

Ministère de l'Education
Nationale

REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

Université des Sciences, des Techniques
Et des Technologie de Bamako (U.S.T.T.B.)
Faculté de Pharmacie (FA.PH)



Année universitaire 2018-2019

N°.....

TITRE

Etude de l'efficacité et de la variabilité des anticorps monoclonaux dans l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles coluzzii* en zone d'endémie palustre de Nanguilabougou.

THESE

Présentée et soutenue publiquement le.../... / 2019 devant le jury de la Faculté de Pharmacie

Par : Mlle Diarrahou DIARRA :

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président du jury :	Pr. Amagana	DOLO
Membre :	Pr. Mahamadou	DIAKITE
Membre :	Dr. Merepen dite Agnès	GUINDO
Co-directeur :	Pr. Mouctar	DIALLO
Directeur de thèse :	Pr. Djibril	SANGARE

DEDICACES ET REMERCIEMENT

Je dédie ce travail ;

A ALLAH, le Tout Puissant, le Très Miséricordieux, toutes les louanges t'appartiennent.

Je rends grâce à Allah, de m'avoir donné la vie, de ceux que vous n'aviez accordé tout au long de ces années écoulées, la force, le courage, la patience et la santé nécessaire pour accomplir ce travail. Je vous prie seigneur d'accepter ce modeste travail en témoignage de la reconnaissance et de ma foi.

Au Prophète Mohamed et ses Khalifes

(Paix et salut sur Eux)

A la mémoire de mon Père Moussa DIARRA :

Papa, je voudrais tant que tu sois à mes coté mais héla Dieu a décidé autrement, les mots me manquent ici pour t'exprimer ma profonde gratitude. Si j'en suis la aujourd'hui c'est bien grâce à toi .Tu nous as appris le sens de l'honneur, la dignité, de la générosité et très tôt tu nous as inculqué le culte de l'excellence et du respect des valeurs morale. Ce travail est le témoignage de tous les sacrifices que tu as consentis. Puisse ce travail m'offrir l'occasion de me rendre digne de tes conseils, de ton estime et de ta confiance.

Puisse Dieu, Le Tout Puissant, assurer le repos éternel de ton âme par sa sainte miséricorde !

Je te dédie ces expressions pour te témoigner mes affections filiales. DORT EN PAIX PAPA

A ma mère Fatoumata FOFANA :

Maman, je ne trouve pas de mots qui pourront me satisfaire pour t'exprimer mes sentiments. Les mots ne me suffiront jamais pour te qualifier et exprimer ce que tu représentes et continuera de représenter pour moi. Tu as été pour nous une mère exemplaire.

Ton affection, tes conseils et ton dévouement pour la réussite de tes enfants n'ont jamais fait défaut.

Je prie le Tout Puissant pour que tes souffrances endurées ne soient pas vaines et qu'il te prête longue vie et une santé de fer que tu puisses continuer à nous consoler comme tu l'as toujours fait. Ce travail est le fruit de ta bravoure.

Mère que tes attentes puissent être comblées Amin !

A ma deuxième mère Aminata Mary TRAORE :

Merci maman de me montre le chemin de la bonté, de la responsabilité et du respect. Les mots me manquent pour vous gratifié la profonde reconnaissance. Je te dédie ce travail, comme preuve de respect, de gratitude, et de reconnaissance. Je souhaite qu'ALLAH nous accorde une longue vie et nous permette à nous tes enfants de te rendre toujours plus fière de nous

A la mémoire :

Bakary Diarra, Bamakoro Diarra, Monzon Diarra, Souleymane Diarra, Mariétou Diarra, Hawa Diarra, Founé Toumagnon et Souleymane Fofana

J'aurais bien voulu que vous soyez parmi nous en ce jour mémorable. Que la clémence de Dieu règne sur vous et que sa miséricorde apaise votre âme.

A madame DIALLO Assétou DIARRA :

Ce fut très difficile, mais sache que l'honneur de ce travail vous revient, il ne suffit certes pas d'apaiser les souffrances endurées, puisse-t-il cependant vous donner réconfort et fierté mais aussi le témoignage de ma très grande profonde reconnaissance.

Merci pour tous !! Que dieu vous pardonne d'ici-bas qu'à l'au-delà et que l'avenir soit pour vous satisfaction et soulagement.

A mon homonyme Diarrahou DIARRA :

Merci de m'avoir guidé, conseillé durant tout au long de mes études.

Puisse Dieu te grader longtemps encore dans la santé parmi nous pour goûter au fruit de ton labeur.

A « mes oncles et tantes »

C'est avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ces efforts à mes très chers, respectueux oncles et tantes qui n'ont soutenu au cours de mes longues années études.

A « mes frères /sœurs et belles sœurs/ beaux-frères »

Mariam DIARRA, Rokiatou DIARRA, Mamadou Lamine DIARRA, Mamadou DIARRA, Dramane DIARRA, Bakary DIARRA, Ramata HAIDARA, Fatoumata COULIBALY, Zoumana KONE, Bakoroba TRAORE, Pape Hamadou DIALLO, Dr Ismaël KOUMA.

Vous n'avez pas manqué de m'entourer de la chaleur familiale nécessaire durant es longues années d'études. Aucun mot n'exprimera assez ma reconnaissance.

Puisse Dieu tout puissant jouir votre vie, vous combler d'avantage, vous apporter bonheur, et vous aider à réaliser tous vos vœux.

Ce modeste ouvrage est le vôtre, Puisse l'amour et la fraternité nous unir à jamais.

A « mes amis(es) »

Dr Asseitou MAIGA, Hawa SIDIBE, Mariam TRAORE, Fanta SANOGO, Edith DEMBELE, Dr Assetou SOGORE, Boubacar KEITA, Fatoumata TRAORE, Moussa DIALLO, Dr Adama COULIBALY, Aminata MAIGA, Bakary TRAORE, Mariam SOW, Adama OUTTARA ;

Grace à vous je crois en l'amitié. Soyez rassurez de ma profonde sympathie.

Je dédie cette thèse au Feu **Pr OGOBARA DOUMBO** pour qui j'ai beaucoup de considération et à qui je veux ressembler, merci pour votre travail bien fait. Que votre âme repose en paix !

A toutes les victimes du paludisme et particulièrement ceux d'Afrique.

Je remercie ALLAH, l'Omnipotent, le Miséricordieux de nous avoir montré ce jour si importante de ma vie ; son Prophète Mohammed (PSL) et j'adresse mes sincère remerciement. Qu'il affermisse d'avantage mes pas pour le reste de mon existence. Amen !

Je remercie très sincèrement toutes les personnes de bonne volonté qui de près ou de loin ont contribué tant soit à la réalisation de ce travail.

A tous les corps professoraux de la Faculté de Pharmacie et la Faculté de Médecine et Odontostomatologie pour la qualité de leurs enseignements.

Au professeur DOUMBO Safiatou NIARE ;

Au personnel de l'officine Zanga COULIBALY de Magnabougou ;

Au personnel du Maprophar ; Dr Omou BORE

Au personnel de l'INSRP ; Dr Guindo

Au personnel du Centre de Référence de Kalaban Coro ;

Au personnel du Laboratoire et Pharmacie du CHU Gabriel Touré ;

A toute la promotion N'golo DIARRA ;

A mes confrères et consœurs médecins.

A Dr Maria Cécile DEMBELE

Votre simplicité, votre esprit critique, notre humanisme font de vous un maître stagiaire exemplaire. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse Amen !

A Dr Ramata MARIKO / Dr Mariam DOUMBIA:

Notre simplicité, votre abord facile, votre disponibilité, votre humanisme, votre sourire font de vous des maîtres formateurs exemplaires. Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de l'affection que je vous porte. Que Dieu vous bénisse, et vous accompagne dans vos taches de tous les jours. Amin !

Je remercie très sincèrement tous les personnels du **laboratoire MTRC**, principalement

Le Professeur **Djibril SANGARE** et Professeur **Mouctar DIALLO** pour votre abord facile, votre simplicité, merci pour l'opportunité qu'il m'accorde pour d'accomplir ce travail autour de ce thème à qui je suis passionné.

Au partenariat pour leur participation financière et matérielle.

A l'équipe d'entomologie :

Adama SACKO, Boubacar COULIBALY, Assétou DIARRA

Vous avez toujours répondu présent quand j'avais besoin de vous. C'est le lieu de vous remercier pour tout ce qui vous avez déployé comme efforts en ma faveur et professionnalisme.

A l'équipe parasitologie :

Merci pour votre disponibilité, de ma grande reconnaissance pour les sacrifices consentis pour nous.

Aux populations de Nanguilabougou et son hameau Kouroubougou

Sincère remerciement et toute notre reconnaissance à l'encontre de la population et principalement notre population d'étude qui sont les enfants pour leur participation et leur générosité.

Merci pour tous !!!!!

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître président du jury :

Professeur agrégé Amagana DOLO

- **Professeur de parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH)**
- **Directeur de l'Ecole Doctorale des Science et Technique du Mali (EDSTM)**
- **Chercheur au DEAP/MRTC**

Cher Maître, Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Notre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre disponibilité, votre humilité et votre souci du travail bien fait font de vous un maître respectable et admiré. Soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

A notre maître membre du jury

Professeur Mahamadou DIAKITE

- **PhD en immunogénétique**
- **Responsable du laboratoire immunogénétique et parasitologie MRTC**
- **Maître de conférences à la FAPH**
- **Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique**
- **Secrétaire permanent du Comité d'Ethique FMOS/FAPH.**

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté être membre du jury malgré vos multiples occupations témoigne de l'immense honneur que vous nous faites.

Votre attachement au travail scientifique, vos qualités hautement intellectuelles et votre sens de l'effort font de vous un modèle de maître à suivre. C'est l'occasion ici de vous dire infiniment merci et croyez en notre reconnaissance.

A notre maître membre du jury

Docteur Merepen dite Agnès GUINDO

- **Responsable du laboratoire clinique du MRTC**
- **Assistante /Attache à la recherche en immunologie**

Cher maître en Acceptant d'Apprécier ce Modeste Travail vous Contribuer à son indispensable amélioration. Votre simplicité et votre sens aigu du travail bien accompli font de vous un maître respectable. Cher maître soyez rassuré de notre profonde gratitude.

A notre maître et co-directeur de thèse

Professeur Mouctar DIALLO

- **Professeur en Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH)**
- **Chef de DER des sciences Fondamentale à la FAPH**
- **Enseignant Chercheur à la FAPH**
- **Président de l'Association des Techniciens Biologistes de laboratoire de Bamako.**

Cher maître, nous avons apprécié nos qualités humaines, scientifiques et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un maître respectable et admiré. Nous sommes très fier d'être parmi vos élevés. Soyez rassurés, cher maître de notre profonde gratitude et de notre sincère remerciement.

A notre maître et Directeur de thèse :

Professeur Djibril SANGARE

- **PhD en Parasitologie Entomologie Médicale,**
- **PhD en génétique moléculaire des vecteurs du paludisme**
- **Chercheur à MRTC**
- **Président de l'association malienne de biosûreté et de biosécurité.**

Cher maître, vos critiques et suggestions ont été d'un apport inestimable pour la réalisation de ce document. Nous apprécions vos qualités humaines et scientifiques tout au long de ce travail. Votre sens élevé du travail bien fait, votre disponibilité constante et surtout votre patience font de vous un maître respectable et admiré. Trouvez ici toute notre admiration ainsi que notre profond respect.

LISTE LES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyrinucléase

ANOFEL : Association française des enseignants de parasitologie et mycologie

An. : Anopheles

AP : Autogolous Plasma

BTi : Bacillus thurigiensis israelensis

CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

CPS : protéine majeure de surface du sporozoïtes

DMFA: Direct Membrane Feeding Assay

DSF: Direct Skin Membrane

FAPH: Faculté de Pharmacie

FMOS: Faculté de Médecine et D'onto-Stomatologie

EIPM : Enquête sur les Indicateurs du Paludisme

GE : Goutte Epaisse

GIS : Geographical information system

L1, L2, L3, L4 : stades larvaires (larve de stade 1, 2, 3, 4)

M : forme moléculaire M

MP : Matrice Péritrophique

MI : millimètre

µg : microgramme

µg : microlitre

MRTC: Malaria Research and Training Center

NV: Nom Vernaculaire

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

Pfs25 : protéine de surface de 25 KDa

Pfs48/45 : combinaison de protéines de surface de 48 KDa et 45 KDa

Pfs230 : protéine surface de 230

PNLP : Programme National de Lutte Contre le Paludisme

% : pourcentage

SLIS : Système Local d'Information Sanitaire

S : forme moléculaire S

SR : Sérum replacement

s.l : sens large

s.s: sens strict

TBV : Vaccin de Blocage de la Transmission

TNF: Tumor Necrosis Factor

VIH: Virus Immunodéficience humain

WB: Whole Blood

WBC: nombre de Globules Blancs.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition de la population étude selon le groupe d'âge.....	61
Tableau 2 : Répartition de la population d'étude selon le sexe.....	61
Tableau 3 : Répartition des sujets retenus pour l'infestation expérimentale selon le groupe d'âge.....	63
Tableau 4 : Répartition des sujets retenus pour l'infestation expérimentale selon le sexe.....	63
Tableau 5 : Répartition des porteurs de gamétocytes selon le Poids.....	64
Tableau 6 : Répartition des porteurs de gamétocytes selon fonction de leurs charges gamétocytique.....	64
Tableau 7 : Infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques en fonction du groupe d'âge.....	64
Tableau 8 : Infectivité des porteurs de gamétocytes en fonction de la charge gamétocytique.....	65
Tableau 9 : Infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques selon le Poids.....	65
Tableau 10 : Taux d'engorgement des moustiques par passage.....	66
Tableau 11 : Taux de survie des moustiques au huitième jour de l'infestation.....	66
Tableau 12 : variation des taux d'infection par passage.....	67
Tableau 13 : Pourcentage des moustiques positifs en oocystes par Ac monoclonal.....	67
Tableau 14 : Pourcentage de moustiques positifs en oocystes en absence d'Ac monoclonaux.....	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Stade évolutifs de <i>Plasmodium falciparum</i>	7
Figure 2 : Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	11
Figure 3 : Cycle biologique d'un Anophelinae	14
Figure 4 : <i>Anopheles gambiae</i> lors de la prise de sang.....	15
Figure 5 : Schémas d'un gamète mâle (bleu) et d'un gamète femelle (Rose) de <i>P.falciparum</i>	17
Figure 6 : Carte du Mali indiquant le site d'étude (Nanguilabougou).....	42
Figure 7 : La classification de la splénomégalie de Hackett.....	48
Figure 8 : Conservation des moustiques sur le terrain avec serpillière et sans serpillière.....	53
Figure 9 : Conservation des moustiques sur le terrain (avec les serpillières).....	53
Figure 10 : Gorgement des moustiques.....	57
Figure 11 : Variation des indices paludométriques dans la population d'étude par passage.....	62
Figure 12 : Variations du nombre d'oocystes par passage.....	69

Tables des matières :

1. Introduction	1
1.1 Hypothèse.....	4
2. Objectifs	5
2.1 Objectif générale.....	5
2.2 Objectif spécifique.....	5
3. Généralités	6
4. Les gamétocytes	17
5. Généralités sur l'infestation expérimental	37
6. Méthodologie	40
7. Procédure et méthode l'infestation expérimentale	54
8. Résultats	60
9. Commentaire et Discussions	70
10. Conclusion	74
11. Recommandation	75
12. Références	76
13. Résumé	81
ANNEXES	84

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire et potentiellement mortelle, due à un hématozoaire du genre plasmodium. Ce parasite est principalement transmis à l'homme par la piqûre infectante de moustique femelle du genre anopheles lors de son repas sanguin ; contre laquelle il n'existe pas encore de vaccin efficace. Il existe autres modes de transmissions : la transmissions sanguine et par voie Trans-placentaire (de la mère au fœtus) [1]. Le paludisme est essentiellement dû à quatre espèces plasmodiales : *P .falciparum* (welch 1897), *P. malariae* (Lavena 1881) *P. ovale* (stephans1922) *P .vivax* (Grassi et Faletti 1890) ; aujourd'hui une cinquième espèce a été d'écrite, il s'agit *Plasmodium knowlesi* (Servonnet et al 2012).

Malgré d'énormes progrès réalisés dans la lutte contre le paludisme il demeure un problème majeur de santé publique car il est responsable de nombreux cas de morbidités et de mortalités surtout chez les enfants moins de 5 ans et les femmes enceintes à travers le monde (OMS) . L'organisation mondiale de la santé (OMS), dans son rapport annuel a publié en 2018, d'avoir enregistré en 2017,219 millions de cas de paludisme et 435000 cas de décès (OMS 2018). L'Afrique subsaharienne est la zone la plus touchée avec 92% de cas de paludisme et 93% de cas décès [1].

En 2017, environ 3,1 milliards de dollars américains ont été investis dans les efforts de contrôle et d'élimination du paludisme gouvernements des pays d'endémie palustre et des partenaires internationaux (OMS 2018).

Au Mali le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les formations sanitaires (EIPM 2015). En plus du fardeau humain, le paludisme affecte fortement l'économie nationale car c'est une principale cause d'absentéisme professionnel et scolaire qu'entrave le développement social. En effet, les pertes économiques dues au paludisme sont estimées à 72 milliards par ans [2].

Les stratégies de lutte contre le paludisme appliquées par ce programme s'inspirent fortement des stratégies mondiales de lutte contre le paludisme grave, (i) la quinine pour la prise en charge des cas de paludisme grave, (ii) les combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine (CTA) en comprimé pour le traitement du paludisme simple (Artesunate-amodiaquine et Artémether-luméfantetrine), (iii) utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides par les femmes enceintes et les enfants moins de 5ans , (iv) le traitement préventif intermittent à base de sulfadoxine-pyriméthamine chez la femme enceinte , (v) la pulvérisation intra-domiciliaire sera généralisée dans les zones de l'épidémie du paludisme.

Malgré ces différentes stratégies de luttes au niveau national le paludisme reste un problème majeur de santé publique.

L'accroissement de la résistance des parasites aux médicaments antipaludiques, la difficulté à adopter et à mettre en œuvre une chimio-prévention suffisante, une couverture large en moustiquaires imprégnées et résistance accrue des moustiques aux insecticides nécessitent la mise au point de nouvelles approches de lutte en vue d'aboutir à une élimination et une éventuelle éradication du paludisme dans les pays où le paludisme reste d'endémique.

L'une des approches nouvelles est le développement des vaccins antipaludiques qui doivent venir compléter l'arsenal d'outils disponibles et y occuper une place importante. Parmi ces vaccins, figurent les vaccins bloquant la transmission (TBV) du parasite de l'hôte humain au moustique : ces vaccins induisent des anticorps qui empêchent la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique.

A la surface de *P. falciparum* au stade sexuel sont exprimés les antigènes Pfs25, Pfs48/45. Ces antigènes ont montré une activité de blocage du développement du parasite. Ces candidats vaccins peuvent être une stratégie réalisable pour réduire le fardeau du paludisme dans la zone endémique [3] avec une large couverture, ces vaccins pourraient réduire la transmission du paludisme dans les régions d'endémie en réduisant les nombres de moustiques infectants [4]. Comme méthodes d'élaboration de ces vaccins, l'infection expérimentale des anophèles par les plasmodies serait la meilleure méthode car il s'agit d'un outil mis au point pour étudier les facteurs qui déterminent la transmission être humain-vecteur du parasite [5]. Deux types de technique sont couramment utilisés pour détecter l'activité de blocage de la transmission : le gorgement direct sur la peau du porteur de gamétocyte appelé direct skin feeling (**DSF**) et le gorgement direct à travers une membrane ou direct membrane feeding assay (**DMFA**).

1.1 Hypothèse :

- Le pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* a un effet sur l'infection des *Anopheles coluzzii*.
- les anticorps Pfs48/45 et Pfs25 à différentes concentrations ont une différente activité de blocage des stades sexuels chez *Anopheles coluzzii*.

Pour atteindre ces résultats les objectifs suivants ont fixé :

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif générale :

Déterminer l'efficacité et la variabilité des anticorps monoclonaux Pfs25 et Pfs48/45 dans l'infection chez *Anopheles coluzzii* en zone d'endémie palustre de Nanguilabougou.

2.2 Objectifs spécifiques :

- Etudier les indices parasitologiques et cliniques chez les enfants de 5 à 15 ans dans le village de Nanguilabougou et son hameaux Kouroubabougou
- Evaluer le taux de gorgement d'*An.coluzzii* chez les porteurs de gamétocytes;
- Estimer l'impact de différentes concentrations des anticorps monoclonaux Pfs25 et Pfs48/45 sur l'infection d'*An.coluzzii* au cours des séances de l'infestation expérimentale.

3. GENERALITES

Le paludisme (malaria en anglais) est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* se transmet par la piqûre infectante du moustique femelle du genre *Anopheles* ; donc la transmission est complexe et fait intervenir trois (3) organismes : le parasite (*Plasmodium*) ; l'hôte vertèbre (Homme ou animal) ; le moustique vecteur (*Anopheles*). Les facteurs environnementaux avec ses composantes : biologiques, physiques, climatiques et humaines ont une large interaction avec ces trois éléments [6]. Les mesures de lutte préconisées par l'OMS sont de deux ordres : les mesures curatives basées sur la prise en charge rapide et correcte des cas du paludisme et les mesures préventives utilisant la chimioprophylaxie et la lutte anti vectorielle. Ces dernières années il y a un accent d'intérêt sur la lutte anti-vectorielle car elle permet d'une part d'éviter le contact l'homme vecteur et d'autre part de combattre le vecteur par des moyens appropriés afin de diminuer la transmission de la maladie [1].

2.3 Le parasite :

L'agent causal du paludisme est un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Les plasmodies sont des parasites intracellulaires obligatoires, ils envahissent les hématies et produisent un pigment [7].

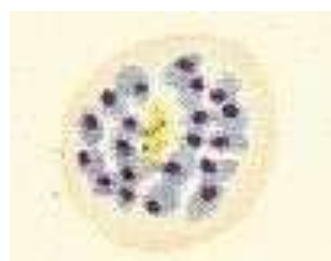
2.3.1 Morphologie :

Le *Plasmodium* est un protozoaire de très petite taille (1 à 2 μ selon les formes).

La coloration au May-Grunwald-Giemsa montre qu'il est formé d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire, et contenant un noyau rouge et de l'hémozoïne (pigment brun doré ou noir). L'illustration ci-dessous présente quelques stades évolutifs de *P.falciparum* [8].



Trophozoïte



Schizonte mur

Figure1 : stades évolutifs du *Plasmodium falciparum*

(<http://www.rph.wa.gov.au/malaria/falcip.gif> mai2010)

Il existe de très nombreuses espèces de plasmodium (plus de 140), touchant diverses espèces animales mais seulement cinq de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Ces cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par la capacité à développer des résistances aux antipaludiques [6]

Plasmodium falciparum : est le plus fréquent et le plus dangereux. Dans les régions subtropicales ; il ne survient qu'en période chaude et humide. Son incubation est de 7 à 12 jours ; il est responsable de la fièvre tierce bénigne et les formes cliniques graves notamment le neuropaludisme, potentiellement mortelles ; il développe des résistances aux antipaludiques, sa longévité est inférieure à 1 an [6].

Plasmodium vivax et *plasmodium ovale* : ils sont très proches. Ils ont été longtemps confondus et sont responsables de fièvre tierce bénigne. Il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. L'incubation est de 11 à 13 jours mais peut observer des rechutes tardives de cinq ans pour *P. vivax* [6]

P. ovale : sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'Ouest, son incubation est de 15 jours au minimum mais peut-être beaucoup plus longue, jusqu'à quatre ans. Schématiquement on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce n'existe [6].

Plasmodium malariae : il est présent de manière beaucoup plus sporadique. Période incubation plus longue (15 à 21 jours). Il est responsable de fièvre quarte parfois néphropathie chronique. Sa longévité est de 3 ans et peut atteindre 20 ans [6].

Plasmodium knowlesi : il sévit en Asie du sud-Est, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des signes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'homme et de singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec fortes parasitémie. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce [6].

3.1.2 Systématique du parasite :

Règne : *animal* ;

Phylum : *Apicomplexa* ;

Classe : *Sporozoea* ;

Sous-classe : *Coccidie* ;

Ordre : *Eucoccidiida* ;

Sous-ordre : *Haemosporiina*

Famille : *Plasmodiidae* ;

Genre : *Plasmodium* ;

Espèces : *P.falciparum* ; *P. ovale* ; *P.vivax* ; *P.malariae* ; *P. knowlesi* chez l'homme, autre plasmodia infestant les animaux : *P.berghei* (rongeurs) ; *P.cynomolgi* (singes) [8].

3.1.3 Cycle évolutif du parasite :

Le cycle évolutif du *Plasmodium* est hétéroxène et relativement complexe, il se déroule successivement chez l'homme : une phase asexuée (schizogonie) qui se déroule chez l'hôte vertébré (homme=hôte intermédiaire) et une phase sexuée (sporogonie) chez l'insecte vecteur (moustique=l'hôte définitif) et un environnement propice. Chez l'homme le cycle est lui-même divisé en 2 phases :

-la phase hépatique ou pré-érythrocytaire (exo-érythrocytaire) : elle correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique.

-la phase sanguine ou érythrocytaire : elle correspond à la phase clinique de la maladie [6].

3.1.3.1 chez l'homme : schizogonie ou phase asexuée

La phase pré-érythrocytaire : après la piqûre infectante de l'anophele femelle lors de son repas sanguin, les sporozoïtes injectés regagnent les hépatocytes ou ils se multiplient et se transforment en schizontes de 30 à 70 μm ou corps bleus (formes multi nucléées). L'éclatement des schizontes murs peuvent contenir 10.000 à 30.000 noyaux autour desquels s'individualisent des fragments de cytoplasme aboutissant à la formation des mérozoïtes de 1^{ère} génération qui sont libérés dans la circulation sanguine par éclatement des hépatocytes infectés. Cependant, en cas d'infection par *P.vivax* ou *P.ovale* certains sporozoïtes intra-hépatique restent quiescent (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée, qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas dans l'infection à *P.falciparum* (pas de rechute) et ils n'ont pas été mis en évidence non plus dans l'infection à *P.malariae*, malgré l'existence de rechutes tardives, ni semble-t-il pour *P. knowlesi* [6].

La phase érythrocytaire : les mérozoïtes de 1^{ère} génération doivent rapidement pénétrer à l'intérieur des globules rouges, pour se transformer en Trophozoïte. Les Trophozoïtes augmentent de taille et se multiplient pour donner des schizontes prend 24, 48, ou 72 heures (en fonction de l'espèce) contenant à maturité 8 à 32 mérozoïtes selon l'espèce. Après leur libération par éclatement du schizontes, les mérozoïtes de 2^{ème} génération peuvent pénétrer dans de nouveaux globules rouges et recommencer le cycle de réplication. Cette partie correspond à la phase clinique : la parasitémie s'élève [6]. Tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique, toutes les 24 heures (pour *P. knowlesi*), 48 heures (fièvre tierce de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*) ou toutes les 72 heures (fièvre quarte de *P. malariae*). En pratique on observe que la fièvre de tierce due à *P. falciparum* est rarement synchronique [7].

Après un ou certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jour, accompagnée d'une différenciation sexuée : les gamétocytes mâles et femelles leur développement est bloqué et la suite de l'évolution exige le passage par l'anophele [6].

3.1.3.2 Chez l'anophele : la sporogonie ou phase sexuée

C'est la phase de la reproduction sexuée les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, se transforment en gamètes mâles et femelles. Le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète ; chez le gamétocyte mâle, la microgamétogenèse ou ex-flagellation est le plus lente : le noyau se divise donnant naissance à huit microgamètes mâles flagellés, d'environ 20 µm, très mobiles qui vont rapidement à la rencontre des macrogamètes femelles [6].

Par fertilisation et par la faveur d'un chimiotactisme positif, les gamètes mâles haploïdes fécondent les femelles non mobiles et également haploïdes. Il en résulte des zygotes diploïdes non mobiles qui se transforment en ookinètes, mobiles et allongés au bout de 18 à 24 heures. Les ookinètes pénètrent l'épithélium stomacal pour se transformer à l'intérieure en oocystes non mobiles. Les oocystes sont des éléments circulaires au contour régulier, qui se fixent sur la paroi de l'estomac du moustique [8].

A partir de ces oocystes s'individualisent les sporozoïtes qui seront localisés dans les glandes salivaires. Ces sporozoïtes, lors d'un prochain repas de sang du moustique, sont inoculés à l'homme [8].

La durée du développement sporogonique des *plasmodiums* varie en fonction des conditions climatiques : entre 9 et 20 jours pour *P.falciparum* (entre respectivement, (30°C et 20°C), un peu plus rapide pour *P.vivax* à température équivalentes, plus long pour *P.malariae* [6].

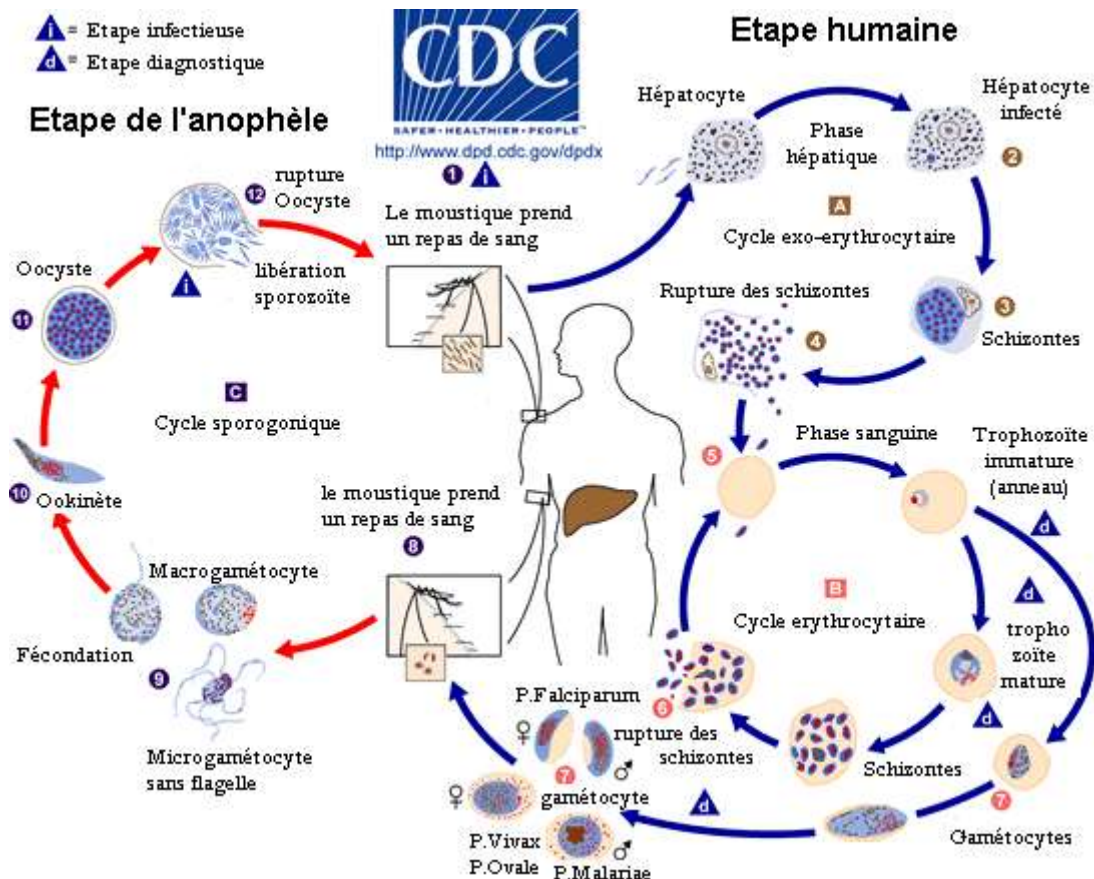


Figure 2 : Cycle biologique du *Plasmodium*

Source : http://WWW.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/malaria_LifeCycle.GIF

Avril 2011.

3.2 LE VECTEUR :

Le paludisme est transmis par la piqûre d'un moustique du genre *Anophele* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle hématophage transmet la maladie. Ces moustiques piquent essentiellement à partir de la tombée du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures du matin. Parmi les 300 espèces qui constituent le genre *Anophele*, environ 60 d'espèces sont des vecteurs potentiels et seulement une vingtaine d'espèces peuvent être considérées comme des vecteurs majeurs [6].

3.2.1 Morphologie : en Afrique, les vecteurs de *Plasmodium* sont généralement des complexe d'espèces morphologiquement identiques, mais ayant une biologie et des caractères génétiques variés. Ces espèces ont des capacités vectorielles différentes [8].

Comme pour tous les moustiques, les anopheles ont le corps divisé en trois parties la tête, le thorax, et l'abdomen [9].

La tête porte deux gros yeux, une paire d'antennes et une pièce buccale. Le thorax est formé de trois segments portant chacun une paire de pattes. Sur deux derniers segments du thorax s'insère une paire d'ailes. L'abdomen est formé de dix segments. Chaque segment est constitué d'une plaque chitineuse dorsale et d'une plaque ventrale reliée par une membrane qui autorise la dilatation de l'abdomen trompe-tête-abdomen est dans le même alignement. Lors du repos cet alignement forme par rapport au support un angle aigu caractéristique des *Anopheles* [9].

3.2.3 Systématique :

- Règne : Animal
- Sous règne : métazoaires
- Embranchement : arthropodes
- Sous embranchement : Tranchâtes
- Classe : Insectes
- Sous classe : Ptérygotes
- Ordre : Diptères
- Sous ordre : Nématocères
- Famille : *Culicidé*
- Sous famille : *Anophelinae, Toxohynchitinae, Aedinae, culicinae.*

3.2.4 Cycle de vie de l'Anophele :

Le développement de l'anophele est caractérisé par la succession de deux phases. La première est aquatique et recouvre la vie pré-imaginale qui dure une dizaine de jours, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte ou imago. Les femelles Anopheles vivent deux semaines à un mois et demi selon les conditions extérieures [8].

3.2.5 La reproduction

❖ la ponte :

Bien que la femelle moustique soit dans la capacité de pondre à plusieurs reprises au cours de sa vie d'adulte, elle ne s'accouplera qu'une seule fois avec un male. En effet, elle dispose de spermathèque permettant le stockage d'une quantité suffisante de spermatozoïdes nécessaires à la fécondation de son œuf. Mais pour porter ces derniers à maturité, elle doit effectuer un repas sanguin, c'est-à-dire piquer un être vivant dont le sang contient les protéines dont elle a besoin. Son repas achevé, elle va pondre à la surface de l'eau des œufs groupés en nacelles de 50 à 200 éléments (les œufs mesurent environ 1mm de long) suivant les conditions climatiques, les œufs éclosent au bout de 2 à 3 jours en climat tropical (dès que l'embryon est complètement développé), pour donner naissance à des larves dont le mode de vie est exclusivement aquatique [10].

❖ La vie aquatique :

La vie de la larve alterne entre le besoin de manger du microplancton et celui de venir respirer en surface par l'intermédiaire d'un siphon respiratoire situé à l'extrémité de l'abdomen. L'eau est indispensable à son développement qui passe par 4 stades successifs, séparés par des mues (variation de la taille de 2 à 15 mm environ).

Après le quatrième stade, la dernière mue donne une nymphe. La phase au cours de laquelle les organes du futur adulte peuvent se mettre en place. Durant ce stade, qui est de courte durée (24 à 48 heures), la nymphe ne se nourrit plus et puise dans les réserves stockées au stade larvaire. La nymphe respire par l'intermédiaire de deux trompettes situées sur le céphalote thorax [10].

❖ L'adulte :

La dernière transformation qui aboutit à un moustique adulte, est la métamorphose. Au moment de l'émergence la cuticule se fend longitudinalement, l'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau libre, l'adulte peut enfin voler de ses propres ailes. Mâles et femelles pourront s'accoupler et pourront recommencer [10].

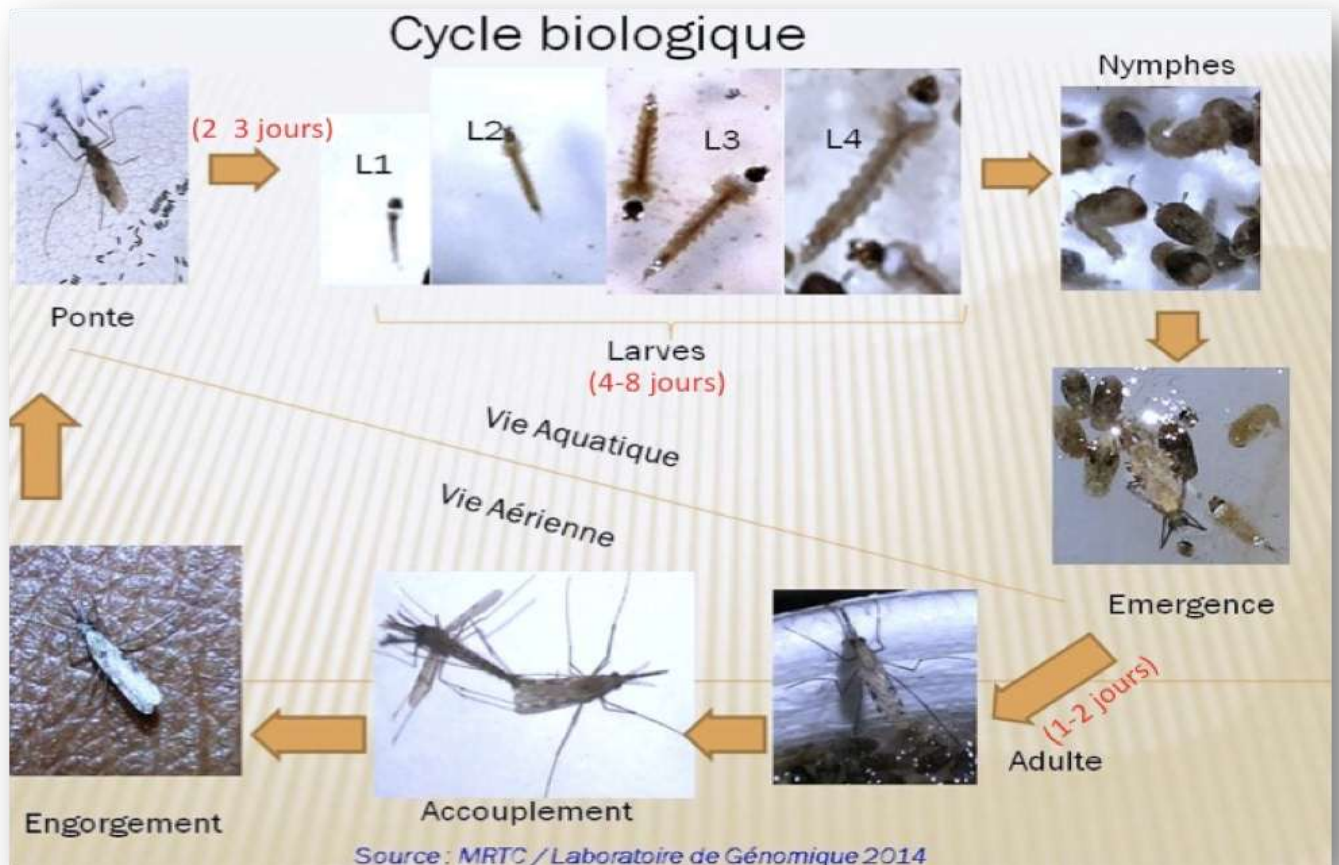


Figure 3 : Cycle biologique d'un Anophelinae

Source: MRTC/ Laboratoire de génomique 2014

3.2.6 Le complexe *Anophele gambiae s.s* :

Le complexe est un ensemble d'espèces différentes génétiquement, non interfécondes dans la nature, mais identiques morphologiquement [11]. *An.gambiae* est un moustique de taille moyenne. Chez l'adulte les pattes sont tachetées ; chaque segment abdominal porte deux taches pâles en position ventrale. Les palpes maxillaires sont aussi longs que la trompe.



Figure 4 : *Anopheles gambiae* lors de la prise de sang.

[http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/09262002/00008/A.gambiae.1354.p_lores.jpg 2001].

3. 2.4.1 Systématique :

Le complexe *Anopheles gambiae* regroupe aujourd'hui neuf espèces : *Anopheles gambiae s.s* [12], et *Anopheles arabiensis* [13], sont les deux vecteurs majeurs de *Plasmodium* en Afrique ; il y'a d'autres espèces comme

- *Anopheles coluzzii* [14]
- *Anopheles amharicus* [14]
- *Anopheles merus* [15]
- *Anopheles melas* [16]
- *Anopheles quadriannulatus* [16]
- *Anopheles bwambae* [16]
- *Anopheles comorensis* [16]

3.2.4.2 Distribution géographique :

Les espèces *An. melas*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus* ont un rôle faible ou nul dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme. Leur distribution est localisée. En revanche, *An. gambiae* et *An. Arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain, *An.gambiae s.s* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors qu'*An. Arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara [17]

Cinq « formes chromosomiques » ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest : les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti [18] qui se répartissent principalement en fonction du degré d'aridité du milieu.

Au Mali, trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* ont été décrites par Coluzzii et al. 1985 : **Bamako, Savane et Mopti**. Bamako et Savane prévalaient dans les zones relativement humides (Savane sud-soudanienne) et se reproduisaient généralement durant la saison pluvieuse. Tandis que la forme Mopti occupait toutes les zones écologiques du Mali et se reproduisait pendant la saison toute l'année [19]. Sur la base des évidences bionomique et moléculaire, la forme **moléculaire M** (M form) d'*An. gambiae* est appelé *An. coluzzii* (Coetzee et al. 2013) et la forme **moléculaire S** (S form) est appelée *An.gambiae* [20].

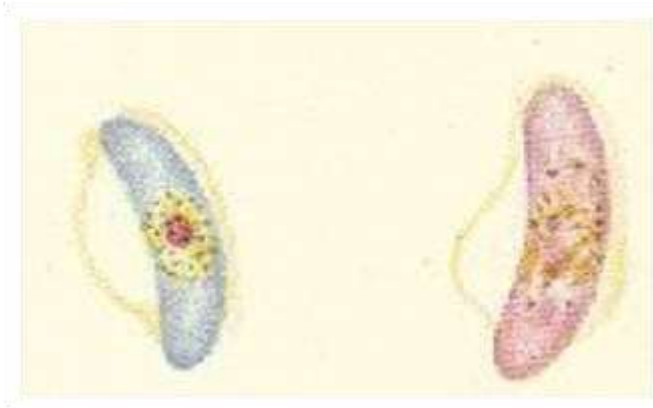
Au Mali, la population vectrice des parasites du paludisme est composée d'*An. gambiae s.s*, *An. Arabiensis* et *An.funestus* avec une prédominance d'*An.gambiae s.s* durant la saison pluvieuse (juin-octobre), *An. Arabiensis* durant la saison chaude (mars-mai), *An. funestus* durant la saison froide (décembre-janvier).il y'a aussi *An.rufipes* bien qu'il soit zoophile [21]

4 Biologie des gamétocytes :

4.1 Définition :

Le terme gamétocyte désigne des pré-gamètes, observés dans le sang circulant de l'homme. Les gamètes proprement dits sont observés chez le moustique et résultent de l'activation des gamétocytes ingérés avec le repas sanguin. Seuls les gamètes sont capables de féconder et vont initier le développement sporogonique chez le vecteur si celui-ci est sensible à l'espèce parasitaire.

Gamète mâle



Gamète femelle

Figure5 : Schémas d'un gamète mâle (bleu) et d'un gamète femelle (rose)

[<http://WWW.rph.wa.gov.au/malaria/falcip.gif> mai 2010]

4.2 Origine des gamétocytes :

Les gamétocytes de *P.falciparum* proviennent de stades sanguins asexués [22]. On n'observe pas chez les *plasmodiae* humaine la production de gamétocytes directement à partir des mérozoites hépatique. Le nombre de gamétocytes est ordinairement très inférieur à celui des stades asexués, de l'ordre de 1 à 3 gamétocytes pour 100 Trophozoïtes. Deux notions peuvent concourir à expliquer ce phénomène. D'une part, la densité de stades asexués, le plus souvent de 10 à 100 fois supérieure à celle des gamétocytes, monopoliserait la réponse immune de l'hôte et donc protégerait les gamétocytes. D'autre part, une forte charge parasitaire pouvant être néfaste à la survie du vecteur ; on note qu'une faible gamétocythémie suffit pour assurer le développement sporogonique et par conséquent une transmission vecteur-homme [23].

4.3 Facteurs favorisant la gamétocytogénèse de *P.falciparum* :

La gamétogénèse est considérée comme un processus spontané qui accompagne une infection palustre. Cependant, toute modification environnementale occasionnant une situation de stress pour les formes asexuées circulantes peut être à l'origine d'une forte poussée de l'environnement hostile vers un autre moins hostile. Ces facteurs de risque de la gamétocytogénèse sont très variés :

- Les fortes charges parasitaires asexuées [24] ;
- L'anémie est aussi une situation de stress et s'accompagne souvent de poussées gamétocytaires [25] ;
- Certains médicaments ont un rôle direct sur la gamétocytogénèse. La chloroquine, comme les amino-4-quinoléines, est gamétophytique sur les stades gamétocytaires jeunes (I à III), mais des observations récentes ont montré que ce médicament est également gamétocytogénique [26] ; l'association sulfadoxine+pyriméthamine (SP) est non seulement gamétocytogénique, mais également sporonticide. Les dérivés de l'artémisine sont fortement gamétocytogéniques et la transmission, afin on privilégie beaucoup les associations médicamenteuses [27] pour diminuer l'induction de la gamétocytogénèse :
- Le retard au traitement de l'accès palustre est probablement aussi un facteur de risque de la gamétocytogénèse, à cause de l'augmentation du temps de souffrance du parasite asexué avant traitement. Au contraire, une prise en charge très rapide et efficace de l'accès palustre ou des fortes charges parasitaires asexuées diminuent fortement la gamétocytémie dans la population [28];
- Certaines souches sont probablement plus gamétocytogènes que d'autres [29]. Mais ceci est très variable en fonction du temps. La culture continue de *P.falciparum* fait généralement perdre à la longue la capacité gamétocytogène [30]. [29]. Par contre, le passage régulier d'un hôte intermédiaire à un hôte définitif maintient cette capacité [31]. Des souches ne produisant plus de gamétocytes après plusieurs passages chez un même hôte pourraient redevenir gamétocytogènes en changeant d'hôte.

4.4 Facteurs influençant le développement de la sporogonie :

4.4.1 Facteurs humains :

Lors du repas sanguin, le moustique ingère, en même temps que les gamétocytes, des facteurs sériques ou des cellules sanguines qui peuvent avoir un rôle sur le développement

du parasite. Parmi ces facteurs inhibiteurs humains, certains existent naturellement chez l'homme vivant en zone d'endémie (anticorps anti-sexués, anticorps anti-sporozoïte, cytokines, complément, cellules immunocompétentes), d'autres peuvent être induits artificiellement par vaccination (anticorps contre Pfs25, anticorps contre les tissus de moustique).

4.4.1.1 Les anticorps anti-sporozoïtes :

L'homme vivant en zone d'endémie palustre synthétise des anticorps anti-sporozoïtes (Hoffman et al., 1986 ;[32].[33]. Les Ig G de l'hôte vertèbre, ingérées au cours de n'importe quel repas sanguin par le moustique, passent du tube digestif vers l'hémocèle [34].Ce mécanisme peut avoir des conséquences si un repas de sang est pris sur un homme avec des AC anti-CSP (protéine circumsporozoïtaire) et si le moustique héberge à ce moment des sporozoïtes à la suite d'un précédent repas de sang infectant. Dans le système *P.falciparum* *An. stephensi*, les Ac anti-sporozoïtes traversent non seulement la paroi digestive, mais aussi la paroi des glandes salivaires [35]. La concentration atteint son maximum 3heures après ingestion puis les Ac disparaissent vers 18-24 heures (Vaughan et al., 1988 ; 1990). Ces Ac s'attachent aux sporozoïtes circulant dans l'hémolymphe, mais progressivement la fluorescence de la membrane se perd, évoquant un mécanisme de perte progressive du manteau antigénique CSP. Les mécanismes d'action de ces Ac anti-CSP sont très divers, mais ils peuvent déclencher une réaction de précipite à la surface du parasite [36] entraînant l'immobilisation du sporozoïtes.

Dans ces conditions, on peut penser que des repas sanguins successifs, riches en Ac anti-CSP et pris pendant la phase de migration des sporozoïtes, peuvent réduire la charge sporozoïtaire des glandes salivaires. Cependant, la concentration des anticorps anti-sporozoïtes chez le moustique est nettement moins importante que la contraction chez l'homme [37]. On a montré que seuls des taux élevés d'Ac anti-sporozoïtes pouvaient inhiber l'infectivité, détruire le parasite ou empêcher l'invasion tissulaire par les sporozoïtes.

Au contraire, de faibles taux seraient plutôt potentialisateurs [38];[39].Dans ces conditions, il est fort peu probable que telles concentrations dans l'hémocé du moustique puissent avoir un effet inhibiteur sur la maturation oocystique, la migration des sporozoïtes et sur l'envahissement des glandes salivaires du moustique. Une question non

résolue est de savoir si les taux d'Ac naturels rencontrés dans les zones endémiques peuvent avoir un effet facilitateur.

4.4.1.2 Les leucocytes :

Il a été que la phagocytose des gamètes existait dans l'estomac du moustique [40]. De par la courte demi-vie des gamètes, de l'ordre de quelques minutes, ce stade parasite ne peut probablement pas être la cible d'une phagocytose dans l'estomac du moustique. La phagocytose simple n'expliquerait que 7% des pertes parasites *in vivo*. Par contre, des études expérimentales semblent montrer que l'association, leucocytes activés par des opsonines et cytokines jouerait un rôle non négligeable en contrariant le développement parasite dans l'anophele.

4.4.1.3 Le complément :

L'importance du complément dans l'activité inhibitrice des anticorps anti-Pfs230 a été largement démontrée [41]. Le complément pourrait aussi intervenir seul après activation par la voie alterne qui ne dépend pas de la formation d'immuns complexes.

En fait, les études *in vivo* ne semblent pas montrer de rôle inhibiteur sur l'infectivité pour les sérums immuns décomplémentés ou non, au moins au Cameroun, ou les anticorps Pfs230 sont rarement rencontrés [38].

4.4.2 Les facteurs inflammatoires et les cytokines :

La présence de protéine C réactive ne semble pas inhiber l'infectivité des porteurs de gamétocytes [42]. Nous avons mentionné ci-dessus le rôle potentiel du TNF avec les leucocytes ingérés. Cependant, le TNF a une courte durée de vie et a également disparu quand les gamétocytes murs de *P.falciparum* apparaissent. Aucune autre étude n'a abordé directement le rôle des facteurs inflammatoires et des cytokines sur l'infectivité des porteurs de gamétocytes [43].

4.4.3 Utilisation des médicaments antipaludiques :

Les médicaments antipaludiques sont capables d'influencer la transmission du parasite de l'homme au moustique. La primaquine et la pamaquine ont une action gamétocydyque chez *P.falciparum* [44].[45] alors que des sérums de volontaires européens jamais exposés au paludisme et sous prophylaxie à base de proguanil-chloroquine étaient capables de réduire la transmission au cours d'infections expérimentales [30]. Cependant, des sera

contenant seulement la chloroquine n'ont pas montré d'action sur la sporogonie [46] mais semblent favoriser la transmission des souches chloroquino-résistantes [47]. Par ailleurs il a été observé *in vitro* que la pyriméthamine et l'halofantrine rendaient les gamétocytes infectieux.

4.4.4 Le type d'hémoglobine :

Il est connu que le développement des stades sexués débute par l'invasion de globule rouge par le parasite. Seul ce stade sexué est en mesure de continuer le cycle du *plasmodium* chez le moustique. Il constitue par conséquent un paramètre important dans la transmission du paludisme. Cependant, il est suspecté que les stades asexués en fortes charges sont susceptibles à se transformer sous l'effet stressant du milieu (rejet de toxines et pression immunitaire) en stades sexués. Les HBS et HBC sont capables d'inhiber la croissance parasitaire pour aboutir à de charges parasitaire moins élevées [48] à tel point que les gamétocytes soient faiblement ou rarement produites influençant ainsi la transmission. Cependant, [47] lors d'une étude au Sénégal montrent que les porteurs de type d'hémoglobine AS malgré leur faibles gamétocytemie infectaient plus de moustique que les porteurs d'hémoglobine normale AA. L'hémoglobine aurait donc un rôle spécifique dans la transmission du paludisme indépendamment de la densité de gamétocytes.

4.4.5 Facteurs parasitaire :

Un certain nombre de facteurs parasitaires ont été identifiés pour expliquer le mauvais rendement de cycle sporogonique.

4.4.5.1 Gamétocytemie :

Au sein d'une population d'individus naturellement infectés par *P. falciparum*, la seule densité gamétocyte capable de provoquer une infection chez le moustique est relativement faibles [49]. Dans la majorité des cas, il a été démontré qu'une gamétocytemie de 100 gamétocytes/ μ l de sang était suffisante pour provoquer une infection naturelle chez le moustique. La population de cas d'infection chez le moustique augmente avec la gamétocytemie et est à son maximum lorsque la gamétocytemie atteint 1000 gamétocytes/ μ l de sang [44].

4.4.5.2 La sex-ratio des gamétocytes :

En 1935, Boyd et al. Démontrèrent que les plus faibles densités de gamétocytes mâles étaient plus infectieuses que les plus fortes alors d'autres n'ont pu démontrer cet effet de la sex-ratio sur l'infectivité des gamétocytes [49].

4.4.5.3 L'âge des gamétocytes :

L'âge influence également le succès de l'infectivité pour le moustique. Les jeunes gamétocytes de stade V sont peu ou pas infectants. On sait aussi que les gamétocytes présents dans la circulation périphérique depuis plus d'une semaine présentent une infectivité réduite qui n'est pas due à la chute progressive de la densité gamétocytaire [50]. Il est donc clair qu'il existe une période d'infectivité maximale pour les gamétocytes, ni trop jeunes ni trop vieux.[28]

4.4.5.4 Maturité et qualité des gamétocytes :

La qualité du gamétocyte peut être évaluée à partir de sa morphologie et de sa capacité à se transformer en gamétocyte mâle ou femelle. Les gamétocytes de *P.falciparum* possèdent différentes caractéristiques morphologiques permettent de les identifier comme formes immatures ou aberrantes. Les formes matures sont de croissant avec des bouts arrondis alors que les aberrants ont formé en croissant mais des bouts pointus. Un autre critère est la distribution du pigment dans le cytoplasme. Les gamétocytes matures et fonctionnels ont un pigment localisé autour du noyau alors que chez les aberrants, il est localisés en bouquet sur un pôle de la cellule. La maturité des gamétocytes se caractérise aussi par leur capacité d'activation et l'ex-flagellation.

4.4.5.5 Une forte parasitémie asexuée :

Une très forte parasitémie réduit parfois l'infectivité des gamétocytes. Le mécanisme est inconnu. Il pourrait s'agir du rôle inhibiteur sur l'infectivité de certaines cytokines, comme le TNF par exemple [9], abondamment secrétées lors des poussées parasitaires asexuées, mais ce phénomène n'existe que rarement dans les infections à *P.falciparum*, du fait du retard de maturation des gamétocytes par rapport à la poussée asexuée qui leur a donné naissance.

4.4.6 Facteurs liés aux moustiques :

Lors de son développement chez le moustique, le *plasmodium* se heurte à un certain nombre de barrières physiologiques comme la matrice péritrophique, l'épithélium stomacal, la coque de l'oocyste, l'épithélium des glandes salivaires. Il subit aussi l'agression des enzymes dans l'estomac et des mécanismes de défense du moustique lors de son passage dans l'hémolymphe. Tous ces facteurs inhibiteurs conditionnent la sensibilité du moustique au parasite.

4.4.6.1 Les enzymes de la digestion :

L'ingestion d'un repas sanguin déclenche chez le moustique une sécrétion enzymatique protéolytique abondante [51]. L'activité enzymatique digestive atteint son apogée à des moments variables après l'ingestion du repas sanguin qui dépendent de l'espèce de moustique en cause. Ces enzymes digestives peuvent détruire le parasite. L'ookinète semble plus résistant aux enzymes que les stades précédents [52],[53]. Il doit probablement mettre en jeu des mécanismes de protection qui sont encore inconnus. Le développement de l'ookinète, contemporain étanche, doit vraisemblablement avorter ou être fortement inhibé. Inversement, un développement de l'ookinète avant le pic de sécrétion enzymatique ou avant la formation complète de la matrice péritrophique permet l'évolution du parasite vers les stades ultérieurs. Le rôle des enzymes digestifs du moustique peut ainsi être facilitateur ou inhibiteur de l'infectivité du parasite selon la période du développement sporogonique à laquelle ils sont sécrétés et selon le rôle concomitant de la matrice péritrophique.

Un autre rôle serait dévolu aux enzymes digestives. Elles activeraient la prochitinase sécrétée par l'ookinète sous forme inactive, au moins chez *P.gallinaceum* [54], favorisant ainsi la traversée de la membrane péritrophique. Mais un tel mécanisme a été récemment mis en question [55]. En fin, les enzymes digestives du moustique détruiraient les facteurs du complément, pouvant ainsi empêcher la destruction des zygotes [56].

4.4.6.2 La matrice péritrophique :

La majorité des moustiques produisent une sorte d'enveloppe, de structure lamellaire, enserrant le bol alimentaire. Un stimulus de cette sécrétion serait la distension stomacale, mais il doit être associé à la présence de composés sanguins puisque l'absorption de sérum ou de jus sucré n'entraîne pas la formation de MP [57]. Elle est sécrétée par les cellules

de l'épithélium stomacal et entoure tout le bol alimentaire en quelques heures. La nature chimique et la cinétique de sécrétion de la MP dépendent de l'espèce du moustique.

On comprend qu'il faille au parasite un équipement enzymatique spécifique pour passer cette première barrière physiologique quand la mise en place de la MP est précoce. C'est dans le couple *P.gallinaceum/An. aegypti*. Par contre, chez les couples *An. Stephensi/P.falciparum* ou *An. atroparvus/P.berghei*, la MP est d'apparition plus tardive et ne gêne pratiquement pas la migration de l'ookinète. D'autres ont concerné des couples parasites-moustiques réfractaires ou sensibles, en présence ou après inhibition de synthèse de la matrice chez le moustique, pour apprécier le rôle de celle-ci sur l'infectivité [54];[57]; il en ressort qu'il n'existe pas d'argument formel sur le rôle limitant de la MP sur l'infectivité des *Plasmodium*.

4.4.6.2 L'encapsulation mélanique dans l'hémolymphe :

C'est le premier mécanisme de résistance du moustique au *Plasmodium* à avoir été réellement caractérisé du point de vue génétique et physiologique. Cette résistance se manifeste par la production d'une capsule de mélanine autour des ookinètes du parasite lorsque ceux-ci émergent sur la face basale des cellules épithéliales de l'estomac de l'insecte entre 16 et 24 heures après le repas sanguin [58]. Les hémocytes du moustique ne sont pas impliqués dans le processus d'encapsulation, indiquant que le mécanisme est de type humoral [59].

4.4.6.3 La lyse intracellulaire des ookinètes dans l'épithélium de l'estomac :

La lyse des ookinètes du parasite se fait peu de temps après l'invasion des cellules de l'épithélium de l'estomac du moustique. Ce mécanisme de lyse intracellulaire se distingue du mécanisme d'encapsulation décrit ci-dessus de plusieurs manières. Les ookinètes détruits par ce mécanisme ne sont pas mélanisés, mais présentent une dégénérescence rapide des organites cellulaires et une nécrose apparente [60] tandis que les parasites déjà encapsulés gardent une apparence ultra-structurale normale jusqu'au moment où ils commencent à dégénérer [58].

4.4.6.4 Les paramètres biologiques du moustique :

Entre les individus d'une même espèce, la variation sanguine ingérée est probablement un facteur important de l'infection chez le moustique. Or, très peu d'études se sont penchées sur

ce problème : la moyenne de sang ingéré par un lot de moustique a bien été rapportée [61] mais, à notre connaissance, la distribution des valeurs n'a pas été connue.

L'âge du moustique est important, puisque le premier repas de sang est celui où le moustique s'infeste le plus facilement, probablement parce qu'un repas de sang accélère la vitesse de digestion du repas suivant [62]. Un âge trop avancé du moustique lors de la prise d'un repas de sang infectant est défavorable à l'achèvement du développement sporogonique, à cause d'une survie amoindrie de l'*Anophele* [49].

La nutrition du moustique femelle est également un facteur important sous l'angle de l'alternative entre un repas de jus sucré ou un repas de sang. Après un repas de sang infectant, un repas de jus sucré est préférable à un repas sans sucre pour une infectivité supérieure du moustique [63]. Par ailleurs, les moustiques qui prennent exceptionnellement des repas de jus sucré ont un développement gonotrophique court. Ceci est peut-être lié à l'exigence d'un apport nutritif important exigé par certaines espèces de moustiques et plus aisément procuré par le repas de sang. Même si un repas de jus sucré est disponible dans l'environnement, ces espèces recherchent plutôt un repas de sang, et telle qu'*An. gambiae* par exemple, ont donc une fréquence de piqûres élevée et sont plus fréquemment en contact avec un homme [35].

4.4.7 Facteurs environnementaux :

Les facteurs climatiques influencent considérablement la répartition géographique et l'épidémiologie du paludisme. Ils interviennent sur la transmission par trois mécanismes partiellement liés.

4.4.7.2 Le climat :

Le climat a une influence sur (i) la répartition et l'abondance des *Anopheles* vecteurs, (ii) la possibilité et le succès du développement sporogonique du parasite à l'intérieur du vecteur, (iii) la modulation du contact homme-vecteur.

4.4.7.3 La température :

Elle influence la durée du développement sporogonique du parasite, la durée du développement pré-imaginal du vecteur et la survie de l'anophèle adulte. Au-delà de 35°C et en deçà de 18°C, le développement sporogonique de *P.falciparum* est stoppé ; à la température de 20°C, 24°C et 30°C, il est respectivement de 20, 11 et 9 jours. L'espèce

P. vivax supporte des températures plus modérées, jusqu'à 15°C, et à la température de 20°, 24° et 30°C, le développement sporogonique est respectivement de 16, 9 et 7 jours.

4.4.7.4 L'humidité :

L'humidité influence la survie des moustiques adultes, et par la même occasion le succès du développement sporogonique. Cette humidité doit être relativement élevée pour une survie optimale (l'humidité relative conseillée est de 70 à 80 % en insectarium).

4.4.8 Les méthodes de lutte contre le paludisme :

La lutte contre le paludisme est axée sur trois volets : la lutte antivectorielle ; la lutte contre le parasite (chimiothérapie et chimio-prophylaxie) ; et le développement de stratégies vaccinale.

4.4.8.2 La lutte anti-vectorielle :

Cette lutte est basée sur la rupture et la réduction contact Homme vecteur. Différentes méthodes de luttent sont applicables contre les laves et ou contre les adultes. Cette lutte peut être : biologique, physique et chimique.

4.4.8.2.1 La lutte biologique :

Cette lutte s'effectue au niveau des gîtes et consiste à détruire les laves avant qu'elles ne deviennent des adultes capables de transmettre la maladie.

L'exemple le plus connu est celui des poissons larvivores, qui se nourrissent de larves de moustique. Parmi les principales espèces à avoir été introduites avoir succès dans différents pays, il y'a le « top minnow » ou poisson à moustiques (*Gambusia affinis*) et le « guppy » (*Poecilia reticulata*). *Gambusia*, est plus efficace dans les eaux claires, tandis que *Poecilia* est utilisé avec succès dans les eaux polluées de matières organiques. *Poecilia* supporte des températures plus élevées que *Gambusia* et convient donc mieux dans les rizières des pays chauds. Cependant, à l'inverse de *Gambusia*, il ne peut survivre à des températures inférieures à 10°C [64] *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) est un autre exemple de méthode de lutte biologique. C'est une bactérie qui produit des toxines très actives contre les larves par ingestion. A dose normale, elle est sans danger pour l'homme, les autres insectes, les poissons et animaux supérieurs. Elle peut être utilisée dans eaux d'irrigation des cultures vivrières et dans les eaux de boisson. Le Bti a le désavantage de n'être active que pour ingestion, puis sa densité l'entraîne au fond alors que les larves

d'anophèle se nourrissent en surface. Elle se détruit très rapidement dans les milieux naturels et doit donc être réappliquée périodiquement [8].

4.4.8.2.2 La lutte physique :

C'est une modification intentionnelle du biotope, qui vise à faire disparaître ou réduire par des moyens physiques les nappes d'eau de surface dans lesquelles les moustiques se développent [65] On distingue :

Le drainage qui consiste à faire évacuer les eaux du gîte à l'aide d'un drain vers un milieu récepteur naturel (tel qu'un cours d'eau, un drain perméable etc...). Il a l'avantage d'évacuer rapidement les eaux et d'entraîner œufs et larves vers des assurés milieux défavorables à leur développement ou leurs destruction rapide est assurée. Mais la disponibilité d'un milieu récepteur naturel situé à une distance raisonnable du gîte peut constituer un facteur limitant de cette méthode.

La mise en en boîte consiste à concentrer les eaux dans les tranchées, et par conséquent réduire la superficie du gîte à empoisonner. Cette méthode est utilisée dans le cas de gîtes importants situés loin d'un milieu récepteur naturel. Cette mise en tranchée, nécessite la connaissance du volume d'eau dans le gîte.

Le captage des résurgences : ces résurgences proviennent de nappes artésiennes ou nappes captives. Pour éliminer ces résurgences on peut utiliser soit : (i) le pompage à l'aide d'une pompe à moteur ; (ii) l'installation d'une pompe éolienne ; (iii) l'aménagement en puits ; (iv) le drainage vers un milieu récepteur naturel. Ces solutions sont fonction du débit de la source et, de la permanence de celle-ci.

Le comblement : certains gîtes peuvent être éliminés à l'aide de matériaux (pierres, débris de construction). Cette méthode est surtout utilisée pour des gîtes de petite superficie, et de profondeur moyenne. Ces matériaux devront souvent être transportés sur de longues distances, et nécessitent d'être compactés, ce qui élève le coût du comblement.

A part la solution de comblement, toutes les autres nécessitent souvent un travail d'entretien (désherbage, curage, mise à bord franc, etc...). D'une façon générale, les travaux de génie sanitaire peuvent être améliorés par un reboisement au niveau des surfaces assainies.

Le reboisement il est bénéfique et rentable de prévoir la plantation d'arbres, comme l'eucalyptus ou autres végétations hydrophiles dans les sols humides regroupant plusieurs résurgences d'eau faible débit mais d'écoulement continu.

4.4.8.2.3 La lutte chimique :

Il s'agit de répartir, uniformément et périodiquement, une certaine quantité de pesticide sur la surface de l'eau qui abrite les gîtes larvaires et d'exposer la mort des arthropodes par empoisonnement.

Les insecticides organophosphorés sont les plus utilisés en dépit de leur niveau de résistance en augmentation dans certaines régions.

Le Temephos qui a une très faible toxicité pour les mammifères a été le larvicide le plus utilisé dans le monde [64]. Il peut être mis dans l'eau d'irrigation et a aussi été utilisé pour traiter les eaux de boisson. Il est cependant toxique pour les poissons.

Le Fenthion est aussi communément utilisé à condition de ne pas contaminer l'eau de boisson et les aliments [64].

4.4.9 La lutte anti-adulte :

Différentes méthodes sont utilisées pour la lutte contre les moustiques adultes et ou limiter le contact Homme-vecteur [65]. Il s'agit :

- Des grillages fins imprégnés d'insecticide aux fenêtres et s'assurer régulièrement qu'il n'y a aucun trou. Les bouches d'aération et de ventilation doivent aussi être grillagées. La climatisation est très efficace car le froid ralentit l'activité et la reproduction des insectes.
- Des diffuseurs électriques qui protègent la chambre pendant 45 nuits (8 à 10 heures par nuit) en diffusant régulièrement un insecticide inoffensif ;
- Des spirales insecticides à combustion lente assurent également une bonne protection périodique et tuent les insectes. Elles peuvent être utilisées sous une véranda ou dans une pièce aérée. Elles protègent pendant 6 à 8 heures ;
- De moustiquaires chiquement imprégnées qui est une des protections les plus efficaces contre les moustiques, aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons. Pour un maximum de protection, ces moustiquaires doivent être en bon état, maintenue attachées dans la journée et rabattre les bords sous le matelas au couché. L'utilisation

de moustiquaires imprégnées d'insecticide réduit considérablement le risque de transmission du paludisme dans une région où le paludisme est endémique. C'est l'idéal pour protéger les jeunes enfants et les femmes enceintes qui ne peuvent pas toujours utiliser les autres mesures contre le paludisme.

- Utiliser les bombes insecticides (spray) qui offrent une protection de courte durée, juste quelques minutes après leur pulvérisation. Ils restent utiles, avant d'entrer dans la pièce, ou avant d'aller dormir pour tuer tout insecte ayant pu pénétrer.
- Application de répulsifs sur la peau à base de DEET (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide), d'IR 3535, de picaridine ou de citriodiol, d'éthylhexanediol (EHD) ou de diméthylphtalate (DMP)
- L'information et la formation en continue [66].

4.4.10 La lutte génétique :

Elle est basée sur la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement [67]. Elle consiste à lâcher des *Anopheles* mâles stériles [65].

4.4.11 Chimio-prévention :

Elle consiste en l'administration d'un médicament de telle manière que sa concentration sanguine est maintenue au-dessus du niveau qui inhibe la croissance des parasites, au stade pré-érythrocytaire ou érythrocytaire du cycle de vie du parasite pendant la durée de la période de risque [68]. Aucun moyen préventif n'assure à lui seul une protection complète contre le paludisme [69]. Ce pendant l'OMS recommande la chimioprophylaxie pour les personnes non immunes et les femmes enceintes vivant en zones d'endémie palustre [1]

4.4.11.2 Traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes (TPI) :

Le TPI consiste à l'administration intermittente et systématique d'un moins trois (3) cures de trois (3) comprimés de Sulfadoxine et Pyriméthamine (SP) [1] .

4.4.11.3 Chimio-prévention saisonnière du paludisme (CPS) :

Elle consiste à l'administration de la Sulfadoxine Pyriméthamine plus Amodiaquine (SP+AQ) [1].

4.4.11.4 Chimio prophylaxie des expatriés et les voyageurs :

Chimio prophylaxie du paludisme doit être prise pendant tout le séjour dans une zone endémique et doit être poursuivie après le retour de la zone endémique pendant une durée variable selon le médicament prescrit.

4.4.12 Chimiothérapie :

Elle repose sur l'utilisation de molécules antipaludiques qu'on peut classer selon leurs propriétés pharmacologiques, leurs propriétés chimiques, leurs origines. Ces molécules sont utilisées en fonction du stade de la maladie et de la sensibilité du parasite aux antipaludiques.

4.4.12.1 Classification selon leurs propriétés pharmacologiques

❖ Les schizonticides :

Ils sont actifs sur les schizontes, mais inactifs sur les gamètes. Ce sont : la quinine et ses sels, les amino-4 quinoléines, les biguanides et dérivés, les diaminopyrimidines et les sulfamides.

❖ Les gametocytocides :

Ils sont actifs que sur les gamètes. Ce sont principalement les amino-8-quinoléines. Certains antipaludiques comme l'artémisine et ses dérivés auraient à la fois les activités schizonticides et gametocytocides.

4.4.12.2 Classification selon la famille chimique :

Les méthanol quinoléines : la quinine et la méfloquine ;

Les amino-4-quinoléines : la chloroquine et l'amodiaquine ;

Les amino-8-quinoléine : la primaquine ;

Les antimétabolites antifoliques : les biguanides et les diaminopyrimidines (pyriméthamine et triméthoprime) ;

Les antimétabolites antifoliques : Sulfadoxine, sulfalène, Dapsone ;

Les phénanthrènes méthanol, halofantrine ;

- ✓ Les aryles-amino-alcool : artémisinine et dérivés (Artéméther, Artésunate).

4.4.12.3 Classification selon l'origine :

- ✓ Origine naturelle : quinine, artémisine et dérivés ;
- ✓ Origine synthétique : la méfloquine, chloroquine, amodiaquine, primaquine, halofantrine, les antifoliques et les antifoliniques [70].

4.4.12.4 Traitement des accès palustres simples :

Le traitement du paludisme simple a pour objectif de guérir rapidement le patient et empêcher une progression de l'infection vers une maladie grave.

Les schizonticides tissulaire qui ont une activité sur les formes pré-érythrocytaire du *plasmodium* peuvent aussi être utilisés pour prévenir la rechute dans certaines infections *P. ovale* ou *vivax* qui présente des formes hypnozoïtes.

- Les schizonticides utilisés pour les stades sanguins du plasmodium sont recommandés pour le traitement aussi bien symptomatique qu'asymptomatique. Ce type de médicament est le plus utilisé dans le traitement du paludisme.

Les gamétocytes détruisent les formes sexuées du plasmodium ; ils ont la possibilité d'agir aussi bien sur les formes sexuées portées par l'homme mais également sur celles qui sont ingérées par les Anophèles lors du repas sanguin. Généralement, nous retrouvons dans cette catégorie les Amino-8-quinoléine : primaquine, tafénoquine.

Les CTA recommandés par l'OMS pour le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*

- Artéméther + Luméfantrine
- Artésunate+ Amodiaquine
- Artésunate+ Méfloquine
- Dihydroartémisinine+ Pipéraquine
- Artésunate+ Sulfadoxine+pyriméthamine (SP).

Le traitement complet avec CTA se fait sur une durée de 3 jours [64].

4.4.12.5 Traitement accès Pré-transfert du paludisme grave :

Si toutefois le temps de transfert d'un patient dans une structure sanitaire peut dépasser 6 heures, l'OMS recommande un traitement pré-transfert en administrant un des médicaments suivant :

- Artésunate par voie rectale,
- Artésunate IM
- Artéméther IM
- Sel de quinine IM

Il est aussi important d'administrer avec un traitement de pré-transfert un antibiotique à large spectre. Puis transférer immédiatement le patient vers l'établissement qui convient pour poursuivre le traitement [64].

4.4.12.6 Traitement des accès palustres graves :

Le traitement du paludisme grave a pour objets de sauver la vie du patient, de prévenir les handicaps probables et de prévenir les infections recrudescentes.

Toutes les formes graves du paludisme chez l'enfant et l'adulte doivent être avec traité avec de l'Artésunate en injection intraveineuse ou intramusculaire à l'admission ($t=0$), à 12h suivant la première administration puis chaque 24 h jusqu'à ce que la gravité de la maladie soit atténuée, puis compléter par un traitement de relais *per os* avec une cure complète de trois jours avec les CTA efficaces.

Dans les milieux où l'artésunate injectable n'est pas disponible, l'Artéméther injectable est préféré. On peut utiliser la quinine dans les cas de paludisme grave chez l'enfant et l'adulte. Néanmoins, elle doit être utilisée avec beaucoup de précaution car elle peut entraîner de graves troubles [64].

4.4.13 Association des antipaludiques :

L'association des antis malariques à effets synergique ou additive permet d'augmenter l'efficacité des médicaments et d'assurer une protection mutuelle des molécules contre l'acquisition de résistances des plasmodies, essentiellement de *P. falciparum*. Les molécules combinées limitent la sélection des chimiorésistances grâce à leurs modes d'actions différents.

4.4.13.1 Les combinaisons sans artémisinine :

- Sulfadoxine Pyriméthamine(SP)
- Chloroquine plus Sulfadoxine Pyriméthamine (CQ-SP)
- Amodiaquine plus Sulfadoxine Pyriméthamine (AQ-SP)
- Méfloquine plus Sulfadoxine Pyriméthamine (MQ-SP)
- Chloroquine plus Proguanil (CQ-PG)
- Atovaquone plus Proguanil (A-P)
- Quinine plus Tétracycline ou Quinine plus Doxycycline en zones quiniorésistance (Forets d'Asie du sud-est et Amazone) ;

4.4.13.2 Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisine (CTA) :

Les parasites résistent de plus en plus médicaments antipaludiques les plus usuels comme la chloroquine ou l'association Sulfadoxine Pyriméthamine (SP) [71].

Cette situation est à l'origine de nouvelles stratégies de traitement basées essentiellement sur des combinaisons de différentes molécules.

La combinaison la plus usitée est à base d'artémisine d'où l'appellation d'Artemesinine-based combinaison thérapie (ACT) :

- Artéméther-Luméfantine (AL)
- Artésunate plus Amodiaquine (AS-AQ)
- Artésunate plus Méfloquine (AS-MQ)
- Dihydroartémisinine plus pipéraquine (DHA-PQ)
- Artésunate plus Sulfadoxine pyriméthamine (AS-SP) [7].

4.4.14 Mise au point d'un vaccin antipaludique :

Au vu de l'augmentation inquiétante de la résistance aux insecticides et de la résistance des parasites à la plupart des antipaludéens, le développement d'un vaccin reste une voie de recherche majeure. Différents essais de vaccinations sont conduits dans plusieurs laboratoires spécialisés. La recherche de vaccins antipaludiques repose sur l'identification et la production d'antigène qui déclenche une réponse immunitaire protectrice chez l'homme.

Les antigènes cibles apparaissent à des niveaux différents du cycle parasitaire. Pour les antigènes donnant une immunité de blocage de la transmission, la réponse immunitaire sera une suppression de la phase sexuelle du parasite et de la sporogonie. La rationalisation des

vaccins de blocage de la transmission réside dans l'espérance que de tels vaccins : (i) réduiront la transmission du paludisme ; (ii) en combinaison avec ceux dirigés contre les sporozoïtes et le stade asexuel sanguin au moins sous certaines conditions épidémiologiques, préviendront la propagation de tous les parasites mutant résistants aux autres vaccin [49].

Ces recherches sont difficiles et à plusieurs reprises, des résultats préliminaires, qui semblaient prometteurs, n'ont pas été confirmés. On peut envisager de disposer un jour d'un ou plusieurs vaccins contre le paludisme.

Les vaccins bloquant la transmission induisent des anticorps empêchant la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique. Les formes sexuées se développent dans les globules rouges quelques semaines après infestation et sont infectantes pour les moustiques qui piquent des sujets infectés. Avec une couverture large, ces vaccins pourraient réduire la transmission du paludisme dans les régions d'endémie en diminuant le nombre de moustiques infectés. Un vaccin bloquant la transmission contribuerait également à empêcher l'apparition de parasites pharmaco-résistants e/ou de variant susceptibles d'échapper au vaccin, sélectionnés sous l'effet de vaccin de stades sanguins asexués et de stades pré-érythrocytaire partiellement efficaces.

Au stade des formes sexuées du parasite dans le sang, les chercheurs tentent d'obtenir un vaccin dit « altruiste ». En effet, il ne s'agit pas de protéger l'individu, mais d'empêcher la transmission du parasite au moustique. Ainsi, la transmission du parasite à un autre hôte sera interrompue et le cycle du paludisme aussi. Ces candidats de vaccins ne concernent pas l'être humain dans un premier temps car les TBV ou transmission blocking vaccins agissent au niveau du moustique.

De plus, le paludisme se transmet dans un périmètre de quelques centaines de mètre de la source infectée et le TBV apparait comme le moyen de protéger toute une communauté [72]. Le TBV cible antigènes présents dans les gamètes et la reproduction d'anticorps est stimulée. Ces derniers, qui circulent librement dans le sang sont ingérés par le moustique pendant son repas sanguin et détruisent les différentes étapes du parasite dans le système alimentaire du moustique.

Ce type d'immunité est utilisé par les anticorps contre les antigènes des protéines de surface du parasite, qui ont émergé des globules rouges nouvellement infectés dans l'intestin du moustique. Les anticorps sont provoqués par la vaccination de l'hôte intermédiaire immunisé ne seront pas infectés. Les anticorps contre les gamètes empêchent leur fécondation ou

détruisent les gamètes ou zygotes dans les 10 à 15 minutes après l'entrée dans le système alimentaire du moustique. Les anticorps agissant sur les ookinètes sont efficaces entre 12 à 24 heures au plus tard pour les empêcher de pénétrer dans l'intestin et de former les sporozoïtes, lesquels pourraient éventuellement infecter un autre hôte intermédiaire [72].

4.4.14. 1 Les antigènes de l'immunité du blocage de la transmission du paludisme :

4.4.14.1. 1 Les antigènes de pré-fécondation :

Plusieurs antigènes ont été identifiés comme étant présents majoritairement sur les surfaces des gamètes mâles et femelles. Les plus fréquemment étudiés sont Pfs230 et Pfs48/45 contre lesquels des anticorps agissent pour bloquer la transmission *in vitro*. C'est une preuve que ces protéines peuvent être impliquées dans le processus de fécondation. Cependant, un travail important est nécessaire avant que le blocage de la transmission du parasite soit pleinement efficace *in vivo*. Le développement de ces antigènes pour un vaccin est toujours au stade initial de la recherche.

Pendant une infection naturelle, ces antigènes de pré-fécondation sont aussi présents dans l'hôte intermédiaire, lequel dans un individu vacciné peut entraîner une augmentation naturelle des anticorps [72]

- Pfs48/45

Un autre candidat TBV pour contrôler la propagation de *P.falciparum* est Pfs48/45. Le Pfs45/48 gène code pour une unique protéine qui migre comme une double bande dans des conditions non-réductrices [73]. Cette protéine est exprimée aux surfaces des gamétocytes et gamètes de *P. falciparum* et a un rôle central dans la fertilité des gamètes mâles [74].

Les tentatives pour exprimer cette protéine dans sa forme native en utilisant les différents systèmes, tels que la bactériémie [73], le virus de la vaccine et la levure [75] ont échoué en raison de pliage incorrect. Cependant, l'expression de la forme recombinante de Pfs48/45 (Pfs48/45-10C) dans *E. coli* suit ou les étapes de repliement correct dans 10-20%, induite chimiquement.

4.4.14.2 Les antigènes de post-fécondation :

La deuxième classe des antigènes consiste en des protéines exprimées exclusivement ou en prédominance sur les zygotes ou les ookinètes, lesquels peuvent ne pas être présents chez

l'hôte intermédiaire. Les réponses des anticorps ne peuvent donc pas être décuplées après une infection naturelle. Une étude d'ADN génomique, a localisé 10 descendances de gènes de Pfs28 et Pfs25 sur le chromosome 10 ayant le même mode de transmission génétique [76]. Ces protéines sont des cibles pour les anticorps qui interfèrent avec la maturation des ookinètes et la formation des oocystes. Bien qu'elles ne montrent aucune synergie, P25 et P28 ont partiellement des fonctions redondantes. La même étude a suggéré que ni l'une ni l'autre de ces molécules ne doit être utilisée individuellement en ce qui concerne la survie du parasite mais l'absence de résultats communs à P25 et P28 subsiste. Il apparaît donc essentiel de cibler ces molécules simultanément dans un vaccin.

Le candidat TBV-Pfs25 est disponible, au Mali en cours d'essai de phase Ia/Iib sur des volontaires humains, après avoir été réalisée chez des adultes non exposés au paludisme aux Etats Unis.

- **Pfs25**

Pfs25 est une protéine de 24 KDa exprimée sur la surface de zygote et ookinète stade de *P. falciparum* et composée de quatre tandem facteur de croissance épidermique dans les domaines l'EGF en anglais « *epidermal growth factor* » est une hormone protéique [76]. L'infectivité était presque éliminée quand la concentration d'anticorps monoclonaux a été portée à 200ug/ml et de l'activité de blocage de la transmission était complète [76].

- **Pfs28**

Pfs28 est une protéine de 28 KDa exprimée et conservée sur la surface connue de *P. falciparum*, dans une phase transitoire entre zygote et ookinète.

L'activité de blocage de la transmission contre *P.falciparum* a été encore améliorée lorsque Pfs25 et Pfs28 étaient exprimées comme une seule protéine chimique dans la levure, la 25-28c protéine recombinante. La vaccination avec 25-28c protéine recombinante a arrêté complètement le développement des oocystes plus tôt, en utilisant une dose plus faible et pendant une grande période, que la vaccination soit avec Pfs25 ou Pfs28 seul ou combinaison des deux [77].

5. Généralités sur l'infestation expérimentale

5.1 Définition :

C'est une technique qui consiste à gorger des femelles néonatales avec du sang d'un sujet de gamétocytes. Il existe différentes méthodes d'infestation : une dite « directe » et l'autre « indirecte ».

5.2 Historique :

En 1957, Muirhead-Thomson a publié les premières études qui ont permis de déterminer dans des zones de paludisme la proportion de personnes qui sont infectieuses pour les moustiques. Ainsi, il trouva dans un village de l'Afrique de l'Ouest que 10-11% des individus étaient infectieux pour les moustiques. Cette étude lui a permis de grouper les porteurs de gamétocytes par tranches d'âge en fonction de leur infectivité pour les moustiques.

En 1988 Graves et al, ont publiées les résultats des études d'infectivité basées sur l'infection directe. La technique fut utilisée aussi par [78] pour caractériser la transmission du paludisme à Kataragama au Sri-lanka.

Les méthodes d'infestation directe et sur membrane ont été utilisées pour l'évaluation de l'immunité de blocage de la transmission du paludisme en cherchant les facteurs influents [79].

5.3 Infestation directe ou « direct feeding » :

Les moustiques contenus dans un pot (25-30 moustiques/pot) sont directement gorgés sur les jambes (mollets) ou sur les cuisses du porteur de gamétocytes pendant 10-15mn. Cette technique est aussi souvent appelée en anglais « **Direct Skin Feeding** » [80].

5.4 Infestation sur membrane ou « membrane feeding » :

Les moustiques sont gorgés sur du sang à travers la membrane (para-film) d'un dispositif appelé « feeder » pendant 10-15mn. Lorsqu'on utilise du sang infecté prélevé chez un porteur de gamétocytes, cette technique prend l'appellation de anglo-saxon « **Direct Membrane Feeding Assay** » [81].

5.5 Intérêts :

Ces deux méthodes ont permis de comprendre et d'expliquer plusieurs phénomènes dans la problématique du paludisme, et constituent de bons outils de travail.

5.6 Infectivité des porteurs de gamétocytes pour le moustique :

Seuls les porteurs de gamétocytes matures de *P. falciparum* sont infectants pour les anophèles. Cependant, tout porteur de gamétocytes n'est pas nécessairement infectant. Ceci s'explique par de nombreuses considérations sur les facteurs limitant le développement sporogonique, exposées ci-après, et qui sont groupés en facteurs « moustique » facteurs « parasite » facteur « humains ». En pratique, il faut envisager :

- Le rôle inhibiteur de l'immunité naturelle bloquant la transmission chez certains porteurs ;
- L'absence d'infectivité des gamétocytes de stade V encore trop jeunes ;
- Un mauvais rendement du développement gamétoyte d'oocyste ;
- Le traitement préalable du porteur de gamétocytes par un sporonticide (comme Sulfadoxine pyriméthamine) ;
- Un grand déséquilibre du sex-ratio des gamètes.

Inversement, il est possible d'observer des sujets infectant les moustiques malgré un test négatif pour le dépistage des gamétocytes en goutte épaisse. Plusieurs explications sont possibles :

- La densité gamétoytaire est en dessous du seuil de détection du test ; la détection des gamétocytes peut alors être améliorée en faisant sécher rapidement la goutte épaisse, par exemple dans un four à micro-ondes ou bien en utilisant la méthode QBC ou une technique PCR, le QT-NASBA [82] ; ;
- La présence de gamétocytes dans le derme, ou dans le compartiment lymphatique [82] ;
- La non-équivalence entre la densité gamétoytaire mesurée dans le sang capillaire et la densité ingérée par le moustique, notamment à cause d'une grande variabilité du volume sanguin ingéré par chaque moustique, ou du fait d'une agrégation des gamétocytes circulants [83] ;

- Une dernière hypothèse pourrait être le décollement des gamétocytes durant la coloration de la goutte épaisse non fixée, comme cela a été observé pour les Trophozoïte de *P.falciparum* [84].

Ainsi seuls quelques-uns de ces facteurs peuvent être exploités du point de vue épidémiologique à savoir la prévalence et la densité gamétocytaire.

Ceci pourrait être à l'existence d'une probable corrélation entre la charge gamétocytaire et l'infectivité du porteur pour le moustique [85]. Actuellement, ils restent les seuls paramètres utilisés sur le terrain.

METHODOLOGIE

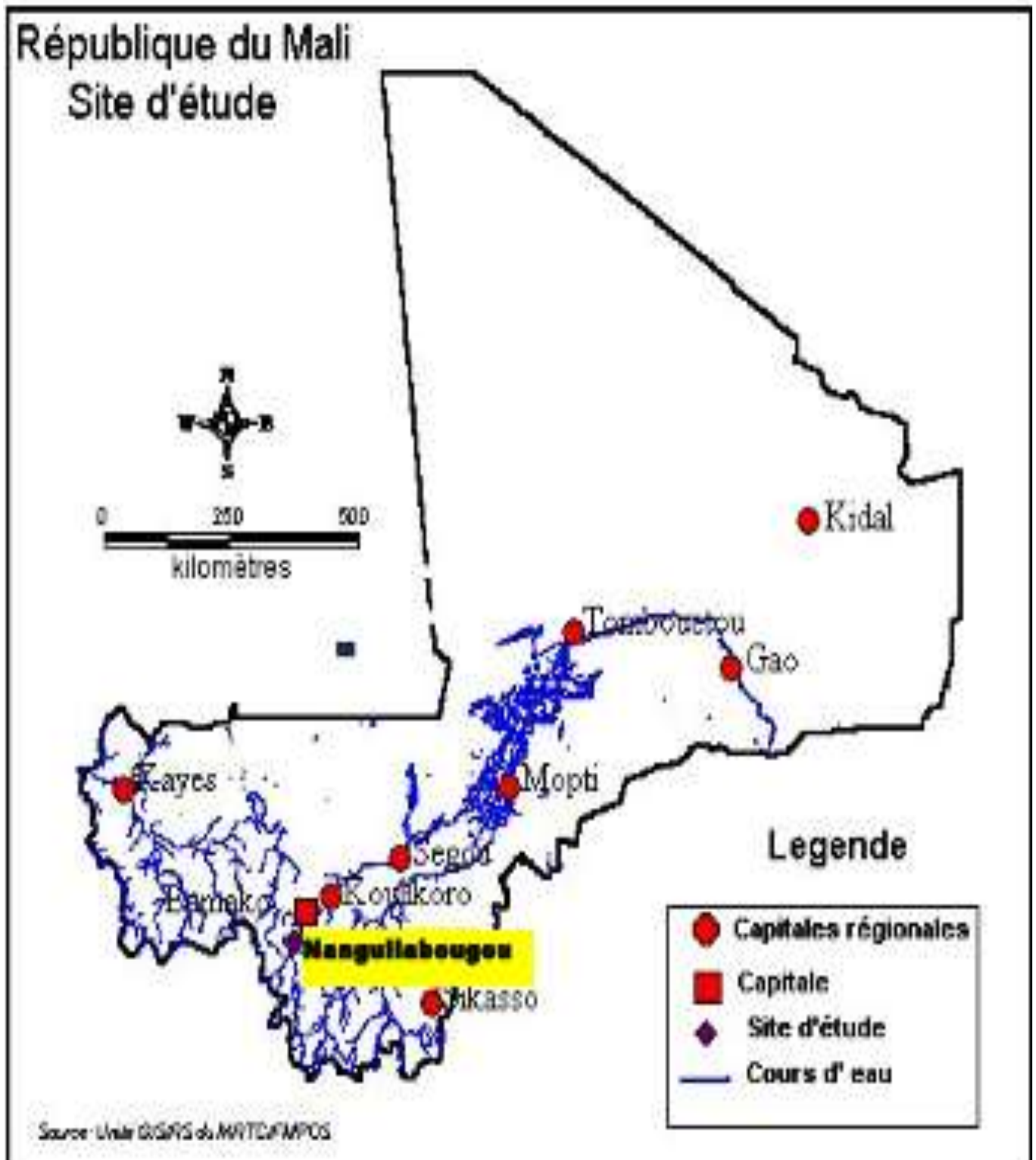
6. Méthodologie

6.1 Site d'étude :

Le village de Nanguilabougou et son hameau Kouroubabougou ont été choisis comme site d'étude.

Le village de Nanguilabougou est situé à 63 Km au Sud-Ouest de Bamako sur la rive gauche du fleuve Niger. Il s'étend le long de la route reliant Bamako à Kankan (en Guinée), limité au Nord-Est par le village de Bancoumana, au Sud- L'Est par le fleuve Niger, à l'Ouest par le village de Kouroubabougou, au Sud-Ouest par le village de Nianganabougou, le village est accessible en toute saison. Le village fait partie du district de Bancoumana, il est situé à 3 Km au Nord de dernier.

Dans cette zone, le paludisme y est hyper-endémique et sa transmission est intense pendant la saison des pluies. Le village est à 3 Km du fleuve Niger.



Source : GIS (MRTC) Bamako 2008

Figure 6 : Carte du Mali indiquant le site d'étude (Nanguilabougou).

6.2 Population :

La population de Nanguilabougou et son hameau est estimée à 800 personnes, composée essentiellement de Malinké (98% de la population) et les enfants constituent la majorité de la population (Recensement du village de Nanguilabougou 2017). Cette population tend vers le cosmopolisme avec l'immigration des Bambara, des Peulhs et des Dogons.

6.3 Historique :

La création du village remonterait au 18^{ème} siècle quand les fondateurs vinrent occuper l'actuel site quittant leur village d'origine qui se trouvait sous l'occupation des troupes d'Almamy Samory TOURE. Pour la même raison socioculturelle, le village a décidé de taire sur le nom des premiers chefs.

6.4 Relief et hydrographie :

- Relief :

Les grandes unités de paysage du terroir de Nanguilabougou se composent :

- + **Glacis d'érosion** : située au Nord du village, s'étend dans la plaine alluviale en bande longitudinale de direction Ouest-Est. Sa superficie est de 144 ha. Elle est caractérisée par des sols gravillonnaires peu profonds avec souvent de faibles recouvrement de sols hydromorphes de texture limono-argileuse.
- + **Plaine alluviale** : s'étend sur une superficie de 944 ha, elle occupe tout le centre du terroir hormis la bande gravillonnaire. Elle est caractérisée par des sols limino-argilosableuses qui sont très fertiles.
- + **Bas-fond** : occupent les parties extrêmes Nord et Sud du village. Elle est exploitée pour le maraichage et la riziculture. Sa superficie est de 528 ha.
- + **Bourrelet de berge** : occupe une surface de 112 ha, borde les eaux du fleuve Niger. Elle sert de passage opposé au fleuve et est exploitée pour la culture du sorgho, du gombo et du maïs.

- Hydrographie :

Les deux principaux cours d'eau arrosant le village de Nanguilabougou sont le « koba » coulant à la limite Nord du village et le « fleuve Niger » limitant le village au Sud. Ces deux

cours d'eau sont d'une importance capitale pour l'économie du village. Ils sont utilisés surtout pour le maraichage, la pêche et l'abreuvement des animaux.

En plus de ces deux cours d'eau, il existe trois mares (Somadji, Missilami dalani et Farateba dalani) toutes situées au Sud du village. Elles servent de pêche et d'abreuvement des animaux.

6.4 Climat et végétation :

- Climat :

Nanguilabougou jouit d'un climat de type soudanien. Il existe deux saisons :

L'hivernage qui s'étend de Juin à Octobre et la saison sèche de Novembre à Mai.

La pluviométrie annuelle varie de 800 à 1200 mm ; La température est très variable au cours de l'année dont la plus basse (18°C) est observée au mois de Janvier et la plus forte au mois de Mai (38°C). Les vents dominants sont :

-La mousson qui apporte la pluie, souffle de l'Est à l'Ouest ; elle est violente en début et en fin d'hivernage ;

-L'harmattan souffle du nord-est au sud-ouest. Il sèche les cours d'eau, jaunit les feuilles des arbres et provoque et provoque la chaleur.

- Végétation :

La végétation est constituée d'une forêt claire. Elle est de type savane herbeuse avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger et de son affluent. On y rencontre de grands arbres tels que : la Karité (N.S *Vittelaria paradoxa* ; N.V : Sii en bambara), le néré (N.S : *Parkia biglobosa*) ; le tamarinier (N.S : *Tamarindus indica*) ; le toro (N.S : *Ficus gnaphalocarpa*), les genres *Combretum Guiera* (N.V : N'goudié en Bambara) et les arbustes recouvrant une strate herbacés.

6.5 Economie :

Les principales activités économiques pratiquées sont l'agriculture, l'élevage, la pêche. A la fin de la saison de pluies, la population effectue des activités génératrices de revenus telles que : le maraichage, la pêche, les petits commerces (arachides, beurre de Karité etc. ...). L'agriculture est basée sur les cultures vivrières (mil, sorgho, riz, arachides et haricot) ; les cultures maraichères (tomates, oignons, aubergines, salades, chaux et pastèque) ; ainsi que les cultures de plantation (manguier, bananier, organier, citronnier, manioc et papayer). Les

populations pratiquent l'élevage de bovins, d'ovins (moutons), de caprins (chèvres), d'équins (ânes), et de volaille (poules et pintades). La pêche pratiquée dans le fleuve est essentiellement basé sur la forge, la confection de cordes, de filets pour la pêche etc...

6.6 Organisation administrative :

Le chef du village est nommé au sein du lignage « DOUMBIA » fondateur du village et suivant la lignée patrilinéaire. Le chef de village est appelé à assurer la cohésion sociale à travers la gestion des conflits sociaux de façons impartiale. Il est assisté par quatre (4) conseillers nommés à l'issue d'une assemblée villageoise en fonction de leurs valeurs intrinsèques. Les conseillers servent en outre de courroie de transmission entre l'administration et de village à travers la couverture des impôts et taxes.

6.7 Infrastructure scolaire et socio-sanitaire :

Le village dispose d'une mosquée, d'un centre culturel réalisé par la FONDEM (Fondation-Energie-Monde), d'un centre d'alphabétisation réalisé par AMAPROS et d'une école fondamentale « premier cycle de cinq classes ». Le village ne dispose pas de centre de santé.

6.8 Habitats et coutumes :

- Habitats :

Les différents types d'habitations rencontrés sont :

- + Les maisons traditionnelles rectangulaires en banco couvertes de terre sont les plus nombreuses,
- + Les maisons rectangulaires en banco couvertes de tôles,
- + Les cases rondes en banco coiffées d'une toiture en paille.

- Coutumes :

Dans ce village est essentiellement pratiqué la religion musulmane, les aliments les plus consommés sont : le riz, le têt à base de mil.

Justification du choix de Nanguilabougou et de son hameau Kouroubabougou

Cinq principales raison justifient le choix de ce village comme site de note étude :

6.9 Justificatifs du choix de Nanguilabougou :

- L'étroite relation entre le MRTC et le village de Nanguilabougou ;
- La transmission du paludisme y est endémique
- Les études entomologiques effectuées dans la zone de Bancoumana en 1994 ont montré que la transmission du paludisme est assurée par *An. gambiae s.s* et *An.arabiensis* ;
- Le village de Nanguilabougou est exempt de pression médicamenteuse antipaludique ;
- La situation du village à 63 Km de Bamako, ce qui permet d'accéder au village au bout de deux (2) heures en toute saison de l'année.

6.9.1 Type et période d'étude :

C'est une étude longitudinale avec des passages transversaux répétés. Elle s'est déroulée de Juillet à Décembre 2017 avec quatre passages transversaux.

6.10 Echantillonnage :

- Porteurs de gamétocytes :

L'étude a porté sur les enfants âgés de 5 à 15 ans car la tranche d'âge la plus touchée par le paludisme et qui infeste mieux les moustiques (Touré. et al, 1998). Au cours de notre étude, la sélection des porteurs de gamétocytes a été faite par sélection rotative de soixante enfants pris au hasard dans le village. Le dépistage de ces enfants pour le portage de gamétocytes s'effectuait jusqu'à l'obtention d'au moins deux porteurs pour les séances de l'infestation expérimentale.

- Pour la population Anophélienne :

La forme moléculaire M d'*An. gambiae s.s* qui depuis 2013, a été érigée au rang d'espèces à savoir, *An. coluzzii* par Coetzee et al. 2013 a été utilisées pour les séances d'infestation. La taille des échantillons a été établie en fonction des besoins de l'étude et la capacité de l'insectarium.

6.11 Considération éthique :

Le protocole d'étude a été soumis au comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et Odontostomatologie de l'USTTB du Mali (FMOS, FAPH) avant sa réalisation sur le terrain.

Après l'acceptation du protocole, une rencontre a été organisée entre les représentants du laboratoire, les autorités locales du village pour expliquer les objectifs du travail afin d'avoir leur consentement.

Le travail a été exécuté après accord du comité d'éthique de la FMOS, FAPH et le consentement éclairé, écrit et signé de la communauté de Nanguilabougou représentée par le chef de village et ses conseillers.

6.12 Sélection des enfants de 5-15 ans :

6.12.1 Organisation du travail :

Equipe parasito-clinique :

Composée d'un Interne en Pharmacie, d'un Professeur en parasitologie, d'un Professeur en l'Entomologie, de cinq techniciens de laboratoire, et des 2 guides chargés d'informer les familles des enfants à la veille de chaque passage.

Pendant le passage, le travail était organisé comme suit :

- Poste 1 ou poste d'identification et de clinique :

Toutes les activités menées à ce poste ont été effectuées par l'interne aidé par les guides des 2 villages.

Une fiche comportant la date, le numéro, d'identification, le nom, le prénom ; l'âge, le sexe, le poids, la température, habitants et utilisation des moustiquaires et le niveau de la rate (splénomégalie, selon la classification de **Hackett**) étaient remis aux enfants puis dirigés vers le poste 2.

Toutes ces informations ont été mentionnées dans un registre et gardées au niveau de l'interne de l'équipe.

Matériel de consultation :

- Thermomètre
- Balance
- Stéthoscope
- Abaisse-langue
- Médicaments (coartem, métronidazole, paracétamol etc...)

La splénomégalie était classée suivant la classification de **Hackett** décrit comme suit :

-Rate 0 : Rate normale, non palpable

-Rate 1 : Rate palpable à l'inspiration profonde

-Rate 2 : Rate palpable sur la ligne mammaire gauche, ne dépassant pas une ligne horizontale passant à égale distance entre le rebord costal et l'ombilic

-Rate 3 : Rate dépassant cette ligne sans dépasser l'ombilic

-Rate 4 : Rate dépassant l'ombilic sans franchir l'horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne

-Rate 5 : Rate dépassant cette ligne horizontale

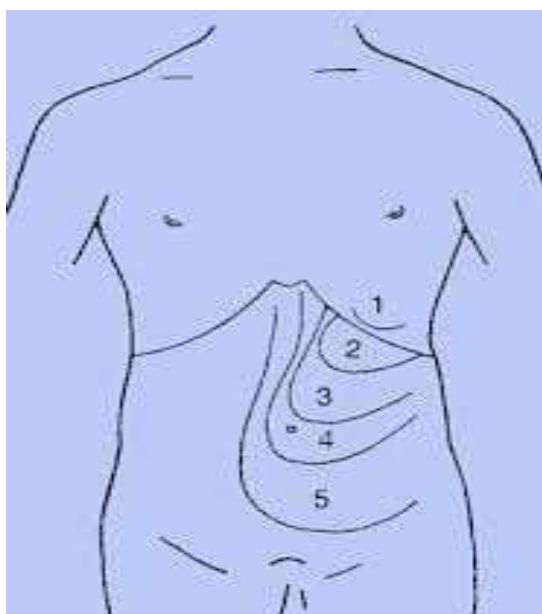


Figure 7 : La classification de la splénomégalie de Hackett.

<http://www.impact-malaria.com> juin 2011.

Poste 2 ou poste de confection et de lecture de la GE :

Ce poste était constitué de cinq biologistes. Après l'identification de l'enfant, la goutte épaisse (GE) était effectuée. Les lames étaient séchées à l'air libre à l'abri des mouches puis arrangées dans des boîtes à OMS. Elles étaient colorées 30mn après leur confection puis la lecture était faite au microscope objectif 100 pour la détection des gamétocytes. La lecture était faite après séchage par rapport à 300 leucocytes et rapportés à 7500 leucocytes pour l'estimation de la parasitémie.

Matériel de prélèvement :

- Lames porte-objet
- Vaccinostyles les stériles
- Coton hydrophile
- Alcool 90%
- Gants
- Bic, croyons et feutres
- Boîtes de collection des lames
- Poubelles

Mode opératoire :

Nettoyer le bout du doigt (index ou majeur) avec un tampon d'alcool. Piquer à l'aide du vaccinostyle, essuyer la première goutte avec du coton sec. Déposer la seconde goutte sur la lame comportant le numéro d'identification du sujet et la date. Les larmes sont séchées à l'air libre, à l'abri des mouches et de la poussière puis arrangées dans une boîte de collection.

Matériels et réactifs de coloration des lames de la GE :

- Eau distillée à PH 7,2
- Bac de coloration
- Râtelier
- Gants
- Eprouvette graduée

Technique de coloration :

Placer les larmes dos contre ventre dans le bac de coloration. Ajouter le Giemsa dilué à l'eau distillée à 3%, Attendre 30 mm, puis rincer avec de l'eau et laisser les larmes séchées sur le râtelier.

Lecture des lames :

Nous avons fait la lecture des lames en deux temps ; le premier temps consistait à sélectionner des porteurs de gamétocytes sur le terrain : la lecture de la GE consiste à identifier et à compter par champs microscopique les différents stades et espèces parasitaires sur 300

leucocytes. Choisir le sens de la lecture (horizontal, vertical) avant de commencer et éviter de revenir sur les mêmes champs microscopiques. Lire toute la lame au microscope à l'objectif (100) pour la détection des gamétocytes. Les porteurs sont classés en fonction des charges gamétocytaire (1+, 2+, 3+). Le deuxième temps consistait à faire une relecture des lames sur 1000 leucocytes :

La parasitémie est déterminée suivant la méthode quantitative leucocytaire. Les parasites sont comptés en même temps que les leucocytes sur lames. Lorsque le nombre de 1000 leucocytes est atteint, le compte est arrêté et on rapporte la gamétocytemie correspondante au nombre de leucocytes dénombrés au Counter (NFS). La parasitémie exacte du sujet est alors obtenue par la formule suivante : **$P = [(N \times \text{Nbre GB}) / 1000] \text{ par } \mu\text{l}$**

P= Parasitémie ; N= est le nombre de gamétocytes comptés au microscope sur 1000 leucocytes ; 1000= nombre de leucocytes comptés au microscope ; Nbre GB= est nombre de leucocytes par μl de sang dénombrés au Counter (NFS).

Equipe entomologique :

Composée d'un entomologiste sénior, d'un docteur en Pharmacie et Immunologiste, de deux techniciens en entomologie qui dirigeaient les séances d'infestation au laboratoire.

6.12.2 Sélection et convocation des porteurs de gamétocytes :

Au cours de nos passages, 60 enfants étaient sélectionnés de façon aléatoire dans les différentes familles. Seuls les enfants ayant une charge gamétocytaire plus élevée sur les soixante enfants, étaient choisis pour l'infestation expérimentale (minimum deux porteurs).

- Au laboratoire :

Un prélèvement sanguin de 10 ml était effectué sur chacun des porteurs en utilisant un système de vacutainer (aiguille papillon) auquel était relié : un tube d'héparine de 7 ml.

Le tube d'héparine était utilisé pour toutes les expériences de gorgement.

Elevage des moustiques et assurance-qualité de la fourniture de sang

- Elevage des moustiques :

Les moustiques utilisés dans notre étude sont issus de colonie élevée dans un laboratoire d'arthropodes de confinement de sécurité II (ACL2) du « Malaria Research and Training Center (MRTC) » et une colonie apportée du Burkina Faso.

Cette colonie a été établie à partir de femelles d'*An.coluzzii*. Des expériences ont montré que cette espèce s'adapte mieux aux conditions d'insectarium (température 25+2°C et 75_85% d'humidité relative). Après l'accouplement avec des mâles, les anophèles femelles sont gorgés sur membrane avec du sang (groupe O+) de donneurs sains suivis au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS). Cet apport de sang est indispensable pour la maturation des œufs de moustiques. Les femelles sont gorgées une fois par jour pendant deux jours successifs pour leur permettre de développer des œufs. Après avoir fait gorger les femelles sur membrane, elles sont mises au repos pendant les deux jours suivant le gorgement. Ce temps de deux jours est nécessaire pour la digestion du repas de sang afin qu'elles deviennent gravides. Le troisième jour, des pots de ponte contenant un peu d'eau (pour simuler les gîtes de reproduction de la nature dans lesquels les femelles d'*An. gambiae* pondent leurs œufs) sont placés dans les cages pour deux jours afin que les femelles viennent y pondre. La collecte des œufs se faisait deux jours après la mise en ponte dans ces petits pots. L'utilisation des pots comme pondoirs à l'avantage de permettre aux larves issues des œufs qui vont éclore les premiers, d'être dans l'eau et de rester en vie. Comme pondoirs, on peut utiliser des boîtes de pétri contenant du coton sur lequel, on dépose du papier filtre imbibé. Le papier filtre peut vite s'assécher contrairement aux pots d'eau. Puis les pots sont retirés et les œufs sont repartis dans des plateaux étiquetés (#date de ponte, # génération, # souche de la colonie) pour y éclore et donner des larves nourries à la « Tetramine » ou au « Koi Food ».

Dans les conditions de notre insectarium, les plateaux commencent à donner de nymphes à partir du 10^{ème} au 14^{ème} jour de la ponte des œufs dont elles sont issues. Les nymphes sont collectées quotidiennement et placées dans une cage d'émergence étiquetée en écrivant la date de leur émergence, le nombre de génération et la provenance de la souche. Le lendemain, les nymphes non- émergées sont retirées des cages et ajoutées aux nymphes du jour, placées dans une nouvelle cage s'il y a beaucoup de moustiques dans la précédente. Les moustiques d'une des cages d'émergence (cubiques de 30x30x 30cm faites de tulle moustiquaire de chaque côté) sont sélectionnés et gorgés un à deux jours après leur émergence pour le maintien de la colonie.

Assurance-qualité de la fourniture de sang :

Les poches de sang utilisées pour la maintenance de la colonie à l'insectarium, ont été testées négatifs pour : la syphilis, l'hépatite B, l'hépatite C et le VIH. En plus, un suivi supplémentaire est nécessaire et consiste à :

Interroger le donneur avant le prélèvement pour s'assurer qu'il n'a pas pris d'ivermectine qui peut affecter la survie des moustiques ;

Garder les poches au CNTS pendant 5 jours à compter de la date de prélèvement du sang. Au terme de ce délai, le donneur est interrogé pour s'assurer qu'il ne présente pas de signes de fièvre ou de céphalées qui sont généralement des symptômes de la fièvre de la vallée du Rif.

6.12.3 Tri des moustiques pour le gorgement :

Le tri des moustiques était une étape très importante qui demandait beaucoup de précautions pour ne pas les endommager et les rendre inaptés au moment du gorgement. Nous le résumons ici de manière sommaire :

- L'opération utilisant un aspirateur à bouche : tenant le tube dans la main et la gaine dans la bouche, aspirait un petit nombre de moustique dans le tube.

Il plaçait son index sur le bout du tube (pour éviter que les moustiques ne s'échappent) et comptait leur nombre ;

Il les transférait doucement dans les pots par expiration ; puis il fermait le trou de la base du pot avec un tampon de coton sec. Ces gestes étaient répétés jusqu'à avoir le nombre de moustiques requis par pot (50 femelles).

5.12.4 Transport et conservation des moustiques sur le terrain :

Pour le conditionnement des moustiques après le tri, les pots étaient placés dans les caisses en bois bien fixés dans leur loges ; la caisse était couverte avec une serpillière mouillée pour maintenir l'humidité optimale dans la caisse ;

Pour leur transport des moustiques de Bamako à Bancoumana, la climatisation du véhicule était mise en marche 15 mn avant le départ. Le conducteur se devait de rouler doucement pour éviter les secousses.

A Bancoumana les moustiques étaient gardés dans une salle de 4mx4m. Cette salle était équipée d'un thermo-hygromètre HOBO ou sont enregistrées l'humidité et la température de la salle, maintenues constantes grâce à un humidificateur et un climatiseur.



Figure 8a : Conservation des moustiques sur le terrain (ferme sana les serpillières)



Figure 9b : Conservation des moustiques sur le terrain (avec les serpillières).

Mise à jeun :

Les moustiques triés étaient nourris avec les cotons imbibés du jus sucré à 10%. Huit heures avant le gorgement, ces cotons ont été remplacés avec des cotons imbibés d'eau simple. Les moustiques étaient mis à jeûn total quatre heures avant le gorgement pour augmenter le taux de gorgement.

7. Procédure et méthodologie de l'infestation expérimentale :

7.1 Critères d'inclusion et de non inclusion :

Critères d'inclusion :

- ✓ Etre résident permanent de Nanguilabougou et son hameau Kouroubabougou.
- ✓ Etre bien portant et volontaire.
- ✓ Âge supérieur ou égal à 5 ans et inférieur ou égal à 15 ans.
- ✓ Ne pas être sous traitement antipaludique.
- ✓ Parent ou tuteur consentant.
- ✓ Avoir une goutte épaisse positive en gamétocytes avec une densité gaméocytaire supérieure ou égale 2 gamétocytes/500 WBC ou supérieure ou égale 30 gamétocytes/ μ l de sang.
- ✓ Etre asymptomatique.

Critère de non inclusion :

- ✓ Goutte épaisse négative en gamétocytes.
- ✓ Individu avec les signes du paludisme.
- ✓ Age supérieur à 4 ans et inférieur à 16 ans.
- ✓ Individu ou parent non consentant.
- ✓ Individu sous traitement antipaludique.
- ✓ Avoir une goutte épaisse positive en gamétocytes avec une densité gaméocytaire inférieure à 2 gamétocytes/500 WBC ou inférieure à 30 gamétocytes/ μ l de sang.

7.2 Processus de l'infestation expérimentale :

Au total 13 tubes à eppendorf étaient utilisés pour la dilution des anticorps à l'aide de pipettes-Pasteur et étaient comme suit :

Quatre tubes sans anticorps monoclonaux obtenus à partir du sang prélevé sur les volontaires de porteurs de gamétocytes :

- ✓ **WB** (whole blood) , **SR** (serum replacement), **AP** (autologous plasma),
No-mAB (sang total).

Sept tubes contenant les différents anticorps monoclonaux:

- ✓ **Pfs25 94**, **Pfs25 31**, **Pfs25 10**.

✓ Pfs48/45.1 15, Pfs48/45.1.2.5, Pfs48/45.1 0,625, Pfs48/45.1-1.25.

7.3 Etapes de dilutions des contenues dans les différents tubes témoins et des anticorps monoclonaux pour la DMF :

Le tube à héparine contenant 7 ml de sang total et un tube EDTA de 3 ml pour chaque porteur de gamétocytes.

Ces tubes à l'héparine ont été utilisés pour toutes les expériences de gorgement ; et les tubes EDTA a été utilisé pour prélèvement d'échantillons de plasma et d'ADN/ARN qui n'ont pas servi à l'expérience de gorgement.

- En premier lieu allumer et préchauffer la plaque chauffante à 37°C
- Mettre le sérum humain naïf ainsi que (13) tubes à eppendorf sur la plaque chauffante
- Centrifuger le tube a héparine contenant le sang total à 50 tours/minute pendant 5 minutes
- Transférer le surnageant (plasma) dans un tube de 15 ml, étiqueter et conserver
- Agiter un peu le culot sanguin obtenu et mettre 250 µl de ce culot dans chacun des différents tubes à l'exception du tube à WB dans lequel il fallait mettre 500 µl de sang total du porteur
- Procéder à la dilution des anticorps monoclonaux selon le tableau ci-dessous et les

Tubes	Ac monoclonal	Concentration Ac	Volume Ac (µl)	Volume Sérum humain (µl)
1	Pfs25 94	94 µg/ml	65,8	184,2
2	Pfs25 30	30 µg/ml	65,8	182,2
3	Pfs25 10	10 µg/ml	65,8	182,2
4	Pfs48/45.1 15	15 µg/ml	7,5	242,5
5	Pfs48/45.1-2,5	2,5 µg/ml	7,5	242,5
6	Pfs48/45.1-1,25	1,25 µg/ml	7,5	242,5
7	Pfs48/45.1-0,625	0,625 µg/ml	7,5	242,5

laisser à 37°C.

- Ajouter au tube de SR 250µl de sérum humain naïf
- Ajouter au tube de AP 250µl du plasma du volontaire
- Mélanger de façon douce avec mouvement de poignet au moins 10 fois
- Les onze (13) tubes à eppendorf donc 6 tubes témoins et 7 tubes contenant différents d'anticorps monoclonaux étaient placés à 37°C
- Chacun des tubes contient environ 500 µl comme volume. Enfin transférer le contenu des tubes dans les feeders correspondants.

7.4 Infestation sur membrane « membrane feeding » :

Cette méthode d'infestation a été utilisée pour l'infection des moustiques avec le sang des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*.

Matériels et mode opératoire :

Matériels :

- Un feeder-machine contenant de l'eau et muni d'un thermorégulateur ajusté à 37,5°C ; pour maintenir le sang dans les conditions corporelles ;
- Un feeder de petit calibre (mini-feeder) ;
- Deux supports ;
- Deux raccords reliant le feeder au feeder-machine ;
- Des morceaux de para film pouvant couvrir la grande ouverture du feeder sont découpés. Cette grande ouverture du feeder est fermée par un morceau de para film à l'aide d'un bracelet en plastique ;
- Les moustiques prennent leurs repas de sang à travers cette membrane d'où le nom d'infestation sur membrane sur membrane-feeding en anglais

Mode opératoire :

Les moustiques (50 par pot) dont treize (13) pots par porteur de gamétocyte, qui ont été à jeun 8 heures avant la séance d'engorgement se sont gorgés à travers la membrane et conformément au protocole de DMFA :

- 500 millilitres de sang seront utilisés pour l'infestation expérimentale
- Ce sang est mis dans les mini-feeders, connectées les uns aux autres, par leur petite ouverture

- Les feeders à leur tour sont connectés par les 2 raccords au feeder-machine dont le thermorégulateur est déjà ajusté à 37,5°C
- Le feeder-machine contient de l'eau qui circule à travers les feeders maintenant ainsi la température constante jusqu'à la fin des opérations
- Les moustiques contenus dans les pots (50/ pots) étaient appliqués à chaque feeder pendant 30 minutes en moyenne
- Les marquages des pots changeaient en fonction du porteur (exemple ML001 pour le premier porteur, ML002 etc... suivie de l'étiquette des AC monoclonaux et les tubes sans AC) Les moustique ont été gardés au repos à l'insectarium de Bancoumana dans les conditions optimales (température 25+_2°C et 75-85 % d'humidité relative). Deux heures après le gorgement les moustiques ont été enlevés doucement avec l'aspirateur à bouche et transférés dans un autre pot. Les moustiques ont été placés à l'insectarium et nourris au jus sucrés à 10% avant d'être disséqués au huitième jour.

Sept (7) jours après le feeding et en fonction de la date de l'infestation, les moustiques ont été sacrifiés et disséqués pour la recherche des oocystes. 30 moustiques ont été disséqués dans du mercurochrome, leurs estomacs ont été examinés à la recherche d'oocyste. Les oocystes ont été comptés et enregistrés et le restant des moustiques ont été gardés un jour de plus (8^{ème} jours après l'infestation) et étiquetés et gardés dans un tube eppendorf contenant du silicagel et du coton à gardés à -80°C.



Figure 10 : Séance de gorgement des moustiques.

7.5 Détermination des charges oocystiques des moustiques :

Au septième jour après l'infestation, les moustiques ont été disséqués. Cette dissection se faisait individuellement et nous donnions des identifiants (numéro, ML001, ML002et...) à chaque moustique disséqué.

Matériels :

- Loupe binoculaire
- Microscope
- Pince à disséquer
- Aiguille montée
- Mercurochrome à 0,5%
- Lame porte-objet
- Lamelles
- Boîtes de pétri
- Papier genre utility wipes
- Micro tubes
- Bic et fiches de dissection.

Technique de dissection :

- Agiter le pot contenant les moustiques pour les assommer sans les écraser puis les mettre dans une boîte de pétri qui contient du papier absorbant mouillé. Ce qui permet d'empêcher certains moustiques ayant la chance de se réveiller de s'échapper.
- Déposer une goutte de mercurochrome 0,5% sur la lame porte-objet.
- Poser le moustique sur le dos dans la gouttelette de mercurochrome.
- A l'aide de la loupe appuyer avec l'aiguille au niveau du thorax et maintenir la pression.
- Par la pince tire sur les deux derniers segments d'un mouvement contenu et doux. L'estomac est ainsi extrait avec les ovaires et/ou les œufs et les tubes de Malpighi.
- Enlever les autres éléments et bien étaler l'estomac pour la lecture au microscope entre lame et lamelle.

Lecture :

Elle consistait à examiner au microscope les estomacs des moustiques pour la présence d'oocystes à un grossissement de 10x, et à 40x pour confirmer en cas d'incertitude. Sur une fiche de base indiquer la présence ou l'absence d'oocyste. Le nombre d'oocystes par estomac était compté et porté sur la fiche de dissection.

7.6 Saisie et analyse des données :

Les données ont été enregistrées sur Excel 2013, et le texte sur Microsoft Word 2013. Les analyses ont été effectuées sur SPSS16.0 et sur EPI06 pour le calcul Khi 2 carré (X²). La valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

8. Résultats

8.1 Caractérisation sociodémographique de la population d'étude à Nanguilabougou :

L'étude a porté sur un total de 415 enfants âgés de 5 à 15 ans. Des gouttes épaisses ont été faites chez ces enfants après un examen clinique.

Tableau 1 : Répartition de la population d'étude selon le groupe d'âge.

Groupe d'âge	Effectifs	Pourcentage(%)
5-9 ans	225	54,2
10-15 ans	190	45,8
TOTAL	415	100

La majorité des enfants avaient un âge compris entre 5-9 ans
Le plus jeune avait 5ans et plus âgé avait 15 ans.

Tableau 2 : Répartition de la population d'étude selon le sexe

Sexe	Effectifs	Pourcentage (%)
Masculin	191	46,1
Féminin	224	53,9
Total	415	100

Le sexe féminin était prédominant avec 53,9% contre 46,1% de sexe masculin.
La sex-ratio était de 1,1 en faveur du sexe féminin.

8.2 Prévalence de l'infection palustre chez les enfants de 5-15 ans à Nanguilabougou et son hameau de Kouroubabougou :

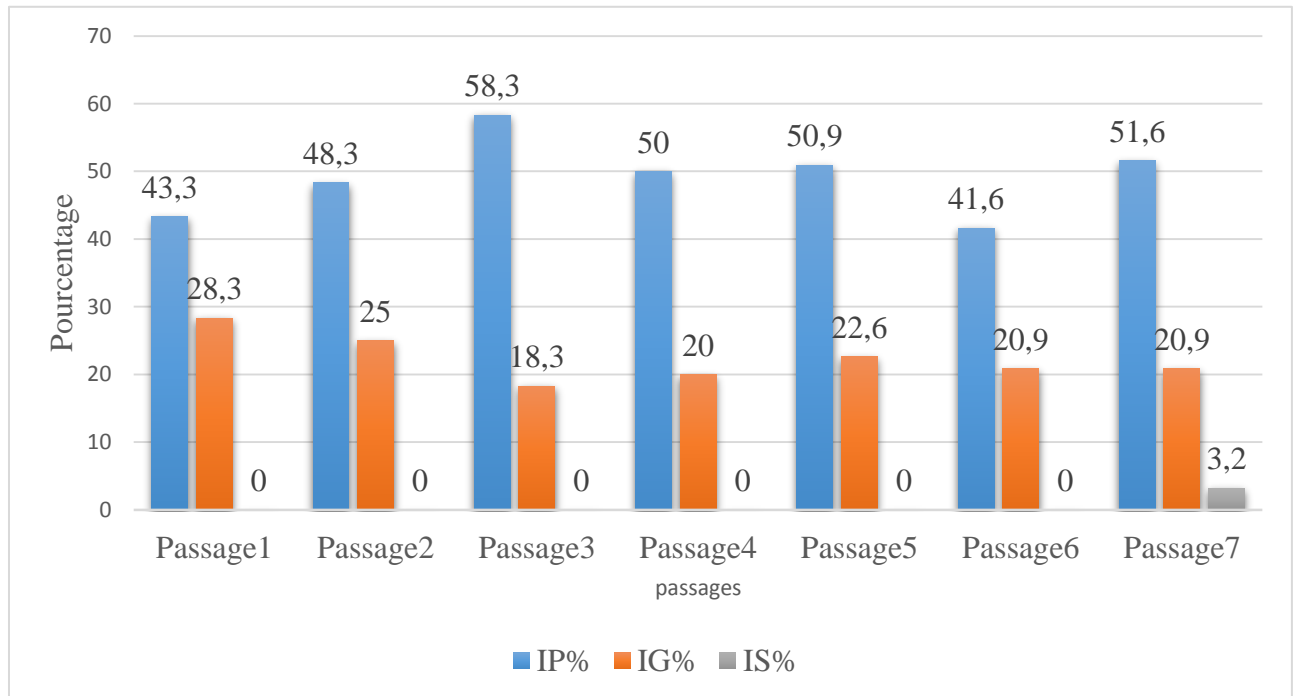


Figure 11 : Variations des indices paludométriques dans la population d'étude par passage.

L'IP moyen par passage était de 45,6% (n=108), comprise entre 27% et 61,7%. Cette moyenne a subi des variations statistiquement significatives ($X^2=36,26$; ddl=3 ; $P<0,05$).

L'IG moyen par passage était de 21,9% (n=52), comprise entre 14% et 28,3%. Cette moyenne a subi des variations statistiquement significatives ($X^2=25,87$; ddl=3 ; $P<0,05$).

L'IS moyen par passage était de 0,3% (n= 2) statistiquement significatives ($X^2=30$; ddl=3 ; $P<0,05$).

n=nombre positif par passages

8.3 Caractérisation des porteurs de gamétocytes de *P.falciparum* retenus pour l'infestation expérimentale entre JUILLET et DECEMBRE 2017 à Nanguilabougou :

Au total 25 porteurs de gamétocytes ont été sélectionnés pour séances d'infestation expérimentale.

Tableau 3 : Répartition des sujets retenus pour l'infestation expérimentale selon le groupe d'âge.

Groupe d'âge	Effectifs	Pourcentage (%)
5-9 ans	13	52
10-15 ans	12	48
Total	25	100

La majorité des enfants retenus au cours de l'infestation expérimentale avaient un âge compris entre 5-9 ans soit 52% (n=13) sur 25 enfants au total.

Tableau 4 : Répartition des sujets retenus pour l'infestation expérimentale selon le sexe

Sexe	Effectifs	Pourcentage (%)
Masculin	13	52
Féminin	12	48
Total	25	100

Le sexe masculin était plus représenté, soit 52% (n=13) de l'ensemble des porteurs de gamétocytes. La sex-ratio était de 1,08 en faveur de le sexe masculin.

Tableau 5 : Répartition des porteurs de gamétocytes selon le poids.

poids	Effectifs	Pourcentage (%)
10-24	14	56
25-49	11	44
Total	25	100

La proportion des porteurs de gamétocytes qu'ont un poids entre 10-24 était de 56% contre 44% pour le poids 25-49.

Tableau 6 : Répartition des porteurs de gamétocytes en fonction de leurs charges gamétocytiques.

Charges gamétocytes	Effectifs	Pourcentage (%)
0-75	4	16
75-150	2	8
150-300	13	52
<300	6	24
TOTAL	25	100

La charge gamétocytique la plus représentée au cours de l'infestation expérimentale était entre 150-300 gamétocytes/ μ l de sang soit 52%

Tableau 7 : Infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques en fonction du groupe d'âge.

Groupe d'âge	Effectifs	Nbre de Moustiques Infectés	% Infection
5-9	13	11	61,1
10-15	12	7	38,9
Total	25	18	72

Le groupe d'âge de 5-9ans a plus infesté les moustiques (soit 61,1% ; n=11) par rapport au groupe d'âge de 10-15 ans soit (38,9 ; n=7). Le taux moyen d'infection des moustiques pour les 2 tranches d'âge de 72% (18/25).

Tableau 8 : Infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques en fonction de la charge gamétocytaire.

Classes gamétocytes	Effectifs	Nbre de Moustiques Infectés	% Infection
0-75	4	1	0,04
75-150	2	2	0,04
150-300	13	11	1,43
<300	6	4	0,24
Total	25	18	72

Toutes les charges gamétocytaires ont été infectées par les moustiques. Les plus faibles taux d'infection ont été enregistrés chez les sujets dont la charge gamétocytaire était entre 0-75 gamétocytes/ μ l de sang. Le plus fort taux d'infection (1,43%) a été observé chez les sujets ayant une charge gamétocytaire comprise entre 150-300 gamétocytes/ μ l de sang.

Tableau 9 : Infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques selon le Poids.

Poids	Effectifs	Nbre de Moustiques Infectés	% Infestions
10-24	14	8	57,1
25-49	11	10	90,9
Total	25	18	72

Le taux le plus élevé (90,9%) a été observé chez les sujets dont le Poids est entre 25-49 et le plus faible (57,1%) chez les sujets Donc le Poids est entre 10-24.

8.4 Etude du taux d'engorgement et du taux de survie de *An.coluzzii* après infestations expérimentale de juillet à décembre 2016 à Nanguilabougou

Tableau 10 : Taux d'engorgement des moustiques par passage.

Passages	Total exposé	Total gorgé	% Engorgement
Passages 1	1100	1035	94
Passage 2	1950	1878	96,3
Passage 3	4550	4435	97,4
Passage 4	6500	6416	98,7
Total	14100	13764	97,6

Au total, 14100 *An. coluzzii* ont été exposés au sang des porteurs de gamétocytes. Le taux d'engorgement moyen par passage était de 97,6% (13764/14100) évoluant 94% et 98,7%.

Tableau 11 : Taux de survie des moustiques au huitième jour de l'infestation.

Passage	Total gorgé	Total disséqué	Nombre restant	% Survie
Passage 1	1035	543	0	52,4
Passage 2	1878	1085	0	57,7
Passage 3	4435	2695	237	60,7
Passage 4	6416	3851	545	60
Total	13764	8174*	782**	59,3

*nombre de moustiques disséqués pour le besoin de l'étude, étant 30/pot

**nombre de moustiques restant sur les 50/pot après le retrait des 30

Le taux de survie moyen par passage était de 59,3% comprise entre 52,4% et 60,7%. Cette moyenne a subi des variations statistiquement significatives ($X^2=698,23\%$, ddl= 3 P<0,05)

8.5 Etude des taux d'infection en l'oocystes d'*An.coluzzii* par Ac monoclonaux de Juillet à Décembre 2017 à Nanguilabougou :

Tableau 12 : Variations des taux d'infection des moustiques par passage.

Passages	Nbre Disséqué	Nbre Positif	% TI	IC à 95%	P
Passage 1	543	23	4,2	2,5 ; 5,9	$<10^{-3}$
Passage 2	1085	199	18,3	16; 20,6	$<10^{-3}$
Passage 3	2695	378	14,0	12,7; 15,3	$<10^{-3}$
Passage 4	3851	62	1,6	1,2 ; 2	$<10^{-3}$
Total	8174	662	8,0		

Sur un total 8174 de moustiques femelles disséqués, 662 étaient infectés d'oocystes. Le taux d'infection le plus élevé a été observé au Passage 3 avec 14,0% [12,7 ; 15,3] .

Tableau 13: Pourcentage des moustiques positifs en l'oocystes par anticorps monoclonaux.

Anticorps monoclonaux a différents concentration	Effectifs	Nbre de Moustiques Positifs en Oocystes	% Infections
Pfs25 94µg/ml	638	29	4,5
Pfs25 30µg/ml	643	68	10,5
Pfs25 10µg/ml	646	107	16,5
Pfs48/45 15µg/ml	642	21	3,2
Pfs48/45 1-12,5µg/ml	639	52	8,1
Pfs48/45 1- 1,25µg/ml	641	89	6,0
Pfs48/45 1- 0,625µg/ml	628	80	12,7
Total	4477	446	9,9

Le taux, d'infection le plus élevé (16,5%) a été observé chez l'anticorps monoclonal Pfs25 à la concentration de 10µl/ml. Le plus faible taux d'infection (3,2%) chez Pf48/45 à la concentration de 15µl/ml. La proportion des concentrations des 2 anticorps monoclonaux diminue tandis que les pourcentages Infections augmentent.

Tableau 14 : Pourcentage de moustiques positifs en oocystes en absence d'Ac monoclonaux

Témoins	Effectifs	Nombre de moustiques positifs en oocystes	% Infections
WB-Mali	637	30	4,7
WB-Burkina Faso	582	35	6,0
SR-Mali	641	79	12,3
SR-Burkina Faso	588	70	11,9
AP	668	28	4,1
No-mAB	646	79	12,2
Total	3762	321	8,5

Le taux d'infection le plus élevé a été observé avec chez SR
Avec 12,3 pour SR-Mali et 11,9 Burkina Faso.

8.6 Etude de la charge oocyste chez *An.coluzzii* de Juillet à Décembre 2017 à Nanguilabougou :

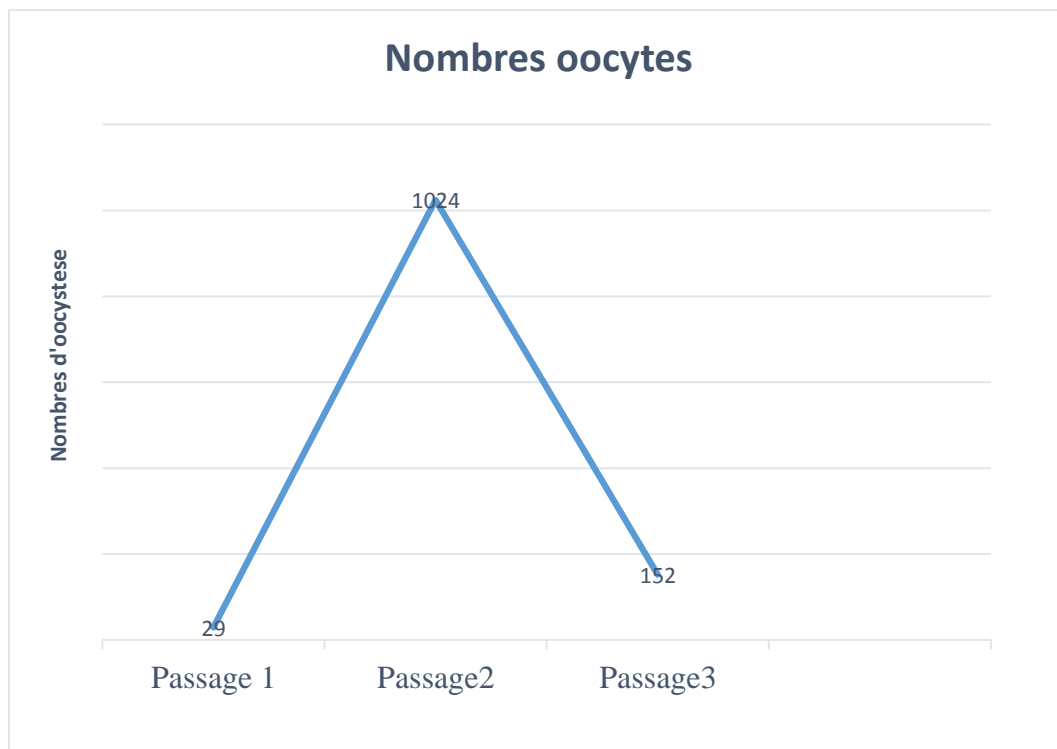
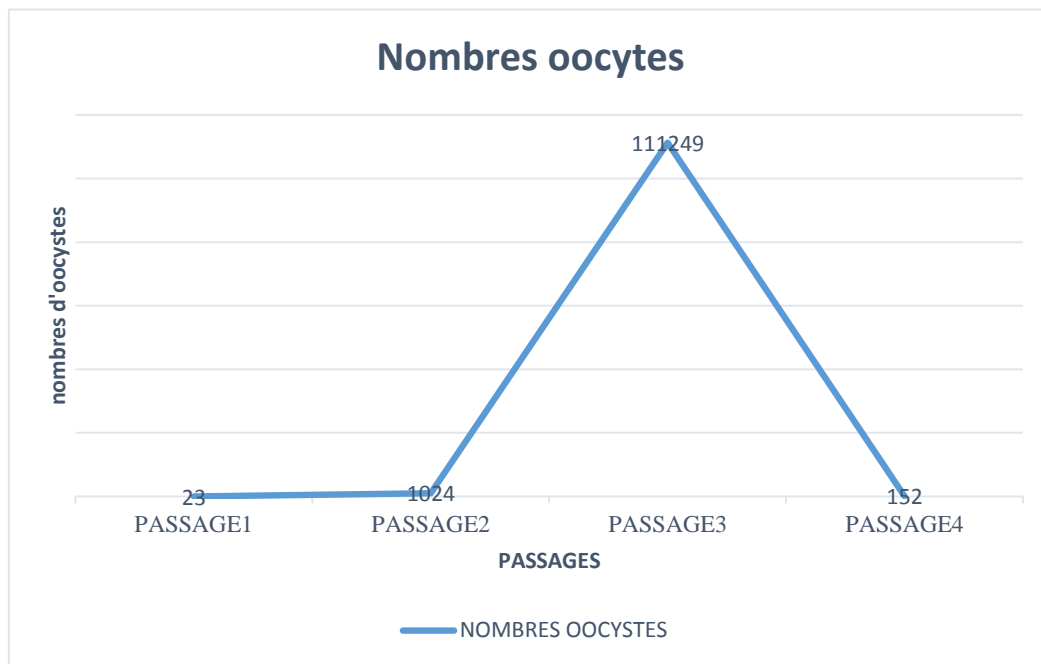


Figure 12 : variations des nombres d'oocytes par passages.

Le plus grand nombre d'oocyste a été observé au 3 em passage avec 111249 oocytes et plus faible nombre au premier passage avec 29 oocytes

9. Commentaires et Discussion

Notre étude s'est déroulée à Nanguilabougou de JUILLET à DECEMBRE 2017 avec quatre (4) passages transversaux. Le but de ce travail était d'étudier l'efficacité et la variabilité des anticorps monoclonaux pour l'infectivité des gamétocytes par *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles coluzzii* dans la zone endémie palustre de Nanguilabougou.

Le choix de la tranche d'âge 5 à 15 ans est basé sur les résultats des études antérieures menées à Bancoumana en 1994 et 1995 attestant que les porteurs de gamétocytes de cette tranche d'âge infectaient mieux les moustiques que ceux d'âge supérieur à 18 ans (Touré al, 1998).

Prévalence de l'infection palustre chez les enfants de 5-15 ans à Nanguilabougou :

Au total, la goutte épaisse (GE) a été réalisée chez 415 enfants lors de nos différents passages à Nanguilabougou. Notre population d'étude était constituée de 25 enfants âgés de 5-15 ans. La tranche d'âge 5-9 ans était majoritairement avec 52% (13/25). Le sexe ratio était de 1,08 en faveur du sexe masculin.

Au cours de nos passages une sélection aléatoire était faite dans cette population pour la goutte épaisse (GE). Vue la petite taille de notre échantillon, un même individu pouvait être sélectionné plusieurs fois pour le screening, mais le porteur était choisi une seule fois pour les séances de l'infestation expérimentale.

L'indice plasmodique (IP) moyen par passage était de 49,1% (204/415). Le taux le plus élevé était observé en début Septembre avec 58,3% (35/60) et le plus faible en début Décembre avec 41,6% (25/60).

Le taux moyen de l'indice gamétocytaire (IG) était de 21,9% (91/415). Le taux le plus élevé était observé au mois de Juillet avec 28,3% (17/60) et le plus faible en début Décembre avec 18,3% (11/60).

Le taux moyen de l'indice Splénique (IS) était de 0,4% (2/415). Le taux le plus élevé était observé enfin Décembre avec 3,2% (2/62). L'indice splénique était de zéro (0) aux différents passages saufs au dernier passage qu'était de 2.

Nos résultats sur les indices paludométriques différent de ceux obtenu par DOUMBIA en 2016, qui a obtenu un IP (45,6%), un IG (21,9%) et un IS (4,6%) dans une étude menée à Nanguilabougou chez les enfants de 5 à 15 ans. Cela pourrait rester la confirmation avec le village de Nanguilabougou est une zone où le paludisme est endémie.

Infestation expérimentale :

Les moustiques utilisés dans notre étude appartiennent à la forme moléculaire M d'*An. gambiae* s.s appelée depuis 2013 *An.coluzzii* (Coetzee et al, 2013). Leur élevage à l'insectarium a permis d'éviter le manque de moustiques pour les infestations expérimentales provenant de Mali et Burkina Faso.

Une ponction veineuse a été faite sur les enfants de 5-15 ans, volontaires, naturellement infectés et ayant une charge gamétocytaire supérieurs à 30 gamétocytes/ μ l de sang *P. falciparum*. Immédiatement après le prélèvement, on réalisait les différentes dilutions avec les

anticorps et le sang était mis en contact avec les moustiques à travers la membrane de parafilm pendant 30 minutes. Vingt-cinq porteurs de gamétocytes ont servi à gorger les moustiques.

Dans notre étude, nous avons choisi le gorgement Direct à travers une Membrane c'est la méthode appropriée pour pouvoir teste les Ac monoclonaux Pfs25 et Pfs48/45 a concentrations mélangées au sang veineux prélevé chez les porteurs de gamétocytes contrairement au Gorgement direct sur la peau, dans laquelle on n'allait pas pouvoir utilisés ces Ac vu que les moustiques se gorgeraient directement sur la peau des porteurs.

Caractérisation des porteurs de gamétocytes de *P.falciparum* retenus pour l'infestation expérimentale :

Dans notre étude, la moyenne d'âge des porteurs de gamétocytes était de 12,5 ans ce qui diffère de ceux de DOUMBIA en 2016 à Nanguilabougou qu'a obtenu une moyenne d'âge de 9,9 ans chez les porteurs de gamétocytes.

Le sexe ratio était de 1,1 en faveur du sexe masculin avec respectivement 52% (13/25) pour le sexe masculin et de 43% (12/25) pour le sexe féminin qu'est égal à ceux de DOUMBIA en 2016 qui a trouvé un sexe ratio en faveur du sexe masculin.

Etude des taux d'engorgement et de survie d'*An. coluzzii* :

Au total, 14100 *An. coluzzii* ont été exposés au sang des porteurs de gamétocytes. Le taux d'engorgement moyen par passage était de 97,6% (13764/14100). Notre résultat est comparable à ceux obtenu par DOUMBIA en 2016 qu'a obtenu un taux d'engorgement de 97,4 %.

Cela pourrait l'expliquer par le fait que le nombre d'*An. coluzzii* utilise dans notre étude est supérieur à ceux de DOUMBIA en 2016 avec 11000 d'*An. coluzzii*.

Le taux de survie moyen par passage était de 53,3 % (8174/13765). Cette moyenne a subi de variations statistiquement significatives ($P < 0,05$). Le taux le plus élevé a été observé au mois de Décembre avec 98,7 % (6416/6500) et le plus faible au mois de Juillet avec 94% (1035/1100).

Cela pourrait expliquer par le fait qu'en début de l'étude c'est ta dire en juillet, les moustiques de sexe mâle étaient dominant.

Etude des taux d'infection et de la charge d'oocystique d'*An.coluzzii* :

Au huitième jour de l'infestation, les moustiques survivants à raison de 50/ pots/ anticorps (sur ces 50/ pots, 30 moustiques ont été pris pour le besoin de l'étude et le restant a été conservé) ont été disséqués. Sur un total de 8174 moustiques disséqués ; le taux moyen d'infection était de 8% (662/8174) par dissection qui très supérieur à ceux de DOUMBIA en 2016 qu'a eu 2,9% (185/6302)

Cela pourrait l'expliquer par le fait que nous avons apporté des colonies d'*Anopheles coluzzii* du Burkina Faso qui ont montré un taux infectivité supérieure à ceux des colonies venant du Mali.

Par ailleurs contrairement à d'autres études similaires menées dans la même localité, au cours de notre étude nous avons eu à utiliser des anticorps monoclonaux pendant les séances de l'infestation expérimentale à la recherche d'une corrélation entre les différentes concentrations et l'infection des moustiques. Le taux d'infection le plus élevé a été observé chez l'anticorps monoclonal Pfs25 (Concentration en Ac = 10 µl/ml) avec 16,5 % (107/646) et le plus faible taux chez l'anticorps monoclonal Pfs25 (Concentration en Ac= 94µl/ml) avec 4,5 % (29/638) notre étude est comparatif avec ceux de DOUMBIA en 2016 qu'ont obtenu chez l'anticorps monoclonal Pfs25 à concentration en Ac = 1 µl/ml une taux infection de 4,6% et 0,4% pour anticorps à concentration 94 µl/ml.

Du côté de l'Ac monoclonal Pfs48/45, le plus grand taux d'infection a été observé chez Pfs48/45 (Concentration en Ac= 0,625 µl/ml) avec 12,7 % (80/628) et le plus faible taux chez l'anticorps monoclonal Pfs48/45 15 (concentration en Ac= 15 µl/ml) avec 3,2 % nos résultats sont comparatif à ceux de DOUMBIA en 2016 donc le taux le plus élevé était chez Pfs48/45 à concentration 0 µl/ml était de 5,8 % et le plus faible chez Pfs48/45 à concentration 15 µl/ml était de 0 %.

Ces résultats ont été obtenus après gorgement des *An. coluzzii* sur des porteurs de gamétocytes sélectionnés de façon aléatoire dans le même site d'étude. Ces résultats préliminaires démontrent qu'il y'a une différence entre les deux Ac monoclonaux à différentes concentrations quant à l'infectivité des moustiques de l'espèce d'*An. coluzzii*.

Le taux faible d'infection pourrait s'expliquer par le fait que l'anticorps monoclonal Pfs48/45 à forte concentration (15µg/ml) agirait plus vite sur les gamètes en empêchant leur fécondation qu'à faible concentration (0,625 µg/ml). Nos résultats reste égale concernant l'accroissement de l'infectivité selon les concentrations pour

Chez anticorps Pfs25 plus la concentration est grande plus le taux infectivité des moustiques est faible.

Chez anticorps Pfs48/45 plus la concentration est faible plus le taux infectivité des moustiques est élevé.

Pour le cas des témoins, le nombre infection était de 321 moustiques avec un pourcentage de 8,5 %, cette augmentation pourrait l'expliquer par le fait que la colonie d'*An.coluzzii* apporté du Burkina Faso a mieux infecté.

En absence d'Ac monoclonaux, le taux le plus élevé a été observé chez SR avec 12,3 % (79/641) et le plus faible chez AP avec 4,1 % (28/668). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le SR contrairement au AP ne contient pas d'Ac car c'est sérum naïf il n'y a pas de réaction Anticorps-antigènes.

10. Conclusion

Au terme de cette étude basée sur l'utilisation des anticorps monoclonaux à différentes concentrations par la méthode de gorgement direct sur la membrane, nous retenons qu'en bloquant la maturation des stades sexués chez le *Anophele coluzzii* et de ce fait bloqueraient le cycle du parasite chez l'anticorps monoclonal Pfs48/45, chez qui nous avons eu un faible taux d'oocystes à forte concentrations.

11. Recommandation

Au vu de ces résultats nous recommandons :

- Aux partenaires techniques et financier compétents, de financer et d'encourager de telles études qui pourront avoir une contribution dans la compréhension du mode d'action de ces anticorps et ainsi de faciliter l'élaboration de vaccins antipaludiques.
- Aux chercheurs d'élargir les sites d'études, dans laquelle ils seront en mesure de présenter les différents résultats et approches qui se comparent à d'autres sites qui peuvent produire un protocole standard et limites sur les expériences d'alimentation sur le terrain et en laboratoire.
- Aux populations des sites d'étude de bien comprendre pour mieux renforcer la coopération.

12. REFERENCES

- [1] « OMS | Rapport sur le paludisme dans le monde 2017 », WHO, 2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/fr/>.
- [2] « Enquete sur les indicateurs du paludisme au Mali (EIPM2015) », p. 3-4, juill. 2015.
- [3] I. V. Coutinho-Abreu & M. Ramalho-Ortigao, « Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 105, n° 1, p. 1-12, févr. 2010.
- [4] Institut Pasteur de Madagascar, « Vaccin anti-gamétocyte : rationnel, difficultés, avantages », 09:24:29 UTC.
- [5] L. C. Gouagna *et al.*, « Plasmodium falciparum malaria disease manifestations in humans and transmission to Anopheles gambiae: a field study in Western Kenya », *Parasitology*, vol. 128, n° 3, p. 235-243, mars 2004.
- [6] « Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie ANOFEL 2014 ». 2014.
- [7] D. Ourde OUSMANE, « Etude de sensibilité ex vivo des isolats de plasmodium falciparum aux médicaments antipaludiques dans le village de Kéniéroba », thèse de doctorat en pharmacie, faculté de pharmacie, Mali, 2017.
- [8] DOUMBIA, « Efficacité et variabilité des anticorps monoclonaux dans la prévention des moustiques au cours des essais de gorgement direct sur membrane », Thèse de la médecine, faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, MALI, 2016.
- [9] MARIKO, « étude de infectivité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez la forme moléculaire M d'*Anopheles gambiae* s.s en zone d'endemie palustre de nanguilabougou ». 01-2012.
- [10] P. Carnevale et V. Robert, Éd., *Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Éditions, 2009.
- [11] D. FONTENILLE *et al.*, « SYSTEMATIQUE ET BIOLOGIE DES ANOPHELES VECTEURS DE PLASMODIUM EN AFRIQUE, DONNEES RECENTES », p. 7.
- [12] « *Anopheles gambiae* Giles, 1902 », *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. [En ligne]. Disponible sur: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/713656.
- [13] « *Anopheles* (Cellia) *arabiensis* Patton, 1905 », MAP. [En ligne]. Disponible sur: <https://map.ox.ac.uk/bionomics/Anopheles-arabiensis/>.
- [14] M. Coetzee, R. H. Hunt, R. Wilkerson, A. Della Torre, M. B. Coulibaly, et N. J. Besansky, « *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex », *Zootaxa*, vol. 3619, p. 246-274, 2013.
- [15] « *Anopheles* (Cellia) *merus* Dönitz, 1902 », MAP. [En ligne]. Disponible sur: <https://map.ox.ac.uk/bionomics/Anopheles-merus/>
- [16] « Taxonomy of *Anopheles* », *Wikipedia*. 15-oct-2018.
- [17] E. Pilly et Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France), *Maladies infectieuses et tropicales*. Paris: Alinéa Plus, 2015.
- [18] T. Lehmann and A. Diabate, « The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective », *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, vol. 8, n° 5, p. 737-746, sept. 2008.
- [19] I. Soulama, E. C. Bougouma, A. Diarra, I. Nebie, et S. B. Sirima, « Low-high season variation in *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 (eba-175) allelic

- forms in malaria endemic area of Burkina Faso », *Trop. Med. Int. Health TM IH*, vol. 15, n° 1, p. 51-59, janv. 2010.
- [20] A. della Torre, Z. Tu, et V. Petrarca, « On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms », *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 35, n° 7, p. 755-769, juill. 2005.
- [21] A. Dolo *et al.* « Épidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana). », *Santé Publique*, p. 5, 2003.
- [22] P. Carnevale et V. Robert, Éd., « 5. La transmission vectorielle des plasmodies humaines », in *Les Anopheles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*, Marseille: IRD Éditions, 2017, p. 146-186.
- [23] M. Wahlgren and P. Perlmann, *Malaria: Molecular and Clinical Aspects*. CRC Press, 2003.
- [24] L. Konate *et al.* « Biologie des vecteurs et transmission de *plasmodium falciparum*, *p. malariae* et *p. ovale* dans un village de savane d'afrique de l'ouest (Dielmo, Sénégal) », *Parasite*, vol. 1, n° 4, p. 325-333, déc. 1994.
- [25] G. O. Gbotosho *et al.*, « *Plasmodium falciparum* gamétocyte carriage, émergence, clearance and population sex ratios in anaemic and non-anaemic malarious children », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 106, n° 5, p. 562-569, août 2011.
- [26] A. Buckling, L. C. Ranford-Cartwright, A. Miles, et A. F. Read, « Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro », *Parasitology*, vol. 118 (Pt 4), p. 339-346, avr. 1999.
- [27] « Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206972>.
- [28] C. Sokhina, J.-F. Trape, and V. Robert, « Gametocytaemia in senegalese children with uncomplicated *Falciparum* malaria treated with chloroquine, amodiaquine or sulfadoxine + pyrimethamine », *Parasite*, vol. 8, n° 3, p. 243-250, sept. 2001.
- [29] P. Carnevale et V. Robert, Éd., « 6. Faciès et typologie du paludisme en Afrique sud-saharienne », in *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*, Marseille: IRD Éditions, 2017, p. 187-223.
- [30] T. Ponnudurai, J. H. Meuwissen, A. D. Leeuwenberg, J. P. Verhave, et A. H. Lensen, « The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 76, n° 2, p. 242-250, 1982.
- [31] J. . Baker and R. Muller, *Advances in Parasitology*. Academic Press, 1983.
- [32] F. Esposito *et al.*, « Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 82, n° 6, p. 827-832, November 1988.
- [33] « *Plasmodium falciparum*: Immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli* - ScienceDirect ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489487901585>.
- [34] R. Poupardin, « Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides », p. 287.
- [35] J.Beier, « Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 519-543 ».[Enligne]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/13785420_Beier_JC_Malaria_parasite_development_in_mosquitoes_Annu_Rev_Entomol_43_519-543.

- [36] « *Plasmodium vivax*: Correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man », *Exp. Parasitol.*, vol. 41, n° 1, p. 167-171, févr. 1977.
- [37] C. Boëte, R. E. L. Paul, et J. C. Koella, « Direct and Indirect Immunosuppression by a Malaria Parasite in Its Mosquito Vector », *Proc. Biol. Sci.*, vol. 271, n° 1548, p. 1611-1615, 2004.
- [38] L. S. of H. and T. M. P. H. Forum, *Malaria: Waiting for the Vaccine*. John Wiley & Sons, 1991.
- [39] A. P. Waters and C. J. Janse, *Malaria Parasites: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press, 2004.
- [40] R. E. Sinden, « 1. Parasitology, immunology and pathogenesis of malaria and babesiosis: Recent advances in the parasitology of malaria », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 83, p. 3-9, janv. 1989.
- [41] J. Healer, D. McGUINNESS, R. Carter, et E. Riley, « Transmission-blocking immunity to *Plasmodium falciparum* in malaria-immune individuals is associated with antibodies to the gamete surface protein Pfs230 », *Parasitology*, vol. 119, n° 5, p. 425-433, nov. 1999.
- [42] A. H. D. Kilian *et al.*, « Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control », *Trop. Med. Int. Health*, vol. 5, n° 1, p. 3-8, janv. 2000.
- [43] G. Pichon, V. Robert, T. Tchuinkam, B. Mulder, et J. P. Verhave, « Analyse quantitative de la distribution des oocystes de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles gambiae* », *Parasite*, vol. 3, n° 2, p. 161-167, juin 1996.
- [44] G. M. Jeffery and D. E. Eyles, « Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 4, n° 5, p. 781-789, sept. 1955.
- [45] L. J. Bruce-Chwatt *et al.*, « Chemotherapy of malaria », Geneva: World Health Organization, Geneva, 1986.
- [46] K. Ichimori, C. F. Curtis, et G. A. Targett, « The effects of chloroquine on the infectivity of chloroquine-sensitive and -resistant populations of *Plasmodium yoelii nigeriensis* to mosquitoes », *Parasitology*, vol. 100 Pt 3, p. 377-381, juin 1990.
- [47] V. Robert *et al.*, « La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Sénégal », *Trop. Med. Int. Health*, vol. 3, n° 8, p. 667-677, août 1998.
- [48] D. Modiano *et al.*, « Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria », *Nature*, vol. 414, n° 6861, p. 305-308, November. 2001.
- [49] C. Boudin, V. Robert, P. Carnevale, et P. Ambroise-Thomas, « Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and a savanna area in Burkina Faso. Comparative study on the acquired immunoprotection in native populations », *Acta Trop.*, vol. 51, n° 2, p. 103-111, juin 1992.
- [50] M. Jean, C. Pierre, et C. Marc, *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext, 2004.
- [51] D. Shutler, S. E. Reece, A. Mullie, P. F. Billingsley, et A. F. Read, « Rodent malaria parasites *Plasmodium chabaudi* and *P. vinckei* do not increase their rates of gametocytogenesis in response to mosquito probing », *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 272, n° 1579, p. 2397-2402, nov. 2005.
- [52] R. A. Yeates et S. Steiger, « Ultrastructural damage of in vitro cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) by purified proteinases of susceptible *Aedes aegypti* (L.) », *Z. Für Parasitenkd.*, vol. 66, n° 1, p. 93-97, févr. 1981.

- [53] N. Kumar & R. Carter, « Biosynthesis of two stage-specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes into ookinetes », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 14, n° 2, p. 127-139, févr. 1985.
- [54] M. Shahabuddin, T. Toyoshima, M. Aikawa, et D. C. Kaslow, « Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, n° 9, p. 4266-4270, mai 1993.
- [55] R. C. Langer and J. M. Vinetz, « Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix », *Trends Parasitol.*, vol. 17, n° 6, p. 269-272, juin 2001.
- [56] C. A. Grotendorst & R. Carter, « Complement Effects on the Infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* Mosquitoes. II. Changes in Sensitivity to Complement-like Factors during Zygote Development », *J. Parasitol.*, vol. 73, n° 5, p. 980-984, 1987.
- [57] P. F. Billingsley and W. Rudin, « The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of Plasmodium species », *J. Parasitol.*, vol. 78, n° 3, p. 430-440, juin 1992.
- [58] F. H. Collins *et al.*, « Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae* », *Science*, vol. 234, n° 4776, p. 607-610, oct. 1986.
- [59] D. Walliker *et al.*, « Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* », *Science*, vol. 236, n° 4809, p. 1661-1666, juin 1987.
- [60] K. D. Vernick, H. Fujioka, D. C. Seeley, B. Tandler, M. Aikawa, et L. H. Miller, « *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae* », *Exp. Parasitol.*, vol. 80, n° 4, p. 583-595, juin 1995.
- [61] A. N. Clements, *The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction*. Chapman & Hall, 1992.
- [62] J. A. Vaughan, L. Hensley, et J. C. Beier, « Sporogonic Development of *Plasmodium yoelii* in Five Anopheline Species », *J. Parasitol.*, vol. 80, n° 5, p. 674-681, 1994.
- [63] B. A. Okech, L. C. Gouagna, E. W. Kabiru, J. C. Beier, G. Yan, et J. I. Githure, « Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *Plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers », *J. Insect Sci.*, vol. 4, oct. 2004.
- [64] « Rapport OMS 2003 ». .
- [65] « OMS | Entomologie et lutte antivectorielle », WHO. [En ligne]. Disponible sur: http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/fr/.
- [66] « Guide de traitement du paludisme au Mali ». .
- [67] W. J. Tabachnick, « Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases », *J. Med. Entomol.*, vol. 40, n° 5, p. 597-606, sept. 2003.
- [68] B. Greenwood and G. Targett, « Do we still need a malaria vaccine? », *Parasite Immunol.*, vol. 31, n° 9, p. 582-586, sept. 2009.
- [69] F. Diawara *et al.*, « Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali », *Malar. J.*, vol. 16, n° 1, p. 325, août 2017.
- [70] A. Coulibaly, « automédication dans le traitement de l'accès palustre au niveau des officines privées de Magnabougou », faculté de pharmacie, Bamako, Mali, 2016.
- [71] A. Dolo *et al.*, « [Epidemiology of malaria in a village of Sudanese savannah area in Mali (Bancoumana). 2. Entomo-parasitological and clinical study] », *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1990, vol. 96, n° 4, p. 308-312, November. 2003.
- [72] K. Dumay, « Les avancées de la recherche dans l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme », p. 56, 2003.

- [73] K. R. DOBBS et A. E. DENT, « Plasmodium malaria and antimalarial antibodies in the first year of life », *Parasitology*, vol. 143, n° 2, p. 129-138, févr. 2016.
- [74] M. R. van Dijk *et al.*, « A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility », *Cell*, vol. 104, n° 1, p. 153-164, janv. 2001.
- [75] M. Arévalo-Herrera *et al.*, « Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 106, p. 202-211, août 2011.
- [76] D. C. Kaslow, « Transmission-blocking vaccines: Uses and current status of development », *Int. J. Parasitol.*, vol. 27, n° 2, p. 183-189, févr. 1997.
- [77] A. M. Tomas *et al.*, « P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions », *EMBO J.*, vol. 20, n° 15, p. 3975-3983, août 2001.
- [78] K. N. Mendis, P. H. David, and R. Carter, « Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: Considerations for malaria vaccines », *Int. J. Parasitol.*, vol. 20, n° 4, p. 497-502, juill. 1990.
- [79] « Role de l'immunité dans le blocage de la transmission ». .
- [80] S. L. Takala *et al.*, « Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali », *PLoS Med.*, vol. 4, n° 3, p. e93, mars 2007.
- [81] D. Diallo *et al.*, « Malaria treatment in remote areas of Mali: use of modern and traditional medicines, patient outcome », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 100, n° 6, p. 515-520, juin 2006.
- [82] T. J. C. Anderson *et al.*, « Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* », *Mol. Biol. Evol.*, vol. 17, n° 10, p. 1467-1482, oct. 2000.
- [83] G. Pichon, H. P. Awono-Ambene, et V. Robert, « High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host », *Parasitology*, vol. 121, n° 2, p. 115-120, août 2000.
- [84] P. Bejon, L. Andrews, A. Hunt-Cooke, F. Sanderson, S. C. Gilbert, et A. V. Hill, « Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density », *Malaria Journal*, déc-2006. [En ligne]. Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-5-104>.
- [85] W. J. Lee, A. Ahmed, A. della Torre, A. Kobayashi, M. Ashida, et P. T. Brey, « Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae* », *Insect Mol. Biol.*, vol. 7, n° 1, p. 41-50, févr. 1998.

13. RESUME

Titre : Etude de l'efficacité et de la variabilité des anticorps monoclonaux dans l'infectivité des gamétocytes de *P.falciparum* chez *l'Anopheles coluzzii* en zone d'endémie palustre de Nanguilabougou.

Année de soutenance : 2019

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de pharmacie-université de Bamako, Mali

Secteur d'intérêt : Santé publique et Parasitologie médicales

Résumé :

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique dans le monde principalement en Afrique sub-saharienne. L'accroissement de la résistance des médicaments antipaludiques et des moustiques aux insecticides suscitent une nouvelle approche. L'espoir se focalise sur les vaccins.

De Juillet à Décembre 2017 nous avons conduit une étude d'infestation expérimentale dans le village de Nanguilabougou, un village situé de 63 km au sud-ouest de Bamako sur la rive gauche du fleuve Niger et 3 Km de Bancoumana avec une population estimée à 800 habitants environ les enfants constitue majorité de la population. Dans le but d'évaluer l'efficacité et la variabilité des anticorps monoclonaux dans l'infectivité par *Plasmodium falciparum* chez *Anophele coluzzii* en zone d'endémie palustre de Nanguilabougou et son hameau Kouroubougou. L'activité de blocage de la transmission est mesurée par le gorgement direct à travers une membrane.

Des passages transversaux ont été organisés pour la sélection des porteurs de gamétocytes.

Les données parasitologiques recueillies chez les enfants de 5 à 15 ans étaient respectivement (IP= 49,1% ; IG= 21,9% ; IS= 0,4%) faisant Nanguilabougou une zone d'endémie palustre. Vingt-cinq enfants ont subis infestations expérimentales avec une prélèvement de 10 ml de sang des différents porteurs de gamétocytes mélangés aux anticorps monoclonaux Pfs48/45 et Pfs25 à différents concentrations ont été effectuées. Les *Anopheles coluzzii* âgés de 3 jours et mis à jeun pendant 8 heures se sont été gorgés à travers la membrane feeding pendant 30 minutes. Les moustiques ont été disséqués 8 jours après le gorgement. Nous avons trouvés le plus faible taux d'infection chez l'anticorps monoclonal Pfs48/45 à forte concentration (15µg/ml) avec 3,2% et plus élève taux d'infection à faible concentration (0,625µg/ml) avec 12,7%. Chez l'anticorps monoclonal Pfs25 nous avons observé des taux d'infection à 4,5% à une concentration de 94µg/ml et 16,5% à une concentration de 10 µg/ml.

Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour la standardisation et l'évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme.

Etude de l'efficacité et de la variabilité des anticorps monoclonaux dans l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles coluzzii* en zone d'endémie palustre de Nanguilabougou.

Mots clés : infestation expérimentale, Anticorps monoclonaux, Gamétocytes, *Anopheles coluzzii*, *Plasmodium falciparum*.

Name: DIARRA

First Name: Diarrahou

Title: Study of the efficacy and variability of monoclonal antibodies in the infectivity of *P. falciparum* gametocytes in *Anopheles coluzzii* in the malaria endemic area of Nanguilabougou.

Year of origin: 2019

City of Viva Voce: Bamako

Country of origin: Mali

Registration of copy: Library of the Faculty of pharmacy Bamako, MALI.

Area of interest: Public health, Parasitology/Research.

Summary:

Malaria is a major public health problem in the world, mainly in sub-Saharan Africa. Increasing the resistance of antimalarial and mosquitoes to insecticides is giving rise to a new approach. Hope focuses on vaccines.

From July to December 2017 we conducted an experimental infestation study in the village of Nanguilabougou, a village located 63 km southwest of Bamako on the left bank of the Niger River and 3 km from Bancoumana with an estimated population of 800 habitats around children constitute majority of the population. To evaluate the efficacy and variability of monoclonal antibodies in *Plasmodium falciparum* infectivity in *Anophele coluzzii* in malaria endemic area of Nanguilabougou and its hamlet Kouroubougou. The blocking activity of the transmission is measured by direct gorging through a membrane.

Transverse passages were organized for the selection of gametocyte carriers.

The parasitological data collected in children aged 5 to 15 years were respectively

(PI = 49.1%, GI = 21.9%, SI = 0.4%) making Nanguilabougou a malaria endemic area. Twenty-five children underwent experimental infestations with a 10 ml sample of blood from different gametocyte carriers mixed with monoclonal antibodies Pfs48 / 45 and Pfs25 at different concentrations were performed. *Anopheles coluzzii* aged 3 days and fasted for 8 hours were fed through the feeding membrane for 30 minutes. The mosquitoes were dissected 8 days after the gorgement. We found the lowest infection rate in monoclonal antibody Pfs48 / 45 at high concentration (15µg/ml) with 3.2% and higher high infection rate at low concentration (0.625µg/ml) with 12,7%. In monoclonal antibody Pfs25 we observed infection rates at 4.5% at a concentration of 94 µg / ml and 16.5% at a concentration of 10 µg / ml

This work opens interesting perspectives for the standardization and evaluation of vaccines blocking the transmission of malaria

Key words: experimental infestation monoclonal antibodies, Gametocytes, *Anophele coluzzii* *plasmodium falciparum*.

ANNEXES

I- Fiche de dissection

FICHE DE DISSECTION DES MOUSTIQUES D'INFESTATION

Localité :	Date dissection :
Date d'émergence :	Identification du porteur :
Date du repas de sang :	Charge gamétocytaire :
Identification du moustique :	Charge parasitaire :
N° du Groupe :	Nombre de femelle non gorgée :
N° de Famille :	

N° Ordre	Oocyste+/-	Charge oocyste	Abdomen stade	Observation	DNA
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

II-Fiche d'indentification des porteurs de gamétocytes

Infestation N° : ___ / Porteur : ___ / Date: / ___ / ___ / ___ /

Nom : _____ Prénom : _____ Sexe : M/ ___ / F/ ___ /

Village _____ Age _____ ans Poids : ___ kg

Habitat : _____

Adresse : _____

Type de maison : Tôle / ___ / Paille/ ___ / Terre/ ___ /

Moustiquaire : Oui/ ___ / Non/ ___ /

Goutte épaisse : Tropho : Oui/ ___ / Non/ ___ / Densité/µl : tropho/µl

Gaméto : Oui/ ___ / Non/ ___ / Densité/µl : gaméto/µl

Informations médicales : _____

Symptômes cliniques du palu : OUI/ ___ / Non/ ___ /

Si Oui

Température : _____ °C

Episode récent de paludisme ? Oui/ ___ / NON/ ___ /

Diagnostic : 1-Présomption : OUI/ ___ / NON/ ___ /

2-Microscopique : OUI/ ___ / NON/ ___ /

Traitement du paludisme dans les 15 derniers jours ? Oui / ___ / Non / ___ /

SI OUI spécifiez

Bon état de santé ? Oui/ ___ / Non / ___ /

Consentement éclairé : Oui / ___ / Non/ ___ /

Signature du parent : Oui / ___ / Non / ___ /

Autre : _____

Inclusion : Oui/ ___ / Non/ ___ /

Code : ML ___ /

Prélèvement pour DMFA : Oui / ___ / Non/ ___ /

Date: / ___ / ___ / ___ / Heure & minutes ___ /H ___ /mn

volume prélevé : ___ ml

III-Fiche de l'infestation expérimentale

DATE INFESTATION: / ____ / ____ / ____ /

Nom et Prénoms	Age	Chef de famille	N° STDN	Charge gaméto

SERMENTS DE GALIEN

Je jure, en présence des maitres de la faculté et de mes condisciples ;
D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur
Témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec
Conscience et de respecter non seulement la législation en
Vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du
Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade
Et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser
Mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser
Des actes criminels

Quel les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes
Promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

JE LE JURE !!