, J and Carnevale, P. "Utilisation De La Technique Elisa Dans Le Dépistage Des Moustiques Infectés Par P.Falciparum." *Bulletin of the World Health Organization.*(1988) **66**: 87-97.

Boudin, C; Van Der Kolk, M; Tchuinkam, T; Gouagna, C; Bonnet, S; Safeukui, I; Mulder, B; Meunier, Jy and Verhave, Jp. "Plasmodium Falciparum Transmission Blocking Immunity under Conditions of Low and High Endemicity in Cameroon." *Parasite Immunol.*(2004) **26**(2): 105-110.

Bousema T, Drakeley C. Vivax gametocytes in relation to malaria Plasmodium falciparum and Plasmodium epidemiology and infectivity of control and elimination. *Clin Microbiol* 2011 Rev 24: 377

Boutlis, Cs; Gowda, Dc; Naik, Rs; Maguire, Gp; Mgone, Cs; Bockarie, Mj; Lagog, M; Ibam, E; Lorry, K and Anstey, Nm. "Antibodies to Plasmodium Falciparum

Glycosylphosphatidylinositols: Inverse Association with Tolerance of Parasitemia in Papua New Guinean Children and Adults." *Infect Immun.*(2002) **70**(9): 5052-5057

Brakenhoff, R. H., A. VERMEULEN, et al.. "Studies on the presence of antigamete antibodies in the sera of african individuals. *Joint Meeting.Soc.Belge et Hollandaise. de Protozool. Parasitol.* Bruxelles (1985), 1-3 Avril."

Bruce, M. C., P. Alano, et al.. "Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development." *Parasitology* (1990) **100 Pt 2**: 191-200

Bruce, Mc; Galinski, Mr; Barnwell, Jw; Donnelly, Ca; Walmsley, M; Alpers, Mp; Walliker, D and Day, Kp. "Genetic Diversity and Dynamics of *Plasmodium Falciparum* and *P. Vivax* Populations in Multiply Infected Children with Asymptomatic Malaria Infections in Papua New Guinea." *Parasitology.*(2000) **121**(Pt 3): 257-272.

Brunhes J, Cuisance D, Cuny G, Manguin S, de La Rocque S, Geoffrey B. Med Trop . Medical entomology: the technological explosion. French. PMID: [PubMed - (1998) indexed for MEDLINE]. 58(1):15-20.

Buckling, Ag; Ranford-Cartwright, Lc; Miles, A and Read, Af. "Chloroquine Increases *Plasmodium Falciparum* Gametocytogenesis in Vitro." *Parasitology.*(1999) **118**(Pt 4): 339-346.

Bull, Pc; Lowe, Bs; Kortok, M; Molyneux, Cs; Newbold, Ci and Marsh, K. "Parasite Antigens on the Infected Red Cell Surface Are Targets for Naturally Acquired Immunity to Malaria." *Nature Medicine.*(1998) **4**(3): 358-360.

Burkot, Tr; Williams, Jl and Schneider, I. "Identification of *Plasmodium Falciparum*-Infected Mosquitoes by a Double Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." *Am J Trop Med Hyg.*(1984) **33**(5): 783-788.

Bjorkman, A. and P. A. Phillips-Howard (1990). "The epidemiology of drug-resistant malaria." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84**: 177-180.

Butcher, Ga. "Antimalarial Drugs and the Mosquito Transmission of *Plasmodium*." *International Journal for Parasitology.*(1997) **27**(9): 975-987.

Butcher, Ga; Mendoza, J and Sinden, Re. "Inhibition of the Mosquito Transmission of *Plasmodium Berghei* by Malarone (Atovaquone-Proguanil)." *Annales of Tropical Medicine and Parasitology.*(2000) **94**(5): 429-436.

Carnevale, P and Al., E. "Les Vecteurs Des Paludismes En Afrique Subsaharienne." *Etudes Médicales.*(1984) **2**: 79-90.

Carter, R and Gwadz, R. ""Infectiousness and Gamete Immunization in ""Malaria"" Ed Kreier Jp Vol N°3 Acad.Press. New York".(1980) **3**: 263-293.

Carter, R; Kumar, N; Quakyi, Ia; Good, Mf; Mendis, Kn; Graves, Pm and Miller, Lh. "Immunity to Sexual Stages of Malaria Parasites." *Progress in Allergy.*(1988) **41**: 193-214.

Carvalho, Lj; Daniel-Ribeiro, Ct and Goto, H. "Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects." *Scand J Immunol.* (2002) **56**(4): 327-343.

Charlwood, Jd; Smith, T; Lyimo, E; Kitua, Ay; Masanja, H; Booth, M; Alonso, Pl and Tanner, M. "Incidence of Plasmodium Falciparum Infection in Infants in Relation to Exposure to Sporozoite-Infected Anophelines." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*(1998) **59**(2): 243-251.

Chen, Q; Schlichtherle, M and Wahlgren, M. "Molecular Aspects of Severe Malaria." *Clin Microbiol Rev.*(2000) **13**(3): 439-450.

Clark, Ia; Alleva, Lm; Mills, Ac and Cowden, Wb. "Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions." *Clin Microbiol Rev.*(2004) **17**(3): 509-539.

Clark, Ia and Cowden, Wb. "The Pathophysiology of Falciparum Malaria." *Pharmacol Ther.*(2003) **99**(2): 221-260.

Clide, D. F. (1981). "Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug." *Bulletin of the World Health Organization* **59**(3): 391-5.

Cochrane, Ah and Lengeler, C. "Insecticide Treated Bednets and Curtains for Malaria Control."(1998): 38pp.

Collins, We; Walduck, A; Sullivan, Js; Andrews, Kt; Stowers, A; Morris, Cl; Jennings, V; Yang, C; Kendall, J; Lin, Q; Martin, Lb; Diggs, Cl and Saul, A. "Efficacy of Vaccines Containing Rhoptry-Associated Proteins Rap1 and Rap2 of Plasmodium Falciparum in Saimiri Bolivienensis Monkeys." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*(2000) **62**(4): 466-479.

Contamin, H; Fandeur, T; Bonnefoy, S; Skouri, F; Ntoumi, F and Mercereaupuijalon, O. "Per Typing of Field Isolates of Plasmodium Falciparum." *Journal of Clinical Microbiology.*(1995) **33**(4): 944-951.

Craig, Mh; Bredenkamp, Bl; Williams, Ch; Rossouw, Ej; Kelly, Vj; Kleinschmidt, I; Martineau, A and Henry, Gf. "Field and Laboratory Comparative Evaluation of Ten Rapid Malaria Diagnostic Tests." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*(2002) **96**(3): 258-265.

Craig, Mh; Snow, Rw and Le Sueur, D. "A Climate-Based Distribution Model of Malaria Transmission in Sub-Saharan Africa." *Parasitology Today.*(1999) **15**(3): 105-111.

Dean, M; Carrington, M and O'brien, Sj. "Balanced Polymorphism Selected by Genetic Versus Infectious Human Disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet.*(2002) **3**: 263-292.

Dimopoulos, G; Kafatos, Fc; Waters, Ap and Sinden, Re. "Malaria Parasites and the Anopheles Mosquito." *Chem Immunol.*(2002) **80**: 27-49.

Do Rosario, V. E., A. Appiah, et al. (1989). "Plasmodium falciparum: administration of anti-sporozoite antibodies during sporogony results in production of sporozoites which are not

neutralized by human anti-circumsporozoite protein vaccine sera." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**(3): 305-7.

Dolo, A; Modiano, D; Doumbo, O; Bosman, A; Sidibe, T; Keita, Mm; Naitza, S; Robson, KJ and Crisanti, A. "Thrombospondin Related Adhesive Protein (Trap), a Potential Malaria Vaccine Candidate." *Parassitologia*.(1999) **41**(1-3): 425-428.

Doolan, DI and Hoffman, SI. "Nucleic Acid Vaccines against Malaria." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 308-321.

Drakeley, CJ; Akim, NI; Sauerwein, RW; Greenwood, BM and Targett, GA. "Estimates of the Infectious Reservoir of *Plasmodium falciparum* Malaria in the Gambia and in Tanzania." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(2000) **94**(5): 472-476.

Duffy, MF; Reeder, JC and Brown, GV. "Regulation of Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*: Censoring Freedom of Expression?" *Trends Parasitol*.(2003) **19**(3): 121-124.

Duffy, PE and Fried, M. "Antibodies That Inhibit *Plasmodium falciparum* Adhesion to Chondroitin Sulfate are Associated with Increased Birth Weight and the Gestational Age of Newborns." *Infect Immun*.(2003) **71**(11): 6620-6623.

Egan JE, Weber JL, Ballou WR, Hollingdale MR, Majarian WR, Gordon DM, Maloy WL, Hoffman SL, Wirtz RA, Schneider I (1987) Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science*. Apr 24;236(4800):453-6.

English, M and Newton, CR. "Malaria: Pathogenicity and Disease." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 50-69.

Esposito, F., S. Lombardi, et al. (1986). "Field observations on the use of anti-sporozoite monoclonal antibodies for determination of infection rates in malaria vectors." *Parassitologia* **28**(1): 69-77

Fleming, AF. "Severity of Malaria and Level of *Plasmodium falciparum* Transmission." *Lancet*.(1997) **350**(9074): 363-364.

Fontenille, D; Cohuet, A; Awono-Ambene, Ph; Antonio-Nkondjio, C; Wondji, C; Kengne, P; Dia, I; Boccolini, D; Duchemin, Jb; Rajaonarivelo, V; Dabire, R; Adja-Akre, M; Ceainu, C; Le Goff, G and Simard, F. "[Systematics and Biology of Anopheles Vectors of *Plasmodium* in Africa, Recent Data]." *Med Trop (Mars)*.(2003) **63**(3): 247-253.

Fontenille, D; Lochouart, L; Diagne, N; Sokhna, C; Lemasson, Jj; Diatta, M; Konate, L; Faye, F; Rogier, C and Trape, Jf. "High Annual and Seasonal Variations in Malaria Transmission by Anophelines and Vector Species Composition in Dielmo, a Holoendemic Area in Senegal." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1997) **56**(3): 247-253.

Frevert, U. "Sneaking in through the Back Entrance: The Biology of Malaria Liver Stages." *Trends Parasitol*.(2004) **20**(9): 417-424.

Fries, H; Lamers, M and Meuwissen, J. "Biosynthesis of the 25 Kd Protein in the Macrogamete/Zygote of *P.falciparum*." *Experimental Parasitology*. (1990) **71**: 229-235.

Garnham P.C.C., 1988, dans "Malaria: principles and practice of malariology" Eds *WH Wernsdorfer & I McGregor*, pp 61-96

Githeko, Ak; Brandling-Bennett, Ad; Beier, Ms; Atieli, F; Owaga, M and Collins, Fh. "The Reservoir of *Plasmodium falciparum* Malaria in a Holoendemic Area of Western Kenya." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(1992) **86**(4): 355-358.

Good, Mf. "Vaccine-Induced Immunity to Malaria Parasites and the Need for Novel Strategies." *Trends Parasitol*.(2005) **21**(1): 29-34.

Good, Mf; Stanisic, D; Xu, H; Elliott, S and Wykes, M. "The Immunological Challenge to Developing a Vaccine to the Blood Stages of Malaria Parasites." *Immunol Rev*.(2004) **201**: 254-267.

Gouagna, Lc; Mulder, B; Noubissi, E; Tchuinkam, T; Verhave, Jp and Boudin, C. "The Early Sporogonic Cycle of *Plasmodium falciparum* in Laboratory-Infected *Anopheles gambiae*: An Estimation of Parasite Efficacy." *Tropical Medicine and International Health*.(1998) **3**(1): 21-28.

Graves, Pm; Burkot, Tr; Carter, R; Cattani, Ja; Lagog, M; Parker, J; Brabin, Bj; Gibson, Fd; Bradley, Dj and Alpers, Mp. "Measurement of Malarial Infectivity of Human Populations to Mosquitoes in the Madang Area, Papua, New Guinea." *Parasitology*.(1988) **96**(Pt 2): 251-263.

Graves, Pm; Carter, R; Burkot, Tr; Quakyi, Ia and Kumar, N. "Antibodies to *Plasmodium falciparum* Gamete Surface Antigens in Papua New Guinea Sera." *Parasite Immunology*.(1988) **10**(2): 209-218.

Graves, Pm; Doubrovsky, A; Sattabongkot, J and Battistutta, D. "Human Antibody Responses to Epitopes on the *Plasmodium falciparum* Gametocyte Antigen Pfs 48/45 and Their Relationship to Infectivity of Gametocyte Carriers." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1992) **46**(6): 711-719.

Graves, P. M., B. J. Brabin, et al. (1987). "Reduction in incidence and prevalence of *Plasmodium falciparum* in under-5-year-old children by permethrin impregnation of mosquito nets." *Bulletin of the World Health Organization* **65**(6): 869-77.

Greenwood, B and Alonso, P. "Malaria Vaccine Trials." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 366-395.

Greenwood, B. and Mutabingwa, T. (2002) Malaria in 2002. *Nature*, 415, 670–672

Grotendorst, C and Carter, R. "Complement Effects on the Infectivity of *P.gallinaceum* to *Aedes Aegypti* Mosquitoes. Ii) Changes in Sensitivity to Complement Like Factors During Zygote Development." *Journal of Parasitology*.(1987) **73**: 980-984.

Hay, S. I. *et al*. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med*. **7**, e1000290 (2010)

Hay, S. I., Rogers D.J., Toomer J.F., Snow R.W. (2000). "Annual Plasmodium falciparum entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, Internet access and review." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**(2): 113-27.

Hatton, Cs; Peto, Te; Bunch, C; Pasvol, G; Russell, Sj; Singer, Cr; Edwards, G and Winstanley, P. "Frequency of Severe Neutropenia Associated with Amodiaquine Prophylaxis against Malaria." *Lancet*.(1986) **1**(8478): 411-414.

Healer, J; Graszynski, A and Riley, E. "Phagocytosis Does Not Play a Major Role in Naturally Acquired Transmission-Blocking Immunity to Plasmodium Falciparum Malaria." *Infection and Immunity*.(1999) **67**(5): 2334-2339.

Hoessli, Dc; Poincelet, M; Gupta, R; Ilangumaran, S and Nasir Ud, D. "Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein 1." *Eur J Biochem*.(2003) **270**(2): 366-375.

Hoffman, Sl and Doolan, Dl. "Malaria Vaccines-Targeting Infected Hepatocytes." *Nature Medicine*.(2000) **6**(11): 1218-1219.

Hoffman, S. L., R. Wistar, *et al.* (1986). "Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum." *New England Journal of Medicine* **315**(10): 601-6

Hogh, B; Gamage-Mendis, A; Butcher, Ga; Thompson, R; Begtrup, K; Mendis, C; Enosse, Sm; Dgedge, M; Barreto, J; Eling, W and Sinden, Re. "The Differing Impact of Chloroquine and Pyrimethamine/Sulfadoxine Upon the Infectivity of Malaria Species to the Mosquito Vector." *Am J Trop Med Hyg*.(1998) **58**(2): 176-182.

Holder, Aa; Blackman, Mj; Borre, Mb; Burghaus, Pa; Chappel, Ja; Keen, Jk; Ling, It; Ogun, Sa; Owen, Ca and Sinha, Ka. "Malaria Parasites and Erythrocyte Invasion." *Biochemical Society Transactions*.(1994) **22**(2): 291-295.

Holder, Aa; Guevara Patino, Ja; Uthaipibull, C; Syed, Se; Ling, It; Scott-Finnigan, T and Blackman, Mj. "Merozoite Surface Protein 1, Immune Evasion, and Vaccines against Asexual Blood Stage Malaria." *Parassitologia*.(1999) **41**(1-3): 409-414.

Hollingdale, Mr and Krzych, U. "Immune Responses to Liver-Stage Parasites: Implications for Vaccine Development." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 97-124.

Hollingdale, Mr; McCormick, Cj; Heal, Kg; Taylor-Robinson, Aw; Reeve, P; Boykins, Ra and Kazura, Jw. "Biology of Malarial Liver Stages: Implications for Vaccine Design." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*.(1998) **92**(4): 411-417.

Hollingdale, M. R. and V. E. Do Rosario (1989). "Malaria transmission-enhancing activity in mosquitoes by mammalian host anti-sporozoite antibodies." *Experimental Parasitology* **68**(3): 365-8

Hollingdale, M. R., E. H. Nardin, S Tharavanij, A L Schwartz, R S Nussenzweig. (1984). "Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies." *Journal of Immunology* **132**(2): 909-13.

Huber, M., E. Cabib, Miller L.H. (1991). "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(7): 2807-10.

Hunt, Nh and Grau, Ge. "Cytokines: Accelerators and Brakes in the Pathogenesis of Cerebral Malaria." *Trends Immunol.*(2003) **24**(9): 491-499.

Janse, C and Mons, B. "DNA Synthesis and Genome Structure of Plasmodium: A Review." *Acta Leidensia.*(1987) **56**: 41275.

Kaiser, K., N. Camargo, et al. (2004). "Transformation of sporozoites into early exoerythrocytic malaria parasites does not require host cells." *J Exp Med* **197**(8): 1045-50.

Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 1356-1362

Kaslow, Dc. "Transmission-Blocking Vaccines." *Chem Immunol.*(2002) **80**: 287-307.

Kaslow, Dc; Bathurst, Ic; Isaacs, Sn; Keister, Db; Moss, B and Barr, Pj. "Induction of Plasmodium Falciparum Transmission-Blocking Antibodies by Recombinant Pfs25." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*(1992) **87 Suppl 3**: 175-177.

Koella, J. "An Evolutionary View of the Interactions between Anopheline Mosquitoes and Malaria Parasites." *Microbes and Infection.*(1999) **1**: 303-308.

Koella, J; Sorensen, F and Anderson, R. "The Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Increases the Frequency of Multiple Feeding of Its Mosquito Vector Anopheles Gambiae." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.*(1998) **265**: 763-768.

Kristensson, K; Mhlanga, Jd and Bentivoglio, M. "Parasites and the Brain: Neuroinvasion, Immunopathogenesis and Neuronal Dysfunctions." *Curr Top Microbiol Immunol.*(2002) **265**: 227-257.

Krotoski, Wa. "The Hypnozoite and Malarial Relapse." *Progress in Clinical Parasitology.*(1989) **1**: 1-19.

Kumar, N; Ploton, I; Koski, G; Ann-Lobo, C and Contreras, Ce. "Malaria Transmission-Blocking Immunity. Identification of Epitopes and Evaluation of Immunogenicity." *Advances in Experimental Medicine and Biology.*(1995) **383**: 65-72.

Kumar, S; Epstein, Je and Richie, Tl. "Vaccines against Asexual Stage Malaria Parasites." *Chem Immunol.*(2002) **80**: 262-286.

Kumar, S; Epstein, Je; Richie, Tl; Nkrumah, Fk; Soisson, L; Carucci, Dj and Hoffman, Sl. "A Multilateral Effort to Develop DNA Vaccines against Falciparum Malaria." *Trends in Parasitology.*(2002) **18**(3): 129-135.

Kurtis, Jd; Hollingdale, Mr; Luty, Aj; Lanar, De; Krzych, U and Duffy, Pe. "Pre-Erythrocytic Immunity to Plasmodium Falciparum: The Case for an Lsa-1 Vaccine." *Trends in Parasitology.*(2001) **17**(5): 219-223.

Kwiatkowski, D. "Malarial Toxins and the Regulation of Parasite Density [Review]." *Parasitology Today*.(1995) **11**(6): 206-212.

Kyes, S; Horrocks, P and Newbold, C. "Antigenic Variation at the Infected Red Cell Surface in Malaria." *Annual Review of Microbiology*.(2001) **55**: 673-707.

Langer, Rc and Vinetz, Jm. "Plasmodium Ookinete-Secreted Chitinase and Parasite Penetration of the Mosquito Peritrophic Matrix." *Trends in Parasitology*.(2001) **17**(6): 269-272.

Lengeler, C. "Insecticide-Treated Bednets and Curtains for Preventing Malaria." *Cochrane Database Syst Rev*.(2000) (2): CD000363.

Lensen, Thw; Bolmer-Van De Vegte, M; Van Gemert, Gj; Eling, Wm and Sauerwein, Rw. "Leukocytes in a Plasmodium Falciparum-Infected Blood Meal Reduce Transmission of Malaria to Anopheles Mosquitoes." *Infection and Immunity*.(1997) **65**(9): 3834-3837.

Lensen, Thw; Van Druten, J; Bolmer, Mg; Van Gemert, G; Eling, Wm and Sauerwein, R. "Measurement by Membrane Feeding of Reduction in Plasmodium Falciparum Transmission Induced by Endemic Sera." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(1996) **90**(1): 20-22.

Lensen, Thw; Van-Gemert, G and Kaslow, D. "Transmission-Blocking Antibody of the P.Falciparum Zygote Ookinete Surface Protein Pf25 Also Influence Sporozoite Development." *Parasite Immunology*.(1992) **14**: 471-479.

Lines, J. "Severe Malaria in Children and Transmission Intensity." *Lancet*.(1997) **350**(9080): 813.

Lines, Jd; Wilkes, Tj and Lyimo, Eo. "Human Malaria Infectiousness Measured by Age-Specific Sporozoite Rates in Anopheles Gambiae in Tanzania." *Parasitology*.(1991) **102 Pt 2**: 167-177.

Lombardi, S and Esposito, F. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for the Identification of Mosquito Bloodmeals." *Parassitologia*.(1983) **25**(1): 49-56.

Lombardi, S; Esposito, F; Zavala, F; Lamizana, L; Rossi, P; Sabatinelli, G; Nussenzweig, Rs and Coluzzi, M. "Detection and Anatomical Localization of Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Protein and Sporozoites in the Afrotropical Malaria Vector Anopheles Gambiae S.L." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1987) **37**(3): 491-494.

MacDonald, G. (1957). ""The epidemiology and control of malaria. In ""The epidemiology and control of malaria"" Oxford.univ."" .Malaney, P; Spielman, A and Sachs, J. "The Malaria Gap." *Am J Trop Med Hyg*.(2004) **71**(2 Suppl): 141-146.

Mazier, D; Pied, S; Marussig, M and Renia, L. "Malaria Peptides Expressed on the Surface of Infected Hepatocytes. Isolation, Synthesis and Functional Analysis." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*.(1997) **91 sup**: 21-24.

Medley, Gf; Sinden, Re; Fleck, S; Billingsley, Pf; Tirawanchai, N and Rodriguez, Mh. "Heterogeneity in Patterns of Malarial Oocyst Infections in the Mosquito Vector." *Parasitology*.(1993) **106**(Pt 5): 441-449.

Menard, R; Sultan, Aa; Cortes, C; Altszuler, R; Van Dijk, Mr; Janse, Cj; Waters, Ap; Nussenzweig, Rs and Nussenzweig, V. "Circumsporozoite Protein Is Required for Development of Malaria Sporozoites in Mosquitoes." *Nature*.(1997) **385**(6614): 336-340.

Mendis, Kn; David, Ph and Carter, R. "Human Immune Responses against Sexual Stages of Malaria Parasites: Considerations for Malaria Vaccines." *International Journal for Parasitology*.(1990) **20**(4): 497-502.

Mendis, Kn; Munesinghe, Yd; De Silva, Yn; Keragalla, I and Carter, R. "Malaria Transmission-Blocking Immunity Induced by Natural Infections of Plasmodium Vivax in Humans." *Infection and Immunity*.(1987) **55**(2): 369-372.

Meunier, J. Y., I. Safeukui, et al. (1999). "[Malaria transmission in an area of future vaccination in equatorial forest of south Cameroon]." *Bull Soc Pathol Exot* **92**(5): 309-12.

Meuwissen, J and Ponnudurai, T. "Biology and Biochemistry of Sexual and Sporogonic Stage of P.Falciparum: A Review." *Biology of the Cell*.(1988) **64**: 245-249.

Miller, Lh; Baruch, Di; Marsh, K and Doumbo, Ok. "The Pathogenic Basis of Malaria." *Nature*.(2002) **415**(6872): 673-679.

Molineaux, L. "Malaria and Mortality: Some Epidemiological Considerations." *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*.(1997) **91**(7): 811-825.

Moorthy, V and Hill, Av. "Malaria Vaccines." *British Medical Bulletin*.(2002) **62**: 59-72.

Moorthy, Vs; Good, Mf and Hill, Av. "Malaria Vaccine Developments." *Lancet*.(2004) **363**(9403): 150-156.

Mouchet, J., P. Carnevale, et al. (2006). "Typologie du paludisme en Afrique." *Parasite*.

Muirhead-Thomson, R. "The Malaria Infectivity of an African Village Population to Mosquitoes (A. Gambiae): A Randon Xenodiagnostic Survey." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1957) **6**: 971-979.

Mulder, B; Lensen, T; Tchuinkam, T; Roeffen, W; Verhave, Jp; Boudin, C and Sauerwein, R. "Plasmodium Falciparum: Membrane Feeding Assays and Competition Elisas for the Measurement of Transmission Reduction in Sera from Cameroon." *Experimental Parasitology*.(1999) **92**(1): 81-86.

Mulder, B; Tchuinkam, T; Dechering, Kj; Verhave, Jp; Carnevale, P; Meuwissen, Jh and Robert, V. "Malaria Transmission-Blocking Activity in Experimental Infections of Anopheles Gambiae from Naturally Infected Plasmodium Falciparum Gametocyte Carriers." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(1994) **88**(1): 121-125.

Myang, J. M., P. Marshall, et al. (2004). "The Plasmodium circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites." *Mol Biochem Parasitol* **133**(1): 53-9.

Nagel, RL. "Malarial Anemia." *Hemoglobin*.(2002) **26**(4): 329-343.

Naotunne, T. S., N. D. Karunaweera, et al. (1993). "Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates." *Immunology* **78**(4): 555-62

Nardin, E; Zavala, F; Nussenzweig, V and Nussenzweig, Rs. "Pre-Erythrocytic Malaria Vaccine: Mechanisms of Protective Immunity and Human Vaccine Trials." *Parassitologia*.(1999) **41**(1-3): 397-402.

Nardin, Eh; Oliveira, Ga; Calvo-Calle, Jm and Nussenzweig, Rs. "The Use of Multiple Antigen Peptides in the Analysis and Induction of Protective Immune Responses against Infectious Diseases." *Advances in Immunology*.(1995) **60**: 105-149.

Nardin, E., R. Nussenzweig, et al. (1979). "Antibodies to sporozoites. Their frequency occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria." *Science* **206**: 597-599

Newbold, C. I. (1999). "Antigenic variation in Plasmodium falciparum: mechanisms and consequences [Review]." *Current Opinion in Microbiology* **2**(4): 420-425.

Newbold, Ci. "Antigenic Variation in Plasmodium Falciparum: Mechanisms and Consequences [Review]." *Current Opinion in Microbiology*.(1999) **2**(4): 420-425.

Newton CRJC, Tran TH, White N - Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; **vf69** : 433-441.

Niederwieser, I; Felger, I and Beck, Hp. "Limited Polymorphism in Plasmodium Falciparum Sexual-Stage Antigens." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(2001) **64**(1-2): 9-11.

Nowak, R. "Malaria. How the Parasite Disguises Itself." *Science*.(1995) **269**(5225): 755.

Nudelman, S., L. Renia, et al. (1989). "Dual action of anti-sporozoite antibodies in vitro." *Journal of Immunology* **143**: 996-000

Nussenzweig, Rs and Nussenzweig, V. "Antisporozoite Vaccine for Malaria: Experimental Basis and Current Status." *Reviews of Infectious Diseases*.(1989) **11 Suppl 3**: S579-585.

Nussenzweig, Rs and Zavala, F. "A Malaria Vaccine Based on a Sporozoite Antigen." *New England Journal of Medicine*.(1997) **336**(2): 128-130.

Nussenzweig, V and Nussenzweig, Rs. "Sporozoite Malaria Vaccine. Where Do We Stand ?" *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*.(1990) **65 S**: 49-52.

Patarroyo, G; Franco, L; Amador, R; Murillo, La; Rocha, Cl; Rojas, M and Patarroyo, Me. "Study of the Safety and Immunogenicity of the Synthetic Malaria Spf66 Vaccine in Children Aged 1-14 Years." *Vaccine*.(1992) **10**(3): 175-178.

Paul, Re; Brey, Pt and Robert, V. "Plasmodium Sex Determination and Transmission to Mosquitoes." *Trends Parasitol.*(2002) **18**(1): 32-38.

Peiris J S, Premawansa, S.Ranawaka, M. B.Udagama, P. V.Munasinghe, Y. .Nanayakkara, M. V.Gamage, C. P.Carter, R.David, P. H.Mendis, K. N., Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 39 (1): 26-32 (1988).

Pichon, G; Robert, V and Mulder, B. "Analyse Quantitative De La Distribution Des Oocystes De Plasmodium Falciparum Chez Anopheles Gambiae." *Parasite.*(1996) **3**: 161-167.

Ponnudurai, Tv; Lensen, Ahw; Bensink, Mpe and Meuwissen, Jht. "Infectivity of Cultured P.Falciparum Gametocytes to Mosquitoes." *Parasitology.*(1989) **98**: 165-173.

Ponnudurai, Tv; Lensen, Ahw and Meuwissen, Jht. "Synchronization of P.Falciparum Gametocytes Using an Automated Suspension Culture System." *Parasitology.*(1986) **93**: 263-274.

Ponnudurai, Tv; Lensen, Hw and Meuwissen, Jht. "An Automated Large Scale Culture System of P.Falciparum Using Tangential Flow Filtration for Medium Change." *Parasitology.*(1983) **87**: 439-445.

Pouvelle, B; Buffet, Pa; Lepolard, C; Scherf, A and Gysin, J. "Cytoadhesion of Plasmodium Falciparum Ring-Stage-Infected Erythrocytes." *Nature Medicine.*(2000) **6**(11): 1264-1268.

Premawansa, S; Gamage-Mendis, A; Perera, L; Begarnie, S; Mendis, K and Carter, R. "Plasmodium Falciparum Malaria Transmission-Blocking Immunity under Conditions of Low Endemicity as in Sri Lanka." *Parasite Immunology.*(1994) **16**(1): 35-42.

Robert, V., J. P. Verhave, J P, ponnudurai T, Louwe, Scholtens P, Carnevale P. (1988). "Study of the distribution of circumsporozoite antigen in Anopheles gambiae infected with Plasmodium falciparum, using the enzyme-linked immunosorbent assay." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**(3): 389-91.

Robert, V., G. Le Goff, Essong J, Tchuinkam T, Fass B, Verhave J P (1995). "Detection of falciparum malarial forms in naturally infected anophelines in Cameroon using a fluorescent anti-25-kD monoclonal antibody." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**(4): 366-9.

Robert, V; Read, A; Tchuinkam, T; Verhave, J and Carnevale, P. "Effect of Gametocyte Sex Ratio on Infectivity of P. Falciparum to A. Gambiae." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*(1996) **90**: 621-624.

Robert, V. and J. F. Trape (1998). "[Dynamics of Plasmodium falciparum gametocytemia as a function of therapeutic response to chloroquine in a mesoendemic malaria zone]." *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* **91**(2): 142-5.

Robson, Kj; Dolo, A; Hackford, Ir; Doumbo, O; Richards, Mb; Keita, Mm; Sidibe, T; Bosman, A; Modiano, D and Crisanti, A. "Natural Polymorphism in the Thrombospondin-

- Related Adhesive Protein of Plasmodium Falciparum." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1998) **58**(1): 81-89.
- Roditi, I and Liniger, M. "Dressed for Success : The Surface Coats of Insect-Borne Protozoan Parasites." *Trends in Microbiology*.(2002) **10**(3): 128-134
- Roeffen, W. Geeraedts, F.Eling, W.Beckers, P.Wizel, B.Kumar, N.Lensen, T.Sauerwein, R.. "Transmission blockade of Plasmodium falciparum malaria by anti-Pfs230-specific antibodies is isotype dependent." *Infection and Immunity* **63**(2): 467-71.
- Roeffen, W., B. Mulder, et al. (1996). "Association between anti-Pfs48/45 reactivity and P. falciparum transmission-blocking activity in sera from Cameroon." *Parasite Immunology* **18**(2): 103-9
- Rogier, C., M. Henry, et al. (2002). "Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie : bases théoriques et implications pratiques." *Doc polycopié*: 50 pp.
- Rogier, C., D. Commenges, et al. (1996). "Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of Plasmodium falciparum parasitemia in highly endemic populations." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **54**(6): 613-9.
- Rutledge, L and Ward, R. "Studies on the Feeding Response of Mosquitoes to Nutritive Solutions in a New Membrane Feeder." *Mosquito News*.(1964) **24**: 407-419.
- Sam-Yellowe, T. "Rhoptry Organelles of the Apicomplexa : Their Role in Host Cell Invasion and Intracellular Survival." *Parasitology Today*.(1996) **12**(8): 308-315.
- Sauerwein, Rw and Eling, Wm. "Sexual and Sporogonic Stage Antigens." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 188-203.
- Saul, A. "Malaria Mortality and Transmission Rates in Africa." *Parasitology Today*.(1997) **13** (8): 318-319.
- Schofield, L. "The Circumsporozoite Protein of Plasmodium: A Mechanism of Immune Evasion by the Malaria Parasite?" *Bulletin of the World Health Organization*.(1990) **68 Suppl**: 66-73.
- Schofield, L. (1997). "Malaria toxins revisited." *Parasitology Today* **13**: 275-276.
- Sergent, E.. ""Latent infection and premunition. Some definitions of microbiology and immunology. In ""Immunity to protozoa"" Garnham PCC et al. Blackwell Sci.Publ. Oxford"(1963)
- Shahabuddin, M and Costero, A. "Spatial Distribution of Factors That Determine Sporogonic Development of Malaria Parasites in Mosquitoes." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.(2001) **31**(3): 231-240.
- Shahabuddin, M and Kaslow, Dc. "Plasmodium: Parasite Chitinase and Its Role in Malaria Transmission." *Experimental Parasitology*.(1994) **79**(1): 85-88.
- Shahabuddin, M; Toyoshima, T; Aikawa, M and Kaslow, Dc. "Transmission-Blocking Activity of a Chitinase Inhibitor and Activation of Malarial Parasite Chitinase by Mosquito

- Protease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.(1993) **90**(9): 4266-4270.
- Shahabuddin, M., S. Cociancich, et al. (1998). "The search for novel malaria transmission-blocking targets in the mosquito midgut." *Parasitology Today* **14**(12): 493-497
- Silvestrini, F; Alano, P and Williams, JI. "Commitment to the Production of Male and Female Gametocytes in the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Parasitology*.(2000) **121 Pt 5**: 465-471.
- Sinden, R and Smalley, M. "Gametocytes of *P.Falciparum*. Phagocytosis by Leucocytes in Vivo and Vitro." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(1976) **70/4**: 344-345.
- Sinden, Re. "Sexual Development of Malarial Parasites." *Advances in Parasitology*.(1983) **22**: 153-216.
- Sinden, Re. "Plasmodium Differentiation in the Mosquito." *Parassitologia*.(1999) **41**(1-3): 139-148.
- Smalley, Me and Sinden, Re. "Plasmodium Falciparum Gametocytes: Their Longevity and Infectivity." *Parasitology*.(1977) **74**(1): 1-8.
- Smith, T; Charlwood, Jd; Kitua, Ay; Masanja, H; Mwankusye, S; Alonso, Pl and Tanner, M. "Relationships of Malaria Morbidity with Exposure to *Plasmodium Falciparum* in Young Children in a Highly Endemic Area." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.(1998) **59**(2): 252-257.
- Snounou, G and Beck, Hp. "The Use of Pcr Genotyping in the Assessment of Recrudescence or Reinfection after Antimalarial Drug Treatment." *Parasitology Today*.(1998) **14**(11): 462-467.
- Snounou, G; Gruner, Ac; Muller-Graf, Cd; Mazier, D and Renia, L. "The Plasmodium Sporozoite Survives Rts,S Vaccination." *Trends Parasitol*.(2005) **21**(10): 456-461.
- Snow, R. W., J. A. Omumbo, et al. "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa." *Lancet* **349**(9066): (1997).1650-4
- Snow, Rw; Craig, Mh; Deichmann, U and Le Sueur, D. "A Preliminary Continental Risk Map for Malaria Mortality among African Children." *Parasitology Today*.(1999) **15**(3): 99-104.
- Snow, Rw; Guerra, Ca; Noor, Am; Myint, Hy and Hay, Si. "The Global Distribution of Clinical Episodes of *Plasmodium Falciparum* Malaria." *Nature*.(2005) **434**(7030): 214-217.
- Snow, Rw; Korenromp, El and Gouws, E. "Pediatric Mortality in Africa: *Plasmodium Falciparum* Malaria as a Cause or Risk?" *Am J Trop Med Hyg*.(2004) **71**(2 Suppl): 16-24.
- Snow, Rw and Marsh, K. "The Epidemiology of Clinical Malaria among African Children [Review]." *Bulletin de l Institut Pasteur*.(1998) **96**(1): 15-23.

Sokhna, Cs; Trape, Jf and Robert, V. "Gametocytaemia in Senegalese Children with Uncomplicated Falciparum Malaria Treated with Chloroquine, Amodiaquine or Sulfadoxine + Pyrimethamine." *Parasite*.(2001) **8**(3): 243-250.

Sultan, Aa; Thathy, V; Frevert, U; Robson, Kj; Crisanti, A; Nussenzweig, V; Nussenzweig, Rs and Menard, R. "Trap Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of Plasmodium Sporozoites." *Cell*.(1997) **90**(3): 511-522.

Tanabe, K; Sakihama, N; Nakamura, Y; Kaneko, O; Kimura, M; Ferreira, Mu and Hirayama, K. "Selection and Genetic Drift of Polymorphisms within the Merozoite Surface Protein-1 Gene of Plasmodium Falciparum." *Gene*.(2000) **241**(2): 325-331.

Targett, G. "Immunity to Sexual Stages of Human Malaria Parasites: Immune Modulation During Natural Infections, Antigenic Determinants, and the Induction of Transmission-Blocking Immunity." *Scand J Infect Dis Suppl*.(1990) **76**: 79-88.

Targett, G; Drakeley, Cj; Jawara, M; Von Seidlein, L; Coleman, R; Deen, J; Pinder, M; Doherty, Tm; Sutherland, C; Walraven, G and Milligan, P. "Artesunate Reduces but Does Not Prevent Post-Treatment Transmission of Plasmodium Falciparum to Anopheles Gambiae." *Journal of Infectious Diseases*.(2001) **183**: 1254-1259.

Targett, Ga. "Plasmodium Falciparum: Natural and Experimental Transmission-Blocking Immunity." *Immunology Letters*.(1988) **19**(3): 235-240.

Taverne, J; Sheikh, N; Elased, K; Playfair, J; Scott, M and Saggerson, D. "Malaria Toxins : Tnf-Mediated Phenomena." *Parasitology Today*.(1996) **12**(7): 290.

Taylor-Robinson, A. "Anti-mosquito midgut antibodies block malaria transmission." *Trends in Microbiology* (2001). **9**(6): 254.

Trape, Jf; Pison, G; Preziosi, Mp; Enel, C; Du Lou, Ad; Delaunay, V; Samb, B; Lagarde, E; Molez, Jf and Simondon, F. "Impact of Chloroquine Resistance on Malaria Mortality." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Série III)*.(1998) **321**(8): 689-697.

Tusting LS, Bousema T, Smith DL, Drakeley C,. Measuring changes in Plasmodium falciparum transmission: precision, accuracy and costs of metrics. *Parasitol*.2014 **84**: 151–208.

Teun Bousema, Colin J. Sutherland, Thomas S. Churcher, Bert Mulder, Louis C. Gouagna Eleanor M. Riley, Geoffrey A.T. Targett, Chris J. Drakeley. "Human immune responses that reduce the transmission of Plasmodium falciparum in African populations". *International Journal for Parasitology* 41 (2011) 293–300

Troye-Blomberg, M. "Genetic Regulation of Malaria Infection in Humans." *Chem Immunol*.(2002) **80**: 243-252.

Urdaneta, L; Guevara, P and Ramirez, Jl. "Evaluation of DNA Recombinant Methodologies for the Diagnosis of Plasmodium Falciparum and Their Comparison with the Microscopy Assay." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.(1998) **93**(5): 639-646.

Vanessa Machault, Cécile Vignolles, Frederic Pages, Libasse Gadiaga, Yves M. Tourre,**Abdoulaye Gaye**, Cheikh Sokhna, Jean-François Trape, Jean-Pierre Lacaux,

Christophe Rogier "Risk Mapping of *Anopheles gambiae* s.l. Densities Using Remotely-Sensed Environmental and Meteorological Data in an Urban Area: Dakar, Senegal" *Plos One* 2012, issue 11

Vanderberg, J., R. Nussenzweig, et al. (1969). "Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites." *Mil Med* **134**(10): 1183-90.

Van Dijk, Mr; Janse, Cj; Thompson, J; Waters, Ap; Braks, Ja; Dodemont, Hj; Stunnenberg, Hg; Van Gemert, Gj; Sauerwein, Rw and Eling, Wm. "A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility." *Cell*.(2001) **104**(1): 153-164.

Vaughan, J; Noden, B and Beier, Jc. "Population Dynamics of *P.Falciparum* Sporogony in Laboratory Infected *A.Gambiae*." *Journal of Parasitology*.(1992) **78**: 716-724.

Vaughan, Ja; Do Rosario, Ve; Leland, P; Adjepong, A; Light, J; Woollett, Gr; Hollingdale, Mr and Azad, Af. "*Plasmodium Falciparum*: Ingested Anti-Sporozoite Antibodies Affect Sporogony in *Anopheles Stephensi* Mosquitoes." *Experimental Parasitology*.(1988) **66**(2): 171-182.

Vaughan, J., Wirtz R A, Do Rosario V E, Azad A F, (1990). "Quantitation of ant sporozoite immunoglobulins in the hemolymph of *A.stephensi* after blood feeding." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **42**: 426-444

Vivier, I., Naquet P, Gorvel J P, Rigal A, Pierres M (1989). "The mouse T-lymphocyte-activating molecule THAM is associated to ECTO-aminopeptidase activity." *Thymus* **14**(1-3): 55-9.

Webster, D and Hill, Av. "Progress with New Malaria Vaccines." *Bull World Health Organ*.(2003) **81**(12): 902-909.

"World Health Organization Severe *Falciparum* Malaria., Communicable Diseases Cluster." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.(2000) **94** Suppl 1: S1-90.

World Health Organ Tech Rep Ser. 1951 Apr;38:1-72. REPORT on the malaria conference in Equatorial Africa, Kampala, Uganda, 27 November - 9 December 1950. PMID:14913972 [PubMed - indexed for MEDLINE]

World Health Organizatin. *World Malaria Report* (WHO, 2011).

World Health Organization. *World Malaria Report* (WHO, 2012).

Wirtz, Ra; Zavala, F; Charoenvit, Y; Campbell, Gh; Burkot, Tr; Schneider, I; Esser, Km; Beaudoin, Rl and Andre, Rg. "Comparative Testing of Monoclonal Antibodies against *Plasmodium Falciparum* Sporozoites for Elisa Development." *Bull World Health Organ*.(1987) **65**(1): 39-45.

ANNEXE

Liste des figures

Figure I : Illustration des formes sexuées (gamétocytes) et asexuées (trophozoïtes) de <i>P. falciparum</i> sur un frottis de sang infecté.....	7
Figure II : Cycle de développement du <i>plasmodium falciparum</i> (d'après Wirth, 2002).....	8
Figure III : Cycle de développement d'un anophèle (d'après J. Brunhes <i>et al.</i> les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM ed, 1998).....	10
Figure IV : Plaque de microtitration pour ELISA.....	18
Figure V : Zones impaludées dans le monde (OMS, 2011).....	19
Figure VI : Principe du SMFA.....	44
Figure VII : Principe du DMFA classique.....	45
Figure VIII : Carte de la zone de Thiès.....	59
Figure IX : Dépistage des porteurs de gamétocytes par gouttes épaisses.....	59
Figure X : Détection des porteurs de gamétocytes au microscope.....	60
Figure XI : Laboratoire de terrain.....	61
Figure XII : Recherche des oocystes au microscope et preparation de gobelets de moustiques au gorgement.....	61
Figure XIII : Gorgement direct des moustiques sur la peau.....	62
Figure XIV : Gorgement artificiel des moustiques a travers une membrane de parafilm.....	63
Figure XV : Série de gorgement sur membrane (Technique d'infection expérimentale).....	65
Figure XVI : Principe du Gorgement OW-AB.....	66
Figure XVII : Coloration des gouttes épaisses au Giemsa.....	68
Figure XVIII : Répartition des indices plasmodiques et fortes charges parasitaires pendant les 4 mois de transmission chez les 2-9 ans.....	72
Figure XIX : Répartition des indices gamétocytaires et « gros » porteurs pendant les 4 mois de transmission chez les 2-9 ans.....	73
Figure XX : Evolution des prévalences parasitaires sur 1 an.....	77
Figure XXI : Répartition mensuelles des accès fébriles.....	79
Figure XXII : Evolution du taux d'incidence mensuelle sur 1 an de surveillance.....	80
Figure XXIII : Proportion des poussées parasitaires chez les fébriles et non fébriles.....	81
Figure XXIV : Densité d'incidence par classes d'âges.....	83
Figure XXV : Fréquence théorique des accès palustres par individu et par an en fonction de l'âge.....	84
Figure XXVI : Corrélation linéaire entre densités asexuées et sexuées 7 jours après traitement de l'accès palustre.....	88
Figure XXVII : Intensité moyenne de la TRA naturelle dans un échantillon de gros porteurs de gamétocytes.....	92
Figure XXVIII : Rôle relatif de la TRA par rapport à l'inhibition globale.....	93
Figure XIX : Relation entre TRA naturelle et densité gamétocytaire.....	94
Figure XXX : Relation entre l'âge et l'intensité de TRA.....	95
Figure XXXI : Relation entre densité gamétocytaire et pourcentage de moustique infecté.....	100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Transmission home – moustique dans différentes zones endémiques.....	55
Tableau 2 : Répartition des indices parasitaires dans la zone en fonction des classes d'âge.....	71
Tableau 3 : Répartition de la parasitémie de <i>P.falciparum</i> en fonction de l'âge.....	75
Tableau 4 : Fréquence observée des accès palustres par individu et par an.....	84
Tableau 5 : Répartition des densités parasitaires moyennes chez les accès palustres en fonction des classes d'âge.....	85
Tableau 6 : Répartition des SP résistances en fonction des classes d'âge.....	86
Tableau 7 : Fréquence des poussées gamétocytaires en fonction de la SP-résistance.....	87
Tableau 8 : Fréquence des poussées gamétocytaires chez les souches CQ ou SP sensibles...	87
Tableau 9 : Infections des moustiques post-thérapeutiques au Fansidar®.....	89
Tableau 10 : Résultats des DMFA classiques sur de gros porteurs de gamétocytes.....	91
Tableau 11 : Relation entre TRA naturelle et densité gamétocytaire.....	94
Tableau 12 : Représentativité de notre échantillon de population.....	96
Tableau 13 : Caractéristiques de la population étudiée.....	97
Tableau 14 : Contribution au groupe d'âge au reservoir humain infectant.....	98
Tableau 15 : Probabilité qu'un repas sanguin soit infectant.....	99
Tableau 16 : Relation entre statut gamétocytaire et infectivité des individus en fonction de groupes d'âge.....	101

PUBLICATIONS

Am. J. Trop. Med. Hyg., 75(6), 2006, pp. 1090–1095
Copyright © 2006 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

PLASMODIUM FALCIPARUM TRANSMISSION BLOCKING IMMUNITY IN THREE AREAS WITH PERENNIAL OR SEASONAL ENDEMICITY AND DIFFERENT LEVELS OF TRANSMISSION

CHRISTIAN BOUDIN,* ABDOULAYE DIOP, ABDOULAYE GAYE, LIBASSE GADIAGA, CLÉMENT GOUAGNA, INNOCENT SAFEUKUL, AND SARAH BONNET

Unité de recherche 077, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Dakar, Sénégal; International Center of Insect Physiology and Ecology, Nairobi, Kenya; Institut Pasteur, Unité d'immunologie moléculaire des parasites, Paris, France; Université Cheikh Anta Diop, Département de biologie animale, Dakar, Sénégal; Unité INSERM U 399 Faculté de médecine la Timone, Marseille, France

Abstract. *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity (TBI) was investigated in 3 different endemic areas. Reared *Anopheles gambiae* s.s. were experimentally infected with the blood of gametocyte carriers, either in the presence of autologous plasma (OWN) or after replacement of the OWN plasma with a nonimmune serum of AB blood group (control). Transmission reduction was defined by a lower level of mosquito infection in the OWN batch compared with the control. After controlling for the effect of gametocytemia, the proportion of "transmission reducers" was lower in the town of Yaounde in Cameroon (UC), (14%, $N = 75$) than in the two rural areas of South Cameroon (RC) (29%, $N = 31$) and Sénégal (RS) (44%, $N = 32$). The contribution of TBI relative to the total inhibition of the parasite development (including human, parasite, and mosquito factors) was higher in RS (49.6%) than in RC (12.6%) and UC (9.5%).

INTRODUCTION

Transmission blocking immunity (TBI) is a specific immunity acquired in humans, which reduces the infectivity of *Plasmodium* to mosquito.¹ Immune factors, ingested with the blood meal, inhibit or block the development of the free sexual stages: gamete, zygote, and ookinete, which have common antigens with gametocytes.^{2–3}

The level of naturally acquired TBI can be estimated by the proportion of transmission-reducing sera in human population.⁴ The titer of specific and functional antibodies against sexual stages does not seem to be a reliable indicator of TBI in Africa.⁵ Alternatively, two other biological tests are available. These include the standard membrane feeding assay (SMFA)⁶ and the direct membrane feeding assay (DMFA).⁷ These tests are based on the comparison of infection in mosquitoes, fed with gametocytes and either i) a test immune serum (batch OWN) or ii) a nonimmune control serum (batch AB). An inhibiting serum is defined by a significant reduction of mosquito infection in the OWN batch compared with the AB one. The SMFA is commonly performed using cultured gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Whereas this method is considered a gold standard, it is expensive and labor intensive. In the DMFA, the blood of gametocyte carriers is used as a source of infectious parasites, and the test can be carried out in the field on larger samples of individuals.^{8,9}

Few attempts have been made to evaluate the impact of natural TBI under field conditions.^{7–13} In spite of a large variety of applied methods and indicators, data suggest that transmission reduction due to host immune factors is probably different from one area to another. In addition, a relationship was observed between the level of TBI and gametocytemia.⁸ Taking into considerations these different observations, a hypothesis was formulated. In a hyperendemic area with permanent transmission, protective immunity against asexual parasites is quickly acquired. Parasite density and ma-

laria morbidity are generally low in the population, and consequently, high densities of gametocytes are rare. Because this parasite stage is the main stimulus of TBI, a low level of natural TBI should be observed under high transmission intensity. On the contrary, an opposite situation is expected in a hypoendemic area with a short period of malaria transmission.

To verify this hypothesis, the levels of TBI were evaluated in two hyper- and hypoendemic areas of South Cameroon with permanent transmission and in a hypoendemic zone of Sénégal with a short transmission period.

MATERIALS AND METHODS

Study areas. The study was carried out in Thies (Sénégal), a sahel area in the North of Dakar. The climate is characterized by a short rainy season from July to October and a long dry season from November to June. Malaria transmission was previously described by Robert et al.¹⁴ in the bordering zone of Niakhar. Briefly, *Anopheles arabiensis* is the main vector. The entomological inoculation rate (EIR) is about 5–15 infectious bites of mosquito per man and per year ($\text{ib m}^{-1} \text{yr}^{-1}$). Malaria is hypoendemic in this area, although it can be mesoendemic in a few villages with temporary ponds in clayey hollows.

Two other study locations were also chosen in South Cameroon, including an urban district of Yaounde and the forest rural area of Mengang, situated 90 km southeast of Yaounde. The climate is typically tropical with two rainy seasons from April to May and from July to October. Transmission is permanent in the two areas. Briefly, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, and *Anopheles nili* are the main vectors. Malaria is hyperendemic in the rural zone of Mengang,¹⁵ with an EIR ranging from 18 to 180 $\text{ib m}^{-1} \text{yr}^{-1}$.¹⁶ On the contrary, malaria is hypoendemic in the urban area of Yaounde, with an EIR from 3 to 13 $\text{ib m}^{-1} \text{yr}^{-1}$ depending on local environmental conditions.¹⁷

Estimation of prevalences and gametocyte density. At each rural area of Cameroon and Sénégal, *P. falciparum* gametocyte carriers were detected by cross-sectional surveys in villages and schools. In the urban area of Yaounde, gametocyte-

* Address correspondence to Christian Boudin, Unité de recherche 077, Institut de Recherche pour le Développement, Dakar, Sénégal. E-mail: boudin@ird.sn

positive patients attending the district health center were sampled. Fingerprick blood was taken from each volunteer individual present on the day of the survey. The thick blood smears were stained with 10% Giemsa and examined microscopically with (100 $\times$) oil immersion lens for the presence of sexual and asexual parasites. The results were expressed by a semiquantitative estimation as follows:

- Class 0: no parasite per 800 white blood cells (WBC).
- Class 1: less than one parasite per microscopic field.
- Class 2: one or more parasites per microscopic field.

Species infection-rates, *P. falciparum* gametocyte prevalence, and the proportion of high densities of asexual (class 2) or sexual parasites (>2 gametocytes per 800 WBC) were recorded in the two rural areas where the surveys were carried out on large samples of the total population. These estimations were not possible in Yaounde, where the sample of outpatients was not representative of the total population. Both symptomatic and asymptomatic individuals with only high asexual densities (class 2) were treated with sulfadoxine-pyrimethamine.

Inclusion of gametocyte carriers. Two inclusion criteria of gametocyte carriers were defined: 1) age over 4 years and 2) more than 20 *P. falciparum* gametocytes/mm³ of blood. This high gametocyte density was included to obtain significant levels of mosquito infection after artificial feeding. At the end of the study, an impregnated bed net was given to the participating individuals as a compensation. Informed consent was obtained from all adult participants and from parents or legal guardians of minors. This study was approved by the National Ethical Committees of Cameroon and Sénégal.

Direct membrane feeding assay. At each study site, a Cameroonian strain of *A. gambiae* s.s. was used as mosquito vector. It was previously adapted to feed on Parafilm membrane feeders.¹⁸ The DMFA was previously described by Mulder and others.⁷ Briefly, 4 mL of blood was drawn from the gametocyte carriers in a heparinized Vacutainer tube. All manipulations were carried out at 37°C to reduce gametocyte activation.

- A control batch (IM) of 1 mL blood was immediately fed without preparation, to 3-day-old female mosquitoes, through a warm water jacketed membrane feeder, for 15 minutes.
- Two aliquots of 1 mL blood each were centrifuged 5 minutes at 700 $\times$ g. In the first sample, the cell pellet was resuspended in autologous plasma (OWN), while in the second sample, the plasma was removed and replaced by 0.5 mL of nonimmune serum (AB). The two manipulated blood samples were separately given to 3-day-old mosquitoes.

Unfed and partially fed *Anopheles* were removed, and the others were kept at the insectary on a 10% sucrose diet. Seven days later, the midguts of the surviving mosquitoes were dissected and stained with 3% mercurochrome in PBS to facilitate the examination of mature oocysts by light microscope (40 $\times$ lens).

Determination of TBI. Experiments were analyzed when 3 criteria were met.

1. At least one oocyst per positive midgut observed in the AB batch, as a control for gametocyte infectiousness after blood preparation. This criteria attested that any absence

of oocyst in the pair-matched OWN batch was due to host plasma factors.

2. A minimum of 20 mosquitoes dissected in each batch, to obtain a good sensitivity of the comparison between OWN and AB infection rates (IRs).
3. Comparability of IRs in the OWN and IM batches. This comparison estimated the role of gametocyte activation, generated by blood manipulation, on infectiousness of sexual stages. A significant difference between IRs ($P < 0.01$) was imputed to a methodological bias, and the experiment was discarded.

Three indicators of natural TBI were defined:

- *The proportion of reducers.* Plasma from a gametocyte carrier was defined as reducing if IR_{OWN} was significantly lower than IR_{AB} ($P < 0.01$). Only large differences between OWN and AB batches were expected to be reproducible. The mean oocyst density in the infected mosquitoes was not taken into account because it was generally low in DMFA conditions and IR was considered to be more comparable.¹⁹
- *The intensity of TBI,* or the difference ($IR_{AB} - IR_{OWN}$).
- *The contribution of TBI to total inhibition (TBI/TI).* The proportion of infected mosquitoes after feeding with autologous plasma (OWN) was a consequence of human, mosquito, and parasite inhibiting factors,^{20,21} and thus the proportion of noninfected mosquitoes ($100 - IR_{OWN}$) was a reflection of this total inhibition (TI). In the same way, mosquito infection with the control serum (AB) was a consequence of only mosquito and parasite factors, and ($100 - IR_{AB}$) was a reflection of nonhuman inhibiting factors named transmission blocking activity (TBA). Thus, the relative contribution of TBI to TI was defined by the ratio $(IR_{AB} - IR_{OWN})/(100 - IR_{OWN})$.

Estimation of the mosquito susceptibility to different geographical strains of *P. falciparum*. The same strain of *A. gambiae* (s.s., F cytotype), originating from a breeding place in a peripheral district of Yaounde, was used in all experimental infections. Vector susceptibility to indigenous or exogenous parasite isolates could be different and had to be taken into account for comparisons of transmission reduction between the three areas. Thus, an indicator was proposed. The theoretical infectiousness of 1 gametocyte was calculated in the AB batches, as the ratio of the percentage of infected mosquitoes and the corresponding gametocyte density,²² to control for the variations of gametocyte densities and to test the innate susceptibility to local parasites at each site.

Statistical analysis. Statgraphics 5.0 and Epi-Info software were used for all statistical analyses. In the 1-variable analysis, simple χ^2 test was applied for the comparison of proportions, χ^2 test for trends was used for exposure categories that had a natural order (classes of age or gametocyte density), and the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were applied for the comparisons of continuous variables, which were not normally distributed (age, gametocyte density, IRs, TBI, and TBI/TI). Correlations between non-Gaussian variables were determined by Spearman's correlation coefficient. In the multifactor analysis, comparisons between the levels of TBI in the three areas were performed, taking into account gametocyte density as confounding factor. Multifactor ANOVA was applied for quantitative variables (TBI intensity and TBI/TI).

TABLE 1

Values of the parasite infection rates, according to age groups, in two samples of population from rural areas of Cameroon and Senegal

Age groups	Sample size	Representativity of each age group (%)	% P ⁺	% P ⁺ (class 2)	% Uninf	% gpi	% gpi ⁺ (>40/mm ³)
CAMEROON							
< 1	72	0.9	48.6	27.8	9.7	9.7	2.8
1-4	913	12.2	64.3	26.3	17.2	12.9	2.5
5-9	2,500	34.8	67.9	18.9	18.1	10.6	1.4
10-14	2,272	30.5	66.6	15.0	15.3	9.1	0.6
15-35	959	12.8	49.3	8.5	6.2	6.0	0.1
> 35	641	8.6	30.2	4.5	5.1	2.9	0.0
TOTAL†	7,447		61.1	16.1	9.1	9.1	1.0
SENEGAL							
< 1	77	1.9	12.9	6.5	0.1	5.2	2.6
1-4	658	16.2	15.9	7.4	2.3	8.0	3.9
5-9	1,214	29.8	17.5	8.3	3.2	7.6	3.2
10-14	887	21.8	19.1	8.7	1.8	7.2	2.9
15-35	749	18.4	9.2	3.6	0.8	5.9	2.9
> 35	479	11.8	8.7	3.1	0.4	3.1	0.2
TOTAL†	4,064		14.9	6.8	1.9	6.6	2.8

P⁺, P. falciparum; Uninf, coinfections with P. malariae and/or P. ovale; gpi, gametocytes; class 2, more than one parasite per microscopic field.* Reading threshold of the thick blood films (10 parasites/mm³).

† Standardization on age.

after log transformation to equalize the variances. Logistic regression models and the χ^2 test of Mantel and Haenszel were used with the proportions of reducers.

RESULTS

Epidemiologic situation of malaria. A total of 7,447 and 4,064 thick blood films were performed in the rural areas of Cameroon and Senegal, respectively. Most of the parasite indices were higher in Cameroon (Table 1). However, the proportion of high gametocyte densities (> 40 gametocytes/mm³) was about 3 times lower in Cameroon (1.0%) than in Senegal (2.8%).

Observations on gametocyte infectiousness and TBI. One hundred thirty-eight experiments were included, of which 32 came from Senegal, 31 from rural Cameroon, and 75 from Yaounde. The median of gametocyte density was higher in Senegal than in the two areas of Cameroon. The median of infection rate in the IM batch (IR_{IM}) and the median of oocyst density had the same level in the three areas (Table 2). IR_{IM} seemed to be very low compared with gametocyte densities. The susceptibility of *A. gambiae* was four times higher in the rural area of Cameroon than in Senegal and Yaounde,

suggesting that there is a significant influence of parasite isolates on susceptibility of the reared strain of *A. gambiae*. The TBI indicators, namely the proportion of reducers, TBI intensity, and the contribution of TBI to total inhibition (TBI/TI), were significantly higher in Senegal than in the two areas of Cameroon (Table 2). However, this observation was probably confounded by the differences in gametocyte density, age, and susceptibility between the three samples.

Relationships between TBI and gametocytemia or age. Because age and gametocyte density could influence the level of TBI,^{13,25} we analyzed the relationship between these factors and the different indicators of TBI. There was no association between the proportion of reducers, the mean value of TBI intensity or TBI/TI, and the different age groups (Table 3). On the contrary, the three indicators of TBI were increasing with gametocyte density (Table 3), especially the proportion of reducers (χ^2 of trends = 6.67, $P = 0.009$). The relative risk of being reducer was about 4 times higher for gametocyte densities of more than 200 gametocytes/mm³, with regard to the first class of gametocyte density (20-60 gametocytes/mm³). In addition, there was a positive correlation between gametocyte density and the intensity of TBI (Spearman coefficient = 0.27, $P = 0.001$) or TBI/TI (Spearman coefficient

TABLE 2

Comparisons of age, gametocyte density, infection in mosquitoes, TBI level, and susceptibility of mosquitoes in three samples of gametocyte carriers from Cameroon and Senegal

Parameter	Rural Cameroon (RC)	Urban Cameroon (UC)	Rural Senegal (RS)	Overall comparison*
Sample size	31	75	32	
Median of age (IQR)	9.0 (5.0)	22.0 (11.0)	10.0 (6.5)	$P < 10^{-3}$
Median of gametocyte density (IQR)	80 (126)	200 (432)	316 (814)	$P < 10^{-3}$
Median of IR _{IM} (IQR)	0.33 (0.48)	0.20 (0.228)	0.25 (0.51)	$P = 0.13$
Median of oocyst density (IQR)	4.2 (11.6)	2.3 (2.9)	3.0 (11.8)	$P = 0.06$
Median of PIG _{AB}	0.004 (0.009)	0.001 (0.002)	0.001 (0.002)	$P < 10^{-3}$
Proportion of reducers (%)	29.0	14.6	43.7	$P = 0.005$
Median of TBI intensity (IQR)	0.086 (0.381)	0.095 (0.167)	0.231 (0.440)	$P < 10^{-3}$
Median of TBI/TI (IQR)	0.127 (0.607)	0.095 (0.207)	0.496 (0.572)	$P < 10^{-3}$

IQR, interquartile range; IR_{IM}, infection rate of the mosquitoes after immediate feeding on blood of gametocyte carriers; PIG_{AB}, observed infection of one gametocyte in the AB host of DMFA; Transmission reducer = individually with IR_{AB} = IR_{RC} ($P < 0.01$); TBI intensity = IR_{AB} - IR_{RC}; TBI/TI = (IR_{AB} - IR_{RC})/(1 - IR_{RC}).* Kruskal-Wallis test or χ^2 test.

TABLE 3
Relationship between TBI indicators and age or gametocyte density

Classes of the variable	Effectives	% of reducers	Median of TBI intensity (IQR)	Median of TBI/TI (IQR)
Age groups				
5-9	33	39.4	0.187 (0.368)	0.300 (0.556)
10-15	35	28.6	0.195 (0.321)	0.117 (0.550)
16-25	42	7.1	0.101 (0.158)	0.103 (0.198)
> 25	28	28.6	0.082 (0.305)	0.095 (0.352)
Comparison*		$P = 0.06$	$P = 0.36$	$P = 0.16$
Classes of gametocyte density (per mm ³)				
20-60	33	12.1	0.040 (0.133)	0.043 (0.143)
61-200	39	17.9	0.095 (0.242)	0.095 (0.322)
201-500	29	34.5	0.219 (0.383)	0.286 (0.509)
> 500	37	35.1	0.167 (0.311)	0.235 (0.350)
Comparison*		$P = 0.009$	$P = 0.003$	$P = 10^{-3}$

IQR, interquartile range; Transmission reduction = individuals with $DR_{CEN} - DR_{AB}$ ($P < 0.01$); TBI intensity = $IR_{AB} - DR_{CEN}$; TBI/TI = $(IR_{AB} - IR_{CEN})/(1 - DR_{CEN})$; $DR_{CEN} = IR_{AB}$ indicates rate of the mosquitoes after feeding with CEN plasma or AB serum in DMFA.

* χ^2 test for trend and Kruskal-Wallis test.

= 0.34, $P = 0.0001$). Thus, gametocyte density was a confounding factor for TBI analysis.

Multifactor analysis of the TBI levels in the three areas. The comparisons of TBI intensity and TBI/TI, in relation to area and gametocyte density, were performed by multifactor ANOVA. These two indicators were significantly different in the three areas, after removing the effect of gametocytemia. The multiple range test analysis showed that TBI was the lowest in Yaounde, and there was no significant difference between the rural zones of Cameroon and Sénégal (Table 4).

The logistic regression was used to assess the association of the percentages of reducers in relation to area and classes of gametocytemia (20-60, 61-200, 201-500, and > 500 gametocytes/mm³). There was a significant relationship between the percentage of reducers and gametocyte density. The 95% confidence interval of the odds ratio showed that the percentage of reducers was significantly lower in the first class (20-60 gametocytes/mm³) than in the reference class (> 500 gametocytes/mm³). This test showed also a relationship between transmission reduction and area. The Mantel and Haenszel test allowed us to compare two by two the different areas. The proportion of reducers was the lowest in Yaounde and was not significantly different between the rural areas of Cameroon and Sénégal (Table 5).

DISCUSSION

A comparison of different indicators of natural transmission blocking immunity (TBI) was performed among selected residents in three endemic areas with different dynamics and levels of malaria transmission. TBI was estimated by direct membrane feeding assay (DMFA), using gametocyte positive blood samples, with or without replacement of plasma derived from gametocyte carriers.

Multifactor analysis, linking the variation of TBI in relation to the different areas at a constant level of gametocytemia, showed that TBI was finally the lowest in Yaounde, and there was no difference between the two rural areas of Cameroon and Sénégal. Our data did not support the initial assumption, which expected higher TBI in hypoendemic area with seasonal transmission. However, in this study, TBI has been in-

fluenced either by difference in vector susceptibility or by the gametocyte quantity or quality. For example, the prevalence of high gametocyte densities (> 40 gametocytes/mm³) was three times higher in Sénégal than in Cameroon, while the susceptibility of the reared vector was four times lower. These two observations had opposed effects on TBI, and this could explain the paradoxical absence of difference between the two rural areas. In addition, gametocyte carriers with high densities of sexual stages were enrolled. Because sexual parasites are probably the main stimulus of transmission blocking immunity, natural TBI was expected to be at its highest level and differences between areas, especially between the Cameroonian and Sénégalese rural areas, could be hidden.

However, it was difficult to justify why the potential impact of TBI on mosquito infection was relatively low in the urban area of Yaounde. This observation could be explained by the widespread use of sulfadoxine-pyrimethamine (SP) to compensate for the low efficacy of chloroquine. This drug association has previously been associated with suppression of the sporogonic development of *Plasmodium*.²⁴⁻²⁶ Thus, comparisons between IR_{CEN} and IR_{AB} in the urban area had probably lacked sensitivity. Sulfadoxine-pyrimethamine could also explain the apparent low susceptibility of the local strain of *A. gambiae* to the local strains of *P. falciparum* in Yaounde.

Another unexpected observation was the absence of relationship between age and the level of TBI. The antibody

TABLE 4
Multifactor ANOVA for the levels of TBI in relation to area and gametocyte density

Variables	F value	P value
Multifactor ANOVA (TBI intensity)		
Covariate LOG10 (get)	7.01	0.009
Areas	8.00	0.0006
Multiple range test	RC > UC, RC = RS, UC < RS	
Multifactor ANOVA (TBI/TI)		
Covariate LOG10 (get)	14.53	0.0002
Areas	12.60	< 10 ⁻⁴
Multiple range test	RC > UC, RC = RS, UC < RS	

get, gametocyte density; area, rural Cameroon (RC), urban Cameroon (UC), and rural Sénégal (RS); TBI intensity = $IR_{AB} - IR_{CEN}$; TBI/TI = $(IR_{AB} - IR_{CEN})/(1 - IR_{CEN})$; IR_{CEN} or IR_{AB} , infection rate of the mosquitoes after feeding with CEN plasma or AB serum in DMFA.

TABLE 5
Logistic regression model and Mantel and Haenszel test for the proportion of reducers in relation to area and gametocyte densities

Parameters	Logistic regression			
	Estimate	Odds ratio	Confidence interval	P value
Constant	0.063			0.002
Gametocyte density ($> 500/\text{mm}^3 = 0$)				0.035
20–60/ mm^3	-1.551	0.21	0.05–0.84	Significant
61–200/ mm^3	-1.098	0.33	0.10–1.10	Non-significant
201–500/ mm^3	+0.153	1.16	0.38–3.49	Non-significant
Area (RS = 0)				0.003
RC	+0.086	1.08	0.32–3.70	Non-significant
UC	-1.404	0.24	0.09–0.66	Significant
Multiple comparisons (Mantel and Haenszel test)				
	χ^2 Value	P value	Relative risk	Confidence interval
RC > UC (UC = 0)	5.22	0.02	3.82	1.28–11.42
RC = RS (RS = 0)	0.00	0.98	0.87	0.38–2.00
UC < RS (RS = 0)	0.66	0.009	0.40	0.21–0.76

Area: rural Cameroon (RC); urban Cameroon (UC), and rural Senegal (RS).

response against a large range of parasite antigens usually increases with malaria experience and age. The immune response to sexual antigens is apparently an exception. This might be explained by the short life-span of natural *P. falciparum* TBI, as it was observed in *P. vivax* infection.²⁷ In addition, the difference in TBI levels between different age groups was not detected probably because gametocyte carriers were selected on the basis of high densities of sexual stages and probably high levels of TBI in each age group.

With regard to the comparison of different epidemiologic situations, the most interesting parameter is the proportion of infectious individuals to mosquitoes, who exhibit effective TBI. A recent report by Bonnet and others²⁸ showed that about 8% of the population was infectious to mosquitoes, in two villages of the rural area in Cameroon. On another hand, we observed that about 30% of the gametocyte carriers with more than 20 gametocytes per cubic milliliter had effective TBI according to our restrictive definition. Thus, the proportion of infectious individuals with effective TBI, estimated by the product (8% $\times$ 30%), seemed very low, as only 2.4% of the individuals could reduce malaria transmission in this area. Children less than 5 years of age were discarded in the two studies for ethical reasons. Thus, the proportion of reducers was probably underestimated, because a significant part of malaria transmission may arise from young children.^{22,29,30} However, it is possible that the proportion of reducers was also biased because the sample of gametocyte carriers we selected in this study had high densities of sexual stages and was not representative of the population of infectious individuals.

In conclusion, the key finding of this study is that variation of TBI is related to gametocyte density. On the basis of our observations, it can be envisaged that TB-interventions will show the strongest impact in areas with low and seasonal transmission. However, it is more opportune to use a different approach, on a representative sample of infectious individuals, regardless of their parasite status. In those conditions, another kind of DMFA will have to be performed in the field. This other test was previously described and used in Sri Lanka.⁹ An interesting and new challenge is offered to malaria researchers in the field.

Received July 2, 2004. Accepted for publication January 13, 2005.

Acknowledgments: The authors thank the inhabitants of Mengang and the patients of the health center of Yaounde in Cameroon and the population of Anene in Senegal for their appreciated collaboration. We are also grateful to the team of OCEAC in Yaounde and to Nyafoua Moise in Dakar for their technical assistance.

Financial support: This work was supported by the French Ministry of National Education and Research (VIHPAL) and by the Institute of Research for Development (IRD).

Authors' addresses: Christian Boudin, Abdoulaye Diop, Unité de recherche 077, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 1386-CP18524, Dakar, Sénégal, Telephone: (221) 849 35 35, Fax: (221) 832 43 07, Abdoulaye Gaye and Libiane Gadiaga, Université Cheikh Anta Diop, Département de biologie animale, BP 1101, Dakar, Sénégal, Clément Gouagna, International Center of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), P.O. Box 30772, Nairobi Kenya, Telephone: (254)-59-22218, Fax: (254)-59-22190, Innocent Sateukou, Laboratoire de parasitologie-mycologie, INSERM U 399, Faculté Nord de médecine, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France, Telephone: (33) 4 91 32 45 25, Fax: (33) 4 91 79 60 63, Sarah Bonnet, Unité d'immunologie moléculaire des parasites, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France, Telephone: (33) 1 40 61 35 49, Fax: (33) 1 45 68 84 32.

Reprint requests: Christian Boudin, Laboratoire de parasitologie, Centre I.R.D., BP 1386-CP18524, Dakar, Sénégal, Telephone: (221) 849 35 78, Fax: (221) 832 43 07, E-mail: boudin@ird.sn.

REFERENCES

1. Carter R, Kumar N, Quinky IA, Good MF, Mendis KN, Graves PM, Miller LH. 1988. Immunity to sexual stages of malaria parasites. *Prog Allergy* 41: 193–214.
2. Carter R, Miller LH, Renier J, Kaushal DC, Kumar N, Graves PM, Gwladz CA, Gwadz RW, French C, Wirth D. 1984. Target antigens in malaria transmission blocking immunity. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 307: 201–213.
3. Vermeulen A, Van Deursen J, Brakenhoff RH, Lensen THW, Ponmudurai TV, Meuwissen JHT. 1986. Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronized gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* 20: 155–163.
4. Lensen THW, van Druen J, Bolmer MG, van Gemert G, Eling WM, Sauerwein R. 1996. Measurement by membrane feeding of reduction in *Plasmodium falciparum* transmission induced by endemic sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 20–22.

3. Mulder B, Lensen T, Tchuinkam T, Ruefflig W, Verhave JP, Boudin C, Sauerwein R. 1999. *Plasmodium falciparum*: membrane feeding assays and competition ELISAs for the measurement of transmission reduction in sera from Cameroon. *Exp Parasitol* 92: 81–98.
6. Ponnudurai TV, Van Gemert GJ, Lensen THW. 1987. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum*: its variability with gametocyte numbers and concentration of antibody. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 491–493.
7. Mulder B, Tchuinkam T, Dechering KJ, Verhave JP, Carnevale P, Meuwissen JH, Robert V. 1994. Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 121–125.
8. Boudin C, Van Der Kolk M, Tchuinkam T, Gouagna LC, Bonnet S, Safeukui I, Mulder B, Meunier JY, Verhave JP. 2004. *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunol* 26: 105–110.
9. Premawansa S, Gamage-Mendis AC, Perera L, Begarrie S, Mendis KN, Carter R. 1994. *Plasmodium falciparum* malaria transmission-blocking immunity under conditions of low endemicity as in Sri Lanka. *Parasite Immunol* 16: 35–42.
10. Graves PM, Carter R, Burkot TR, Otakye IA, Kumar N. 1988. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol* 10: 209–218.
11. Gamage-Mendis AC, Rajakaruna J, Carter R, Mendis KN. 1992. Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite Immunol* 14: 385–396.
12. Drakeley CJ, Mulder B, Tchuinkam T, Gupta S, Sauerwein R, Targett GA. 1998. Transmission-blocking effects of sera from malaria-exposed individuals on *Plasmodium falciparum* isolates from gametocyte carriers. *Parasitology* 116: 417–423.
13. Bonnet S, Gouagna LC, Paul RE, Safeukui I, Meunier JY, Boudin C. 2003. Estimation of malaria transmission from humans to mosquitoes in two neighbouring villages in south Cameroon: evaluation and comparison of several indices. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 53–59.
14. Robert V, Dieng H, Lochouart L, Truere SF, Trape JF, Simondon F, Fontenille D. 1998. La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Sénégal. *Trop Med Int Health* 3: 667–677.
15. Bonnet S, Paul RE, Gouagna C, Safeukui I, Meunier JY, Gnanoue R, Boudin C. 2002. Level and dynamics of malaria transmission and morbidity in an equatorial area of South Cameroon. *Trop Med Int Health* 7: 249–256.
16. Meunier JY, Safeukui I, Fontenille D, Boudin C. 1999. Etude de la transmission du paludisme dans une future zone d'essai vaccinal en forêt équatoriale du sud Cameroun. *Bull Soc Pathol Exot* 92: 309–312.
17. Manga L, Robert V, Messi J, Desfontaine M, Carnevale P. 1992. Le paludisme urbain à Yaoundé, Cameroun. 1) Etude épidémiologique dans 2 quartiers centraux. *Mém Soc R Belge Entomol* 35: 155–162.
18. Tchuinkam T, Mulder B, Dechering KJ, Stoffels H, Verhave JP, Cor M, Carnevale P, Meuwissen JH, Robert V. 1993. Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte-carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop Med Parasitol* 44: 271–276.
19. Medley GF, Sinden RE, Fleck S, Billingsley PF, Tirawanchai N, Rodriguez MH. 1993. Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector. *Parasitology* 106: 441–449.
20. Lensen THW. 1996. Infectivity of malaria parasites to mosquitoes: the independent roles of parasite, vector and host. *Ann Trop Med Parasitol* 90: 359–365.
21. Robert V, Boudin C. 2003. Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot* 96: 6–20.
22. Boudin C, Olivier M, Moiez JF, Chiron JP, Ambroise-Thomas P. 1993. High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina-Faso. *Am J Trop Med Hyg* 48: 700–706.
23. Graves PM, Dönbrovsky A, Sattabongkoi J, Battistutta D. 1992. Human antibody responses to epitopes on the *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen PFS 48/45 and their relationship to infectivity of gametocyte carriers. *Am J Trop Med Hyg* 46: 711–719.
24. Rieckmann K, McNamara J, Stockert T, Powell R. 1968. Gametocytocidal and sporontocidal effects of Primaquine and sulfadiazine with pyrimethamine in a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bull WHO* 38: 625–632.
25. Hogg B, Gamage-Mendis A, Butcher GA, Thompson R, Begtrup K, Mendis C, Enosse SM, Dyedje M, Barreto J, Eling WM, Sinden RE. 1998. The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg* 58: 176–182.
26. Robert V, Awono-Ambene HP, Le Hestran JY, Trape JF. 2000. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg* 62: 210–216.
27. Ranawaka MB, Munesinghe YD, de Silva DM, Carter R, Mendis KN. 1988. Boosting of transmission-blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infections in humans depends upon frequent reinfection. *Infect Immun* 56: 1820–1824.
28. Bonnet S, Gouagna LC, Paul RE, Safeukui I, Meunier JY, Boudin C. 2003. Estimation of malaria transmission from humans to mosquitoes in two neighbouring villages in south Cameroon: evaluation and comparison of several indices. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 53–59.
29. Githeko AK, Brandling-Bennett AD, Beier MS, Atteli F, Owaga M, Collins FH. 1992. The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 355–358.
30. Muirhead-Thomson RC. 1954. Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48: 208–225.

Infectiousness of the Human Population to *Anopheles arabiensis* by Direct Skin Feeding in an Area Hypoendemic for Malaria in Senegal

Abdoulaye Gaye,* Teun Bousema, Gadiaga Libasse, Mamadou O. Ndiath, Lassana Konaté, Musa Jawara, Ousmane Faye, and Cheikh Sokhna

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR 198, Campus UCAD – IRD, BP 1386, Dakar, Sénégal; Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; Department of Immunology and Infection, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom; Programme Nationale de Lutte Contre le Paludisme, Dakar-Fann Sénégal; Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine; Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Département de Biologie Animale, Dakar – Sénégal; Medical Research Council Unit, Banjul; Atlantic Boulevard Fajara, Fajara, The Gambia

Abstract. Direct skin feeding experiments are sensitive assays to determine human infectiousness to mosquitoes but are rarely used in malaria epidemiological surveys. We determined the infectiousness of inhabitants of a malaria hypoendemic area in Senegal. Gametocyte prevalence by microscopy was 13.5% (26 of 192). Of all individuals who were gametocyte positive, 44.4% (11 of 25) infected ≥ 1 *Anopheles arabiensis* mosquito and 10.8% (54 of 500) of mosquitoes became infected. Of all individuals who were gametocyte negative by microscopy, 4.3% (7 of 162) infected ≥ 1 mosquito and 0.4% (12 of 3240) of mosquitoes became infected. The 18.2% (12 of 66) of all mosquito infections was a result of submicroscopic gametocyte carriage and two individuals without asexual parasites or gametocytes by microscopy were infectious to mosquitoes. When infectivity and local demography was taken into account, children 5–14 years of age contributed 50.8% of the human infectious reservoir for malaria. Adults and submicroscopic gametocyte carriers may contribute considerably to onward malaria transmission in our setting.

INTRODUCTION

Malaria is one of the most deadly infections in the world with 600,000 deaths annually, predominantly in young children in sub-Saharan Africa.^{1–3} In Senegal, malaria transmission has declined recently,⁴ although *Plasmodium falciparum* remains endemic throughout the country.⁵ Malaria transmission occurs from mosquito to man and from man to mosquito. Transmission from man to mosquitoes is poorly quantified⁶ and a focus often lies on entomological parameters like aggressiveness of anophelines to humans, the entomological inoculation rate, vectorial capacity,^{7,8} and indicators of parasite prevalence in the human population.⁹ However, these parameters fail to directly assess human infectivity that is most relevant in describing malaria transmission from mosquito to man.¹⁰ Only a handful of surveys on the natural process of transmission of *Plasmodium* from man to mosquito have been taken. Some indices have been defined, including the proportion of humans with malaria transmission stages, gametocytes in their peripheral blood, the proportion of infectious individuals, and the proportion of mosquitoes that have become infected after feeding.^{11–15} Often, these studies were restricted to microscopically detected gametocyte carriers, even though it has been repeatedly shown that submicroscopic gametocyte densities may result in mosquito infection.^{16,17} Although microscopically detectable gametocyte densities are more likely to result in mosquito infections compared with submicroscopic gametocyte densities, the contribution of submicroscopic gametocyte carriers to the total infectious reservoir may be considerable¹⁸ and can only be determined in xenodiagnostic surveys where individuals are recruited for feeding experiments, regardless of their parasitemic status. A recent meta-analysis further suggests that

direct skin feeding assays may be the most sensitive approach to determine human infectiousness to mosquitoes.¹⁶

In this study, we determine infectivity of the human population to mosquitoes in a hypoendemic area of Senegal using direct skin feeding mosquito assays and observe a considerable contribution of adults and submicroscopic gametocyte carriers to malaria transmission.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in 2010 in the Thies region 90 Km north of Dakar. Malaria transmission was described by Robert and others¹⁹ in the bordering zone of Niakhar. *Anopheles arabiensis* is the main vector. Malaria transmission occurs mainly during the rainy season from July to October with about 400–500 mm of annual rainfall and a long dry season from November to June. The level of malaria transmission in this area is hypo-endemic; older estimates of the sporozoite rate in field-caught mosquitoes were 1.6% to 1.8%.¹⁹ The study procedures were previously described by Bonnet and others.²⁰ Families were invited to participate in the study during community sensitization meetings. From all participating families, family members ≥ 5 years of age were invited for mosquito feeding assays. Children < 5 years of age were not included because of ethical concerns.

Ethical approval was granted by the National Ethical committees of Senegal for this study. The study protocol and objectives were carefully explained to the local administrative, community leaders, and the assembled village population. Participants were offered free treatment of malaria, intestinal helminthes infections and anemia, and received during the project an insecticide impregnated bed net. Individual written informed consent was obtained from all participants and all caretakers of participants < 18 years of age.

Measurements. Thick blood smears were prepared from each individual and slides were stained with 10% giemsa for 30 minutes and microscopically examined. Two-hundred fields were read for asexual parasites and gametocytes. Assuming

*Address correspondence to Abdoulaye Gaye, Medical Research Council Unit, The Gambia, Atlantic Boulevard, Fajara, P.O. Box 273, Banjul, Basse, The Gambia. E-mail: layegaye@gmail.com

TABLE 1
Characteristics of the study population

	Age group				
	5-9	10-14	15-24	25-44	≥45
N	45	44	31	38	34
Asexual parasite prevalence, % (n/N)*	53.3 (24/45)	63.6 (28/44)	45.2 (14/31)	34.2 (13/38)	44.1 (15/34)
Asexual parasite density, GM (IQR)	418.4 (90.5-2192.5)	500.3 (94.5-5052.0)	176.7 (76.0-198.0)	83.8 (65.0-119.0)	129.2 (56.0-195.0)
Gametocyte prevalence, % (*n/N)	28.9 (13/45)	11.4 (5/44)	9.7 (3/31)	5.3 (2/38)	8.8 (3/34)

N = proportion of each age group in the sample population.

*n = number of individuals with asexual parasite.

†n = number of gametocyte carriers in each age group.

IQR = interquartile range; GM = Geometric mean.

10–20 white blood cells per high power field and 8,000 white blood cells per μL ; this gives an estimated sensitivity of microscopy of 2–4 parasites/ μL . Sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar, Laboratoire Roche, France) was provided for individuals who were infected with $>1,000$ parasites/ μL .

Mosquito feeding assays. Study participants >5 years of age were included in an evaluation of infectiousness by feeding laboratory-bred mosquitoes directly on their skin.^{11,16} A local strain of *An. arabiensis* that has been reared in IRD (Institut de Recherche pour le Développement) insectary in Dakar was used. Batches containing 25 3-day-old mosquitoes, female anophelines, were starved for 12 hours before being applied to the participant arm. Each individual receives one batch of mosquitoes. Mosquitoes were allowed to feed 10–15 minutes and after feeding, disinfection with alcohol and anti-histamine ointment was put on the skin. Participants were instructed to avoid movement and tolerated the blood feeding without any side effects. After feeding, mosquitoes were transferred from the cups to the cages $12 \times 12 \times 12$ cm and labeled (number of the gametocyte carrier, date of infection). With a mouth aspirator, unfed mosquitoes were removed. Sugar solution was provided for 7 days during which mosquitoes were kept at 25°C , 70–80% humidity. Only cages with at least 20 mosquitoes surviving until Day 7 were included in the analysis. The midguts of surviving females were dissected in a drop of physiological saline (PBS) with 1% mercurochrome to facilitate observation of oocysts detection at the microscope. The infectivity of each patient participant was assessed by determining the percentage of mosquito midguts infected with at least one oocyst.

Statistical analysis. Data were analyzed in Epi Info version 7 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) and Stata version 12 (StataCorp, College Station, TX). Proportions were compared by the χ^2 test or Fisher exact; mean densities by the Mann-Whitney test or the Kruskal Wallis

test. The contribution of different age groups to malaria transmission (C_i) was estimated using the proportion (P_i) of the total population in each age group and the age group-specific probability of mosquito infection (T_i), which corresponds to the proportion of mosquitoes infected in feeding assays involving individuals from each age group, regardless of their parasite status:

$$C_i = (T_i P_i) / \left\{ \sum_{i=5-9 \text{ years}}^{i=55 \text{ years}} (T_i P_i) \right\}$$

RESULTS

We enrolled a total of 192 individuals 5–65 years of age. Parasite prevalence was 49.0% (94 of 192) and negatively associated with age as a categorical variable (Table 1, $P = 0.05$). Gametocyte prevalence was 13.5% (26/192) and negatively associated with age as a categorical variable (Table 1, $P = 0.005$). Geometric mean gametocyte density was 53.7 gametocytes/ μL (interquartile range [IQR] 4–226) and there were too few microscopy positive gametocyte observations to allow a robust statistical analysis of gametocyte density in relation to age.

Mosquito feeding experiments. Direct skin feeding experiments were successful for 187 individuals (97.4%, 187 of 192); four experiments failed because fewer than 20 mosquitoes survived until Day 7 post feeding (5, 7, 9, and 11 mosquito observations) and one subject was found to be *Plasmodium malariae* infected; this individual did not infect mosquitoes and was excluded from the analyses. Exactly 20 mosquitoes were dissected and examined for the remaining 187 experiments, giving 3,740 mosquito observations. Eighteen experiments (9.4%, 18 of 187) resulted in at least one infected mosquito; 66 mosquitoes (1.8%, 66 of 3740) became infected. The results of the feeding experiment for each age group and

TABLE 2
Infectiousness in relation to age and parasite status

Gametocyte status		Number of experiments	Proportion of individuals infecting ≥ 1 mosquito % (n/N)	Proportion of infected mosquitoes % (n/N)
5-9	Positive	12	25.0 (3/12)	5.0 (12/240)
	Negative	31	6.5 (2/31)	0.3 (2/680)
10-14	Positive	5	80.0 (4/5)	15.0 (15/100)
	Negative	39	5.1 (2/39)	0.6 (5/780)
15-24	Positive	3	66.7 (2/3)	36.7 (22/60)
	Negative	28	0.0 (0/28)	0 (0/500)
25-44	Positive	2	50.0 (1/2)	7.5 (3/40)
	Negative	35	0.0 (0/35)	0 (0/700)
≥45	Positive	3	33.3 (1/3)	3.3 (2/60)
	Negative	29	10.3 (3/29)	0.9 (5/560)
Total		187	9.6 (18/187)	1.8 (66/3740)

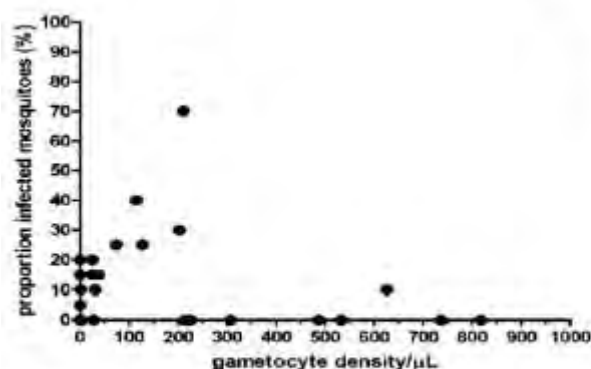


FIGURE 1. The association between microscopy gametocyte density and the proportion of infected mosquitoes. Each dot represents a single experiment from a single individual.

gametocyte-positive and -negative individuals are reported in Table 2 and shows that gametocyte-positive individuals were considerably more likely to infect mosquitoes ($P < 0.001$) and infected more mosquitoes ($P < 0.001$). Of all individuals who were gametocyte positive by microscopy, 44.4% (11 of 25) infected at least one mosquito and 10.8% (54 of 500) of mosquitoes became infected. Of all individuals who were gametocyte negative by microscopy, 4.3% (7 of 162) infected at least one mosquito and 0.4% (12 of 3240) of mosquitoes became infected. In children and adults some individuals who were gametocyte negative by microscopy infected mosquitoes. In our study setting 18.2% (12 of 66) of all mosquito infections was a result of submicroscopic gametocyte carriage. Among the seven individuals who infected mosquitoes despite being gametocyte negative, two were completely slide negative (asexual and sexual parasite slide negative); the remaining five had asexual parasites detected by microscopy but no gametocytes. Although there was a positive correlation between gametocyte density and mosquito infection rates (Figure 1; $r = 0.47$, $P < 0.0001$), the association appeared non-linear and there were a number of individuals with high gametocyte densities that did not infect any mosquitoes.

The human infectious reservoir for malaria. The contribution of different age groups to the human infectious reservoir for malaria was estimated by including demographic data from a recent demographic survey in the study area (Table 3).

The validity of the estimation of malaria transmission from man to mosquito depends on the representativeness of our sample to the total population. We compared the proportions of each age group between this sample and the national census in the study area. There was a significant difference between the demographic profile of the population on which

mosquitoes fed and the demographic profile of the total population in this area. The under-representation of 5–14 age groups and the over 44 age-groups was a result of the absence of some schoolboys far from the village, and some adults working outside the study area and thereby not available for the surveys. When we adjust our estimates of infectiousness to mosquitoes for the contribution of different age groups to the total population, we found that 51.5% of all mosquito infections that resulted from blood sampling on individuals ≥ 5 years of age was a result of children 5–14 years of age. Young adults, 15–24 years of age comprised 17.3% of the village population according to census data and contributed to 33.3% of all mosquito infections. The remaining infected mosquitoes 15.15% (10 of 66) were contributed by those over 24 years of age.

DISCUSSION

In this study, we determined the human infectious reservoir in an area of hypoendemic malaria transmission in Senegal. We observed that 44% of the microscopically detectable gametocyte carriers were capable of infecting *An. gambiae* mosquitoes. Although we did not directly determine gametocyte carriage by molecular methods, we found evidence for subpatent gametocyte carriage: 4.3% of gametocyte-negative individuals were capable of infecting mosquitoes, although with low mosquito infection rates. Adults comprised a considerable proportion of the human infectious reservoir, more than half of all mosquito infections occurred from individuals > 15 years of age.

We performed a xenodiagnostic evaluation of transmission from man to mosquito selecting individuals irrespective of gametocytaemia or parasitaemia.^{13,17,21} Direct feeding of laboratory-bred *An. arabiensis* was performed by using a convenience sampling approach in which families were invited to participate during community meetings and all family members 5 years of age and above were invited to participate in the study. Although there is variation in the manner in which skin feeding is performed, it appears to be a more efficient tool to measure *Plasmodium falciparum* transmission from man to mosquito than the more widely used membrane feeding assays.^{16,22,23} We chose a minimum number of fed mosquitoes per batch to maximize the informativeness of individual feeding experiments.²⁴ Our findings confirm previous findings on a higher likelihood of mosquito infection from microscopically detectable gametocyte densities^{16,24} and a relevant contribution of submicroscopic gametocyte carriers to onward malaria transmission.²⁵ Because of the methodology we used, direct skin feeding, we could not directly determine gametocyte density in the mosquito blood meal. There are indications that

TABLE 3
The contribution of different age groups to the human infectious reservoir in the population

	Proportion in the current study (n)	Proportion of population in a census (%) = (P)	Proportion of individuals attending the study (%) = (A/N)	Proportion of infected mosquitoes % (a/N) = (T)	Relative contribution to the infectious reservoir of individuals ≥ 5 years ²
< 5 years	ND	19.3	ND	ND	ND
5–9	23.0 (43)	17.0	11.6 (5/43)	1.6 (14/860)	19.7%
10–14	23.5 (44)	12.3	13.6 (6/44)	2.3 (20/880)	19.9%
15–24	16.6 (31)	17.3	6.5 (2/31)	3.5 (22/620)	43.7%
25–44	19.8 (37)	20.3	2.7 (1/36)	0.4 (3/740)	5.9%
≥ 45	17.1 (32)	13.8	12.5 (4/32)	1.1 (7/640)	10.8%
Total	(187)	100.0	9.6 (18/187)	1.8 (66/3740)	100%

ND = non-determined; contribution to the infectious reservoir estimated by the census.

gametocyte densities may be higher in the subdermal vasculature compared with venous blood¹⁶ and potentially that there are higher gametocyte densities in the subdermal vasculature compared with finger prick blood samples.²⁸ One may therefore hypothesize that mosquitoes sample gametocytes more efficiently from the subdermal vasculature than microscopy can detect gametocytes in finger prick blood samples that are taken from slightly deeper capillaries. The phenomenon of relatively efficient mosquito transmission from low gametocyte densities has also been reported for membrane feeding assays where gametocytes were detected in the venous blood sample that was offered to mosquitoes¹⁸ and suggests that clustering of gametocytes in the mosquito blood meal²⁶ may contribute to the efficient transmission of malaria at gametocyte densities below the threshold density, which allows gametocyte detection by microscopy.⁶ Specific studies must be carried out to elucidate this long-standing question on gametocyte densities and infectiousness in different blood compartments that may have fundamental consequences for the interpretation of malariometric indices from venous blood or finger prick blood samples.

Shortcomings of our study include the fact that we did not perform a formal random selection of individuals but approached families and recruited all family members who were willing to participate. The most important shortcoming may be that we excluded children < 5 years of age for ethical reasons.²⁷ In our study setting, it was considered unacceptable to include this young age group. Membrane feeding assays may be more acceptable but have a lower sensitivity and form a less natural assessment of infectivity where loss of gametocyte infectiousness caused by handling of venous blood samples cannot be excluded.¹⁶ Our choice for direct skin feeding precluded any statements on the infectiousness of the youngest age group who may have the highest gametocyte densities⁶ and may be particularly infectiousness to mosquitoes and form an important part of the human infectious reservoir. Despite this important limitation, our findings illustrate that adults, in particular young adults 15–24 years of age, contribute considerably to onward malaria transmission. This age group is currently not directly targeted in malaria control interventions in Senegal, and this may limit the impact of current interventions on malaria transmission intensity because a considerable proportion of the human infectious reservoir is neglected. Another shortcoming is our dependence on microscopy. We did not use molecular methods to detect gametocytes that are known to substantially increase the proportion of gametocyte carriers that are detected in a population.⁶ By reading 200 microscopic fields, double the number of fields routinely examined, we have attempted to maximize the sensitivity of microscopy detection. Despite this extensive slide reading, not all infectious individuals were detected. Many authors report that individuals with submicroscopic gametocytes can successfully infect mosquitoes,^{16,20,21,28,29}

and we show that reading 200 microscopic fields does not overcome the limited sensitivity of microscopy for gametocyte detection. Although the limited sensitivity of microscopy to detect infectious individuals is widely accepted, this is not the same as evidence for a contribution of submicroscopic infections to malaria transmission.³⁰ In our setting, the majority of individuals who were infectious to mosquitoes but gametocyte negative by microscopy had asexual parasites detected by microscopy and were therefore not truly subpatent infections. This is important to put our findings in perspective because these submicroscopic gametocyte carriers would have been

detected by conventional diagnostics that detect (asexual) malaria parasites. We observed that two individuals without asexual parasites or gametocytes by microscopy were infectious to mosquitoes, comprising 11% of the total number of infectious individuals. One of these two individuals infected 20% (4 of 20) of the feeding mosquitoes, the other 5% (1 of 20). These individuals will have remained undetected by conventional diagnostics. If such subpatent infections are also found to be infectious in low endemic areas, where subpatent infections are particularly prevalent,³¹ they may form a stumbling block for successful elimination initiatives and may need to be included in malaria interventions to maximize their effect.

In conclusion, our study showed that 10% of all individuals ≥ 5 years of age were infectious to *An. arabiensis* mosquitoes in the peak transmission season in an area of intense malaria transmission. Infectiousness to mosquitoes was not restricted to any age group or to individuals with gametocytes detected by microscopy. We observed successful mosquito infections from individuals without microscopically detectable (asexual) parasites or gametocytes. If the infectiousness of such subpatent infections is confirmed in other settings, notably low endemic settings that aim for malaria elimination, they may fulfill an important role in maintaining malaria transmission and may require inclusion in malaria control and elimination efforts.

Received June 29, 2014. Accepted for publication October 2, 2014.

Published online January 26, 2015.

Acknowledgments: We thank the inhabitants of Anene, Keur Mamour, and Keur Madaro (Thies rural area) for their appreciated collaboration. We are grateful to Moussa Gueye and Maty for their technical assistance. We also thank Kevin Opondo for his assistance in the data analysis.

Financial support: This work was supported by the Institute of Research for Development (IRD).

Authors' addresses: Abdoulaye Gaye and Misa Jawara, Medical Research Council Unit, Banjul, Fajara, The Gambia, E-mails: abgay@mrcc.gm/layegaye@gmail.com and jawaramisa@mrcc.gm; Teun Bouwman, Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; Department of Immunology and Infection, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK, E-mail: Teun.Bouwman@lshtm.ac.uk; Goudiaga Libasse, Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme, Dakar-Fann, Sénégal, E-mail: lgadiou@gmail.com; Mamadou O. Ndiath, Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine, E-mail: oussmane.ndiath@gmail.com; Lassana Konaté and Ousmane Faye, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Département de Biologie Animale, Dakar, Senegal, E-mails: konatela@yahoo.fr and jogomaye@yahoo.fr; Cheikh Sokhna, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR 198, Campus UCAD – IRD, Dakar, Senegal, E-mail: cheikh.sokhna@ird.fr.

REFERENCES

1. RTS,S Clinical Trials Partnership. 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 367: 2284–2295.
2. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW. 2010. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med* 7: e100029.
3. Murray JC, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379: 413–31.
4. Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J, Dieye-Ba F, Roucher C, Bouganali C, Badiane A, Sarr JD, Mazenot C, Touré-Baldé A, Raoult D, Drulhe P, Mercereau-Pujalon O, Rogier C, Sokhna C. 2011. Malaria morbidity and pyrethroid

- resistance after the introduction of insecticide-treated bed nets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis* 11: 925–932.
5. Thiam S, Thior M, Faye B, Ndiop M, Diouf ML, Diouf MB, Diallo I, Fall FB, Ndiaye JL, Albertini A, Lee E, Jorgensen P, Gaye O, Bell D. 2011. Major reduction in anti-malarial drug consumption in Senegal after nation-wide introduction of malaria rapid diagnostic tests. *PLoS ONE* 6: e18419.
 6. Bousema T, Drakeley C. 2011. Vivax gametocytes in relation to malaria *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium* epidemiology and infectivity of control and elimination. *Clin Microbiol Rev* 24: 377.
 7. MacDonald G. 1957. *The Epidemiology and Control of Malaria*. London: Oxford University Press.
 8. Garrett-Jones C, Shidrawi GR. 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. *Bull World Health Organ* 40: 531–545.
 9. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, Tatem AJ, Hay SI. 2011. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria Journal*. doi:10.1186/1475-2875. Available at: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/378>.
 10. Tusting LS, Bousema T, Smith DL, Drakeley C. 2014. Measuring changes in *Plasmodium falciparum* transmission: precision, accuracy and costs of metrics. *Parasitol* 84: 151–208.
 11. Muirhead-Thomson R. 1957. The malaria infectivity of an African village population to mosquitoes (*A. gambiae*): a random xenodiagnostic survey. *Am J Trop Med Hyg* 6: 971–979.
 12. Graves PM, Burkot TR, Carter R, Cattani JA, Lagog M, Parker J, Brabin BJ, Gibson FD, Bradley DJ, Alpers MP. 1988. Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang Area, Papua, New Guinea. *Parasitology* 96(Pt 2): 251–263.
 13. Githeko AK, Brandling-Bennett AD, Beier MS, Atieli F, Owaga M, Collins FH. 1992. The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 355–358.
 14. Boudin C, Bonnet S, Tchoukankam T, Gouagna LC, Goumoue R, Manga L. 1998. Levels of malaria transmission: methods and parameters. *Med Trop (Mars)* 58: 69–75 (French).
 15. Drakeley CJ, Akim NI, Sauerwein RW, Greenwood BM, Targell GA. 2000. Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 472–476.
 16. Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW, Smith DL, Churcher TS, Takken W, Ghani A, Drakeley C, Goding R. 2012. Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination. *PLoS Med* 9: e1001165.
 17. Boudin C, Olivier M, Molez JF, Chiron JP, Ambroise-Thomas P. 1993. High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 48: 700–706.
 18. Churcher TS, Bousema T, Walker M, Drakeley C, Schneider P, Lin Ouedraogo A, Basañez M-G. 2013. *Predicting Mosquito Infection from Plasmodium falciparum Gametocyte Density and Estimating the Reservoir of Infection*. Available at: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00626>.
 19. Robert V, Dieng H, Louchouart L, Traoré SF, Trape J-F, Simondon V, Fontemille D. 1998. La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Sénégal. *Trop Med Int Health* 3: 667–677.
 20. Bonnet S, Gouagna LC, Paul RE, Safeukui I, Meunier J-Y, Boudin C. 2003. Estimation of malaria transmission from humans to mosquitoes in two neighbouring villages in south Cameroon: evaluation and comparison of several indices. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 53–59.
 21. Muirhead-Thomson RC. 1954. Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48: 208–225.
 22. Bonnet S, Gouagna C, Safeukui I, Meunier J-Y, Boudin C. 2000. Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate infectiousness of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 103–106.
 23. Diallo M, Touré AM, Traoré SF, Niare O, Kassambara L, Konaré A, Coulibaly M, Bagayogo M, Belier JC, Sakai RK, Touré YT, Doumbo OK. 2008. Evaluation and optimization of membrane feeding compared to direct feeding as an assay for infectivity. *Malar J* 7: 248.
 24. Churcher TS, Bhagborough AM, Delves M, Ramakrishnan C, Kapulu MC, Williams AR, Biswas S, Da DF, Cohuet A, Sinden RE. 2012. Measuring the blockade of malaria transmission: an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int J Parasitol* 42: 1037–1044.
 25. Chardome, Janssen PJ. 1952. Inquiry on malarial incidence by the dermal method in the region of Lubulash, Belgian Congo. *Annales de la Société belge de médecine tropicale* 32: 209–211.
 26. Pichon G, Awono-ambene HP, Robert V. 2000. High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the blood meal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology* 121: 115–120.
 27. Bousema T, Churcher TS, Morlais I, Dinglasan RR. 2013. Can field-based mosquito feeding assays be used for evaluating transmission-blocking interventions? *Trends Parasitol* 29: 53–59.
 28. Pethica A, Prajakwong S, Suwonkerd W, Corthong B, Webber R, Curtis C. 2004. Infectious reservoir of *Plasmodium* infection in Mae Hong Son Province, north-west Thailand. *Malar J* 3: 34.
 29. Schneider P, Bousema T, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA, Sauerwein RW. 2007. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg* 76: 470–474.
 30. Lin JT, Saunders DL, Meslinick SR. 2014. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol* 30: 183–190.
 31. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouedraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. 2012. Factors determining the occurrence of sub-microscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun* 3: 1237.

Thèse de Doctorat, Spécialité : Entomologie

Nom et Prénom : Abdoulaye Gaye

Titre de la thèse : Interaction entre transmission, morbidité et facteurs naturels inhibant le cycle sporogonique de *plasmodium falciparum*, dans une zone hypoendémique du Sénégal

Date de soutenance : 2 Août 2016

Résumé : Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), le paludisme reste encore l'infection parasitaire humaine la plus répandue dans le monde. Pour définir les différents aspects de cette maladie, on se sert habituellement d'un certain nombre de paramètres épidémiométriques. Dans notre zone d'étude, la transmission est hypoendémique, la morbidité varie de 0,1 à 0,3 accès palustres par an. Le niveau de la chimiorésistance est non négligeable pour la sulfadoxine-pyriméthamine (4,7%). Le suivi post-thérapeutique des fortes charges parasitaires asymptomatiques ou des accès palustres nous a permis de mettre en évidence une poussée gamétocytaire chez 58,3% des sujets traités par la sulfadoxine-pyriméthamine et ceci en dehors de toute résistance au médicament.

Par ailleurs, les sujets vivant en zone d'endémie, acquièrent différents types d'immunités dont la Transmission blocking immunity (TBI). Celle-ci est une forme naturelle d'immunité palustre sexuée. Elle est évaluée expérimentalement en utilisant des moustiques d'élevage par le biais de sang infecté de gamétocytes. La TRA a été mesurée et a montré que 43,7% des sujets testés sont capables d'inhiber le développement du plasmodium chez le moustique. Dans le même ordre d'idée, les infections post-thérapeutiques des moustiques pour la sulfadoxine-pyriméthamine ont engendré que plus de 46,1% des porteurs de gamétocytes étaient infectants pour les moustiques.

En dehors des études sur la parasitemie, la morbidité et la gamétocytemie, notre étude a aussi abordé la problématique de l'infectivité d'une population humaine pour les moustiques en utilisant une technique d'infection directe sur la peau. Elle a montré que 9,6% des sujets de l'échantillon testé sont infectants pour les moustiques. Une attention particulière est réservée aux adultes âgés de 15-24 ans qui ont contribué à eux seuls à 43,7% du réservoir infectant les moustiques.

Mots-clés : Interaction – Facteurs naturels – Inhibition -Transmission – *Plasmodium falciparum* – *Anopheles gambiae* – *Anopheles arabiensis* - Sénégal

PhD, Speciality: Entomology

Name and First Name: Abdoulaye Gaye

Thesis title: Interaction between transmission, morbidity and natural factors inhibiting sporogonic cycle of *plasmodium falciparum* in hypo-endemic area of Senegal

Defense date: 2nd August, 2016

Summary : According to the World Health Organization (WHO), malaria is still the most common human parasitic infection in the world. In our area, malaria transmission is hypoendemic. Morbidity varies from 0.1 to 0.3 malaria episodes per year. The level of drug resistance to sulfadoxine-pyriméthamine is not significant (4.7%). The monitoring of asymptomatic subjects post treatment with high parasitemia or malaria cases, has allowed us to identify the main risk factors for gametocytogenesis. Our samples have shown that, gametocytes appear in 58.3% of subjects treated with sulfadoxine-pyriméthamine and these are not drug resistance cases. People who live in malaria endemic areas, acquire different types of immunities, including Transmission Reducing Activity (TRA). This is a special form of acquired immunity. It can be assessed by infecting mosquitoes with blood from a gametocyte carrier. The TRA was measured and showed that 43.7% of the subjects tested are able to inhibit the development of Plasmodium in the mosquito. In the same experiments, infectiousness of subjects after treatment with sulfadoxine pyriméthamine, have shown that 46.1% of gametocyte carriers were infectious to the anopheles mosquito.

Our work also involves studies of parasitaemia, morbidity and gametocytaemia, where we are also interested in infectiousness of human population to mosquitoes using a technique of direct skin feeding to infect mosquitoes. Our work has shown that 9.6% of the subjects tested were infectious to the mosquitoes. A particular attention should be paid for the age groups 15-24 years, who alone were responsible for 43.7% of infection in the mosquitoes within the cohort.

Keywords: Interaction - Natural Factors - Inhibiting – Transmission - *Plasmodium falciparum* - *Anopheles gambiae* – *Anopheles arabiensis* - Senegal